

**Министерство здравоохранения Российской Федерации**  
**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение**  
**высшего образования**  
**«Саратовский государственный медицинский университет**  
**имени В.И. Разумовского»**

*На правах рукописи*

**ЛЯПИНА АННА МИХАЙЛОВНА**

**ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛЮДЕЙ,  
ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЖИВОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНОЙ**

3.2.7. Иммунология

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

***Научные руководители:***

**Елисеев Юрий Юрьевич,**  
доктор медицинских наук, профессор

**Федорова Валентина Анатольевна,**  
доктор медицинских наук, профессор

Саратов – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	<b>С.</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	16
1.1 – Методы оценки эффективности вакцинации	16
1.2 – Реакции адаптивного иммунного ответа как маркеры вакциноиндуцированного иммунитета	21
1.3 – Особенности постинфекционного и поствакцинального адаптивного иммунитета против чумы и антигенная специфичность их реакций	29
1.3.1 – Гуморальный противочумный иммунитет	34
1.3.2 – Клеточные реакции адаптивного противочумного иммунитета	43
1.3.3 – Вакцины против чумы и особенности поствакцинального противочумного иммунитета	47
1.3.3.1 – Вакцины первого поколения	48
1.3.3.2 – Современные разработки в области вакцин против чумы	54
1.3.4 – Живая чумная вакцина EV НИИЭГ: реакции адаптивного иммунитета и методы оценки поствакцинального иммунного ответа	60
Резюме	78
<b>ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	79
2.1 – Участники исследования	79
2.2 – Клинический материал	81
2.2.1 – Получение сывороток крови	81
2.2.2 – Выделение мононуклеарных клеток периферической крови	82
2.3 – Панель рекомбинантных белковых антигенов <i>Y. pestis</i>	82
2.4 – Иммунологические методы	83
2.4.1 – Постановка твердофазного иммуоферментного анализа	83
2.4.2 – Постановка иммуоблоттинга	85
2.4.2.1 – Электрофорез белковых фракций	85
2.4.2.2 – Иммуоблоттинг	86
2.4.3 – Постановка реакции бластной трансформации лимфоцитов и оценка антиген-стимулированного пролиферативного ответа	87
2.4.4 – Оценка антиген-стимулированной продукции Th1/Th2/Th17 цитокинов	87
2.5 – Статистический анализ	88

<b>ГЛАВА 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	90
3.1 – Гуморальный ответ привитых живой чумной вакциной доноров к панели рекомбинантных белков	90
3.1.1 – Иммунореактивность сывороток вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров к панели рекомбинантных белков в твердофазном иммуноферментном анализе	91
3.1.2 – Иммунореактивность сывороток вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров к панели рекомбинантных белков методом иммуноблоттинга	95
3.1.3 – Комбинации белков, вовлеченных в гуморальный ответ доноров, вакцинированных живой чумной вакциной	99
3.1.4 – Определение диагностической информативности экспериментальных тестов на основе рекомбинантных сенситинов для оценки качества поствакцинального иммунного ответа	104
3.2 – Исследование реакций клеточного иммунитета у вакцинированных живой чумной вакциной с применением панели рекомбинантных белков	108
3.2.1 – Пролиферативный ответ мононуклеаров периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной при стимуляции <i>in vitro</i> рекомбинантными белками	108
3.2.2 – Оценка цитокинового ответа мононуклеаров периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной доноров на <i>in vitro</i> стимуляцию рекомбинантными белками	112
3.2.2.1 – Спонтанная продукция цитокинов	112
3.2.2.2 – Продукция Th1/Th2/Th17-цитокинов в ответ на <i>in vitro</i> стимуляцию ConA и цельноклеточными препаратами живой чумной вакцины	114
3.2.2.3 – Продукция Th1/Th2/Th17-цитокинов в ответ на <i>in vitro</i> стимуляцию рекомбинантными белками	119
Резюме	125
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 3	126
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	130
<b>ВЫВОДЫ</b>	145
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b>	147
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	148
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	149

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Разработка и совершенствование методов оценки качества поствакцинального иммунитета является актуальным направлением современной иммунологии и вакцинологии. Особенно значимым это становится в настоящее время, когда на фоне появления новых (вирусная инфекция Зика, COVID-19 и др.) и возрастания рисков возникновения вспышек уже известных, ре-эмерджентных инфекционных заболеваний, необходимо быстрое обеспечение стойкого и эффективного специфического иммунитета у населения. Эта задача требует не только создания современного арсенала средств специфической профилактики, но также методов оценки их эффективности на популяционном и индивидуальном уровне.

Традиционно на популяционном уровне эффективность вакцинации оценивается по эпидемиологическим показателям. Их использование, однако, не отражает наличие иммунитета на уровне индивидуума, а также неприменимо в случае редко встречающихся заболеваний. Способность вакцины вызывать формирование иммунитета непосредственно у привитого характеризует иммунологическая эффективность вакцинации, оценку которой проводят по измерению иммунологических маркеров, например, определению уровня специфических антител [7, 56]. Базовыми характеристиками подобных показателей являются высокая специфичность, позволяющая идентифицировать именно поствакцинальный иммунный ответ, а также возможность их объективного измерения [280]. В случае установления статистически значимой корреляции показателей вакциноиндуцированных иммунологических реакций с уровнем защиты вакцинированного (корреляты протекции), они могут быть использованы для разработки критериев оценки иммунологической эффективности вакцинации и

в качестве суррогатных «конечных точек» в процессе создания вакцинных препаратов нового поколения [153, 273, 276].

Традиционно основным источником данных об иммунологических маркерах, ассоциированных с вакцинацией, служат исследования по иммуногенности вакцинных препаратов, проводимые на биомоделях. Однако существенные различия в строении и физиологии иммунной системы человека и животных, особенностях реагирования на антигенный раздражитель, зачастую отсутствие релевантной модели заболевания на животном, высокая, по сравнению с биомоделями, гетерогенность иммунного ответа в человеческой популяции не позволяют априорно экстраполировать данные, полученные в этих экспериментах, применительно к человеку. В свою очередь, исследование поствакцинального иммунитета у привитых людей рассматривается как современная и перспективная альтернатива исследованиям на биомоделях [225, 228, 294].

Большинство современных вакцин опосредуют свое протективное действие за счет индукции специфических антител. В связи с этим, поиск иммунологических показателей для них ограничивается оценкой гуморального звена иммунитета, для чего в мире наиболее широко применяются различные варианты иммуноферментного анализа. Ряд коррелятов протекции установлен для многих вакциноуправляемых инфекций: гриппа, кори, гепатитов А и В, пневмококковой инфекции и др. [273–276]. Однако для инфекционных заболеваний, протективный иммунный ответ при которых медиирован не только гуморальными, но и клеточными реакциями адаптивного ответа, проблема оценки качества поствакцинального иммунитета остается сложной задачей. Примером таких инфекций является чума, индукция протективного иммунитета против которой требует согласованного синергизма гуморального и клеточного звеньев иммунитета [100, 184, 261, 287, 347]. Специфическая профилактика чумы в РФ проводится посредством введения живой чумной вакцины на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (ЖЧВ), используемой для вакцинации людей по эпидемическим показаниям и у лиц, работающих с

патогенами 1–2-й групп патогенности, с 30-х годов XX столетия [31, 39, 50, 164, 166].

### **Степень разработанности темы**

На сегодняшний день характеристика поствакцинального иммунитета, индуцированного введением ЖЧВ, как и оценка иммунологической эффективности данной вакцины базируются, в основном, на исследовании иммунного ответа к двум наиболее известным иммуногенам чумного микроба: капсульному антигену F1 и антигену вирулентности LcrV [50, 55, 80, 187]. Многочисленные работы демонстрируют не только значимость указанных белков в индукции гуморального постинфекционного и поствакцинального противочумного иммунитета, но и их кросс-реактивный потенциал [4, 41, 81, 169, 187]. Установлено, что формирование клеточного иммунитета является критическим для протекции против данного заболевания, однако в ряде исследований была показана слабая вовлеченность как LcrV, так и F1 в генерацию реакций клеточного иммунного ответа у иммунизированных цельноклеточными противочумными живыми вакцинами людей и биомоделей [54, 81, 188, 190]. Эти данные подтверждают опасения, что иммунологические реакции с участием только этих антигенов не способны быть универсальными маркерами поствакцинального противочумного иммунитета.

В то же время роль других ключевых белков возбудителя в формировании поствакцинального иммунитета при вакцинации человека ЖЧВ изучалась выборочно, а полученные результаты не систематизированы. К ним относятся компоненты системы секреции третьего типа (ТЗСС), распространенной у грамотрицательных бактерий, – молекулярной машины для доставки эффекторных цитотоксических и противовоспалительных белков внутрь клеток-мишеней хозяина, и представитель семейства Omptin активатор плазминогена Pla [136, 304]. Известно, что выраженными антигенными свойствами обладают Pla, белки-эффекторы ТЗСС YopE и YopM, а также структурная субъединица инъектосомы YscF; в последние годы накоплены данные о протективности YopE и YscF на мышинной модели [148, 162, 193, 226, 333, 353] и Pla – на модели лабораторных

крыс [155]. Таким образом, данные белки в сочетании с современными вариантами иммуноанализа являются перспективными молекулярными мишенями в качестве основы для разработки новых методов диагностики и профилактики чумы, в том числе, совершенствования методов оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Однако их участие в формировании иммунитета, индуцированного ЖЧВ, исследовано мало или не изучалось вовсе.

Не менее важным аспектом является разработка методов иммуноанализа для оценки поствакцинального иммунного ответа, отличающихся высокой диагностической информативностью, прежде всего, специфичностью и чувствительностью. В настоящее время для детекции антикапсульных антител, как в области серодиагностики чумы, так и при оценке вакциноиндуцированного иммунного ответа, широко применяется твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) [64, 105, 169]. По показателям диагностической значимости, а также удобству применения ТИФА превосходит реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА), ранее рекомендованную Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) как метод серодиагностики чумы [115, 123, 233, 363]. Тем не менее, по литературным данным, серопревалентность к F1 у привитых ЖЧВ, оцениваемая в ТИФА в течение года после вакцинации или ревакцинации, может колебаться в пределах от 4 до 85 % [50], кроме того, нередко регистрируется наличие антител к F1 у наивных доноров [4, 54]. Повышение специфичности анализа может быть достигнуто применением вариантов ТИФА, таких как иммуоблоттинг, позволяющий визуализировать специфическое взаимодействие антигена и антитела на мембранном носителе [312].

Одной из основных проблем при разработке современных чумных вакцин считается относительно небольшая продолжительность специфического защитного иммунитета. На биомоделях показано, что протективный иммунитет при вакцинации ЖЧВ имеет длительность до 1 года [18, 39, 49, 166], однако исследования отдаленного иммунного ответа на вакцинацию ЖЧВ у людей ограничиваются единичными сообщениями [63, 77]. В связи с этим оценка как раннего, так и отдаленного специфического поствакцинального иммунитета,

вызываемого ЖЧВ, и определение таргетных иммуногенов – потенциальных маркеров его эффективности, является одной из приоритетных задач.

Важно отметить, что большинство исследований иммунного ответа к ЖЧВ, проведенных как на биомоделях, так и у людей, осуществлялось с применением белков, полученных путем химической экстракции. В этом случае, примеси в препаратах, например, липополисахарида (ЛПС), могут значительно изменять характеристики иммунного ответа макроорганизма, поскольку бактериальные ЛПС обладают собственными выраженными иммуномодулирующими свойствами [36], что особенно значимо при исследовании реакций клеточного иммунитета. Высокоочищенные рекомбинантные белки лишены данного недостатка и позволяют, при использовании в качестве сенситинов, определять гомологичный специфический ответ непосредственно к таргетным иммуногенам.

В последние годы было показано, что механизмы формирования противобактериальной иммунной защиты при вакцинации ЖЧВ включают клеточные реакции по Th1-, Th2- и Th17-пути [28, 33, 35, 52, 55, 57]. Однако вовлеченность конкретных иммуногенов чумного микроба в поляризацию иммунного ответа по тому или иному варианту не установлена.

В связи с вышеизложенным, исследование особенностей иммунного ответа у вакцинированных ЖЧВ людей с использованием расширенной панели сенситинов, включающей высокоочищенные рекомбинантные белки F1 и LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF, в целях определения наиболее специфичных маркеров поствакцинального гуморального и клеточного иммунитета, пригодных для разработки экспериментальных иммунотестов, представляется актуальным направлением исследований.

### **Цель исследования**

Анализ специфичности и длительности гуморального и клеточного поствакцинального иммунитета у доноров, вакцинированных живой чумной вакциной, с использованием панели рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF для определения иммунологических маркеров, перспективных для



оценки качества иммунного ответа на живую чумную вакцину в экспериментальных иммунотестах.

### **Задачи исследования**

1. Определить иммунореактивность сывороток вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров с использованием панели высокоочищенных рекомбинантных белков – F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF.

2. Оценить длительность циркуляции антиген-специфических антител у вакцинированных живой чумной вакциной доноров со сроком поствакцинального периода до и более 1 года.

3. Охарактеризовать функциональные показатели клеточных реакций (пролиферативный ответ и антиген-индуцированный профиль Th1/Th2/Th17 цитокинов) вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров в реакциях *in vitro* с панелью рекомбинантных белков – F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF.

4. Определить параметры антиген-специфического клеточного иммунного ответа, индуцированного живой чумной вакциной, в том числе у вакцинированных доноров со сроком поствакцинального периода до и более 1 года.

5. Разработать экспериментальные иммунотесты на основе методов твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга и панели рекомбинантных сенситинов, пригодных для выявления иммунных антител при оценке качества поствакцинального иммунитета, индуцированного живой чумной вакциной.

6. Определить диагностическую информативность экспериментальных иммунотестов на основе рекомбинантных сенситинов для оценки качества иммунного ответа, индуцированного живой чумной вакциной.

### **Научная новизна**

Впервые проведена комплексная характеристика иммунного ответа, исследована иммунореактивность сывороток, пролиферативная активность мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) и профили продуцируемых

ими цитокинов у людей, привитых ЖЧВ, с использованием панели высокоочищенных рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF.

Впервые в сыворотках крови вакцинированных ЖЧВ людей, помимо антител к капсульному антигену F1, выявлено наличие специфических иммуноглобулинов к линейным эпитопам структурообразующей единицы инъектосомы YscF и белку-эффектору T3SS YopE. Показано, что антитела, специфичные к F1 и YscF, определяются у вакцинированных доноров спустя, в среднем, 15 лет (в отдельных случаях – до 30 лет) после последней вакцинации ЖЧВ, а антитела к YopE не определяются спустя год после вакцинации.

Впервые у людей, вакцинированных ЖЧВ, установлено развитие специфического адаптивного иммунного ответа по смешанному Th1/Th2/Th17-типу. Впервые определена антигенная специфичность и длительность выявленных клеточных реакций: показано, что в индукцию Th1-цитокинов вовлечены F1, Pla, YopM, YopE и YscF, Th2-цитокинов – F1, LcrV и YscF, тогда как активатор плазминогена Pla участвует в Th-17-поляризации иммунного ответа. Впервые получены данные о длительной (от 2 до 30 лет, в среднем, 15 лет) циркуляции в периферической крови доноров, вакцинированных ЖЧВ, пула лимфоцитов, специфичных к указанным белкам.

Показаны перспективы применения выявленных гуморальных и клеточных маркеров для усовершенствования методов оценки качества поствакцинального иммунитета, индуцированного ЖЧВ, с использованием экспериментальных тестов на основе рекомбинантных сенситинов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В диссертационной работе представлены новые данные об особенностях иммунного ответа, индуцированного вакцинацией ЖЧВ у людей: определены таргетные иммуногены и дана характеристика иммунологических реакций с их участием. Показано, что специфичным для привитых ЖЧВ является обнаружение антител к капсульному антигену F1, линейным эпитопам YscF и белку-эффектору YopE, а также достоверное повышение уровня Th1/Th2/Th17-цитокинов при стимуляции МНК вакцинированных доноров панелью исследуемых белков.

Выявлены иммуногены, участвующие в раннем (до одного года) или отдаленном (2–30 лет) специфическом иммунном ответе на вакцинацию ЖЧВ.

Практическая значимость работы заключается в том, что обнаруженные специфические реакции вакциноиндуцированного иммунитета могут служить основой для выявления иммунологических маркеров оценки напряженности поствакцинального иммунитета у людей, вакцинированных ЖЧВ, в том числе, для разработки соответствующих коррелятов протекции. Разработаны экспериментальные иммунотесты для определения специфических антител, индуцированных ЖЧВ.

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы была основана на анализе литературных данных, связанных с исследованием особенностей постинфекционного и поствакцинального противочумного иммунитета, и современных методах его оценки у привитых биомоделей и людей. Для реализации поставленной цели были разработаны критерии включения в исследование, основанные на длительности поствакцинального периода у привитых ЖЧВ, определены этапы выполнения диссертационной работы, подобраны панель потенциальных маркеров поствакцинального иммунного ответа и методы исследования гуморального и клеточного иммунитета. Специальные методы исследования включали, прежде всего, современные иммунологические методы – различные вариации ТИФА, иммуноблоттинг и реакцию бластной трансформации лимфоцитов с применением в качестве сенситинов панели высокоочищенных рекомбинантных белков возбудителя. Также в работе были использованы социологические (интервьюирование и сбор данных у доноров) методы и широкий набор статистических методов с применением современного специализированного компьютерного программного обеспечения.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Гуморальный иммунный ответ привитых живой чумной вакциной доноров разнообразен и может проявляться как образованием специфических антител к нескольким иммуногенам чумного микроба одновременно, так и их отсутствием; при этом антитела, определяемые методами твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга, специфичны к F1 и линейным эпитопам YscF и YopE, но не таким антигенам вакцинного штамма как LcrV, YopM и Pla.

2. Длительность циркуляции антител различной антигенной специфичности у привитых живой чумной вакциной доноров неодинакова и колеблется от года после последней вакцинации (анти-YopE-антитела) до, в среднем, 15 лет после нее (антикапсульные антитела и антитела к линейным эпитопам YscF).

3. У привитых живой чумной вакциной реакции клеточного иммунитета носят долговременный характер (в среднем, 15 лет после последней иммунизации) и поляризованы по смешанному, Th1/Th2/Th17-типу; при этом в индукцию Th1-цитокинов вовлечены такие иммуногены как F1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Pla, YopM, YopE (IFN- $\gamma$ ) и YscF (TNF- $\alpha$ ), Th2-цитокинов – F1 (IL-4), LcrV и YscF (IL-10), Th-17 – Pla (IL-17A).

4. Разработанные экспериментальные тест-системы на основе рекомбинантных белков позволяют достоверно дифференцировать привитых живой чумной вакциной доноров с различной диагностической информативностью: оптимальными показателями специфичности и чувствительности (100 % и 100 %) обладает иммунотест на основе иммуноблоттинга с рекомбинантным YscF.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов определяется использованием в работе высокоочищенных рекомбинантных антигенов, исследованием достаточного количества опытных объектов (материал от 34 доноров, вакцинированных ЖЧВ), формированием группы контроля (17 здоровых, непривитых ЖЧВ доноров), применением современных иммунологических и релевантных статистических методов (непараметрическая статистика для малых

выборок) с последующим тщательным анализом полученных результатов в соотношении с современными литературными данными.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных, федеральных и региональных научных конференциях, в том числе:

- *на международных конференциях*: 5, 6, 7, 12-м Vaccine & ISV Конгрессе (Сиэтл, США, 2011; Шанхай, КНР, 2012; Сиджес, Барселона, Испания, 2013; Будапешт, Венгрия, 2018); 11, 12, 13-м Международном симпозиуме по иерсиниям (Суджоу, КНР, 2013; Тбилиси, Грузия, 2016; Антананариву, Мадагаскар, 2019); 5, 7, 8-м Конгрессе Федерации Европейских микробиологических обществ (FEMS) (Лейпциг, Германия, 2013; Валенсия, Испания, 2017; Глазго, Шотландия, 2019); 5-м Европейском конгрессе по иммунологии (ECI) (Амстердам, Нидерланды, 2018); FEMS online conference on Microbiology (2020); II Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (РККМИ) (Москва, 2024).

- *на конференциях федерального уровня*: III научно-практической конференции с международным участием «Инфекции, обусловленные иерсиниями» (Санкт-Петербург, 2011); II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); III международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012).

- *на конференциях регионального уровня*: Юбилейной итоговой 70-й научно-практической конференции ГОУ ВПО "Саратовский ГМУ Росздрава" «Молодые ученые – здравоохранению региона» (Саратов, 2009).

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Основные результаты исследования и разработанные методологические подходы внедрены в научно-исследовательскую работу кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России. Материалы диссертационного исследования внедрены в практику учебной работы ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского

Минздрава России и используются для обучения студентов, ординаторов, аспирантов, по дисциплине «инфекционные болезни», ординаторов и слушателей циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации по специальности «клиническая лабораторная диагностика».

### **Место выполнения работы и личный вклад соискателя**

Работа выполнялась на базе ФГБУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдельные эксперименты выполнялись на базе лицензированной научной бактериологической лаборатории ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», филиал в Саратове в рамках гранта РФФИ (проект № 18-016-00159 «Изучение молекулярных механизмов взаимодействия белков системы третьего типа секреции с иммунной системой млекопитающих, привитых живой модельной вакциной: биомаркеры патогена и хозяина», руководитель проекта – Федорова В.А., д.м.н., проф.). Выбор темы диссертационной работы, формулировка целей и задач, выбор методов исследования и оформление публикаций осуществлялись совместно с научными руководителями. Получение первичных данных, их систематизация и обобщение, а также анализ результатов и написание текста диссертационной работы выполнены автором лично.

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 25 работ, из них 3 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и/или индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus (Q1 и Q2).

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций,

списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 8 рисунками.

Указатель литературы включает 380 источников, из них 84 отечественных и 296 зарубежных.

## ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 – Методы оценки эффективности вакцинации

Вакцинация является наиболее эффективной профилактической мерой, когда-либо разработанной для борьбы с инфекционными заболеваниями. Осуществление программ вакцинопрофилактики в XX веке привело к искоренению натуральной оспы и позволило взять под контроль такие инфекции как полиомиелит, корь, краснуха, столбняк, дифтерия и гемофильная инфекция типа b [139]. По данным ВОЗ, количество смертей, предотвращаемое благодаря иммунизации, проводимой в детском возрасте, составляет около 2–3 млн ежегодно [126]. Согласно прогнозам, дальнейшее осуществление вакцинопрофилактики в мире в рамках Программы действий в области иммунизации на период до 2030 г. (ПДИ2030), утвержденной ВОЗ, может предотвратить более 50 млн смертей в период с 2021 по 2030 гг. [236].

Одним из вызовов современной вакцинологии является необходимость быстро и эффективно отвечать на возникновение вспышек новых и реэмерджентных инфекционных заболеваний. Яркими примерами являются вспышки SARS и MERS в 2002 и 2012 гг., соответственно, Эбола в 2014–2015 гг., Зика в 2015–2016 гг., и, наконец, – пандемия COVID-19, затронувшая всё человечество [280, 317]. Эти события потребовали немедленной мобилизации научного сообщества, мирового здравоохранения и фармацевтических компаний для разработки новых и совершенствования существующих вакцинных препаратов, а также определения оптимальной стратегии вакцинопрофилактики. Так, за первые два года пандемии COVID-19 в экстренном порядке было зарегистрировано не менее 7 вакцин против вируса SARS-CoV-2 от различных производителей [131]. Эффективность этих вакцин варьировала как на этапе клинических исследований, так и при широкомасштабном применении. Таким образом, опыт COVID-19 необычайно наглядно продемонстрировал



необходимость оценки эффективности вакцинации, отражающей качество поствакцинального иммунитета в популяции и у индивидуума [111, 177, 337].

Эффективность вакцинации – многопараметровый показатель протективного эффекта вакцины, который может быть измерен на различном уровне ввиду того, что вакцинация обеспечивает как прямую защиту населения, вакцинированного от инфекционного заболевания, так и косвенную – за счет снижения передачи возбудителя в популяции, что позволяет защитить и непривитых [222, 319]. Потенциальная эпидемиологическая эффективность (*vaccine efficacy*) рассчитывается как процент снижения числа случаев заболевания среди вакцинированных по отношению к невакцинированным. Этот показатель устанавливается на основе результатов двойного слепого рандомизированного контролируемого исследования (фаза III клинических испытаний), в котором половина участников получает вакцину, а другая половина – плацебо, и отражает максимальную эффективность вакцины в идеальных условиях. Фактическая эпидемиологическая эффективность (полевая эффективность, *vaccine effectiveness*) показывает способность вакцины снижать заболеваемость в реальных условиях при массовом применении уже лицензированного препарата. Ее оценка, чаще всего, осуществляется в ходе ретроспективного анализа, когда уровень заболеваемости среди привитых и непривитых лиц оценивается постфактум по данным медицинской документации [8, 160, 319, 361].

Показатели эпидемиологической эффективности характеризуют воздействие вакцинации на популяцию в целом. Однако факт иммунизации сам по себе не обязательно определяет развитие эффективного иммунного ответа у индивидуума. Множество факторов, среди которых: возраст, пол, социальные условия и окружающая среда, наличие коморбидной патологии, например, иммунодефицитов различного происхождения, а также индивидуальные генетические особенности иммунной системы оказывает влияние на формирование поствакцинального иммунитета [379]. Согласно литературным данным (Брико Н.И., Медуницын Н.В.), около 10 % иммунизированных не отвечают развитием детектируемых иммунных реакций в ответ на вакцинацию (нон-респондеры), а

выраженность иммунного ответа у оставшихся сильно варьирует [8, 45]. В связи с этим, особую значимость имеет оценка еще одного параметра – иммунологической эффективности вакцинации.

Иммунологическая эффективность вакцинации отражает способность вакцины вызывать формирование иммунитета у привитых и напрямую связана с иммуногенностью вакцины. Оценка данного критерия проводят по измерению специфических параметров, возникающих в ответ на вакцинацию [7, 8, 58]. Получаемые данные позволяют скорректировать стратегию иммунопрофилактики, например, определить необходимость бустерной иммунизации в группе лиц с низким уровнем ответа на первичную вакцинацию [45]. Следует отметить, что для ряда вакцин, например, против инфекций со спорадической заболеваемостью, оценка эпидемиологической эффективности, как потенциальной, так и фактической, представляет трудновыполнимую задачу. В этом случае исследование иммунологических реакций имеет приоритетное значение для установления эффективности вакцинации [178, 179].

Согласно базовому определению, биомаркер – это объективно измеряемый параметр, который можно оценивать как индикатор нормальных биологических процессов, патологических процессов или фармакологического ответа на терапевтическое вмешательство [107]. В продолжение, вакциноиндуцированные биомаркеры можно определить как показатели, достоверно различающиеся у вакцинированных и невакцинированных лиц и указывающие на специфические реакции, вызванные вакциной [282].

Для использования иммунологической активности вакцины как критерия ее протективного эффекта необходимо точно установить характер и уровень биомаркеров, определяющих защиту от заболевания. В отечественной научной литературе широко используется понятие «защитные титры антител» – уровень специфических иммуноглобулинов, обеспечивающий защиту против заражения и определяемый в регламентированном иммуноteste [7, 8, 58]. В зарубежных источниках для обозначения иммунного ответа, обеспечивающего защиту от инфекции, применяется термин «коррелят протекции» (correlate of protection, CoP)

– количественно выраженный иммунологический маркер, достоверно коррелирующий с уровнем защиты [177, 273, 275, 276]. Согласно классификации S. Plotkin, корреляты протекции могут быть механистическими (mechanistic correlate of protection – mCoP), то есть непосредственно обеспечивающими протективный ответ (например, нейтрализующие антитела к столбнячному анатоксину), и немеханистическими (nonmechanistic correlate of protection – nCoP), коррелирующими с уровнем защиты за счет частичного соучастия в протективном иммунитете или корреляции с mCoP [273]. Примером nCoP является определение уровня суммарных IgG к пневмококкам. Хотя суммарные антитела содержат механистический коррелят (считающийся подмножеством опсонофагоцитарных антител), их определение не измеряет механизм защиты напрямую. В вакцинопрофилактике CoPs играют множество ролей. Во-первых, отражая протективный механизм иммунитета, mCoP задает направление для разработки новых вакцинных препаратов, позволяя осуществить подбор антигенной композиции, адьювантов, доз и т. д. Во-вторых, достоверный CoP может служить суррогатной «конечной точкой», используемой вместо наступления клинического исхода при проведении клинических испытаний вакцин, значительно ускоряя процесс их валидации и лицензирования. Наконец, установленный CoP позволяет напрямую оценить уровень поствакцинального иммунитета и защищенности привитого, позволяя обосновывать дальнейшую тактику вакцинопрофилактики и другие врачебные и правительственные решения в сфере контроля за эпидемическим процессом [138, 153]. Таким образом, возможность прогнозирования эффективности вакцинации тесно связана с понятием коррелятов протекции, которые можно охарактеризовать различными типами иммунологических маркеров [282].

Первичная информация о вакциноиндуцированных маркерах традиционно поступает из изучения иммуногенности вакцин на биомоделях [111]. Несмотря на безусловную значимость таких исследований, их результаты не всегда могут быть априорно транслированы на иммунитет человека. Работы последних лет наглядно демонстрируют основные проблемы трансляционного подхода: отсутствие

релевантных животных моделей инфекционных заболеваний, эволюционно обусловленные различия строения и функционирования иммунных систем человека и животных, используемых в лабораторных целях, в том числе, разные пути активации врожденного иммунитета и индукции иммунологических маркеров. Разница в продолжительности жизни и длительности иммунного ответа, в связи с этим – невозможность исследования продолжительного иммунитета и отдаленных эффектов вакцинации. Поведенческие различия, в том числе, влияние стресса ограниченного пространства и повторяемых лабораторных манипуляций, вызывающих, например, гормональные изменения и вариации цитокинового микроокружения у биомоделей. Частые неудачи в демонстрации протективного эффекта иммуногена, полученного на одной биомодели или даже инбредной линии, воспроизвести на другой линии или другом виде лабораторного животного. Наконец, чрезвычайная вариативность иммунного ответа человека, зависящая как от генетических, так и от внешних факторов, не может быть полноценно воспроизведена на биомодели [225, 228, 294, 356, 380].

В связи с этим, в последние десятилетия поиск маркеров поствакцинального иммунного ответа активно происходит на таргетной модели – человеке. Важную роль здесь играют современные возможности иммунологии: развитие омиксных направлений, высокопропускных технологий, мультиплексных анализов, позволяющих анализировать множество аналитов в небольшом образце. Так, например, исследование транскрипционных профилей клеток крови позволило установить сигнатуры вакциноиндуцированного ответа у людей, иммунизированных вакцинами против желтой лихорадки, гриппа, менингококковой инфекции, малярии, лихорадки Денге и др. [295, 338]. Эти результаты демонстрируют актуальность и перспективность поиска иммунологических маркеров поствакцинального ответа у человека [295].

## **1.2 – Реакции адаптивного иммунного ответа как маркеры вакциноиндуцированного иммунитета**

С иммунологической точки зрения, в основе вакцинации лежат реакции адаптивного иммунитета, обеспечивающие защиту от инфицирования и/или развития заболевания при последующей встрече с возбудителем. Адаптивный иммунитет представлен гуморальным и клеточным звеном, реакции которых медируются В- и Т-лимфоцитами, соответственно. Таким образом, основными маркерами вакциноиндуцированного иммунитета являются эффекторы адаптивного иммунного ответа.

Протективный эффект вакцинации обусловлен формированием иммунологической памяти. Первичный адаптивный иммунный ответ развивается в течение нескольких недель после иммунизации. Его индукция начинается с активации лимфоцитов через распознавание иммунизирующего агента В- и Т-клеточными рецепторами лимфоцитов (В-cell receptor, BCR, и Т-cell receptor, TCR). При этом BCR распознает преимущественно конформационные эпитопы в составе цельного антигена, а TCR – короткие пептиды в составе комплекса с молекулами HLA I или II класса антиген-презентирующих клеток. Это взаимодействие обеспечивает антигенную специфичность адаптивного ответа. Получив дополнительные стимулы, активированные лимфоциты пролиферируют и дифференцируются, формируя пул короткоживущих эффекторных клеток, а также пул долгоживущих клеток памяти, несущих специфичность первичного контакта и характеристики, отобранные в ходе первичного ответа. Таким образом, при вторичной встрече с антигеном клетки памяти, получив специфический антигенный сигнал, обеспечивают гораздо более быстрый (обычно, менее 7 дней) и выраженный по магнитуде ответ, продуцируя и реализуя высокоэффективные эффекторы гуморального и клеточного иммунного ответа [322].

Эффекторами гуморального иммунитета являются патоген-специфические антитела. В процессе иммуногенеза В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, продуцирующие иммуноглобулины, которые циркулируют в крови и биологических жидкостях макроорганизма и специфически

связывают антигены возбудителя. Защитное действие антител осуществляется за счет нескольких механизмов. Антитела могут напрямую нейтрализовывать токсины или сам патоген, связываясь с поверхностными рецепторами возбудителя и блокируя его прикрепление к мембране клетки-мишени, предупреждая проникновение в клетку макроорганизма. Антитела также опсонизируют поверхность патогена, стимулируя фагоцитоз или антитело-зависимую цитотоксичность. Кроме того, антитела участвуют в индукции комплемент-зависимой цитотоксичности, связывая через Fc-рецептор компоненты системы комплемента [153, 322]. Таким образом, основная задача антител в вакциноиндуцированном иммунитете – предотвратить инфицирование или снизить микробную нагрузку во внеклеточном пространстве.

Определение антигенспецифических антител используется для оценки поствакцинального ответа на большинство современных вакцин. Уровни специфических антител измеряются с помощью стандартизированных серологических методов, количественных, таких как ТИФА, РПГА и т.д., и функциональных, например, реакции нейтрализации или ингибирования гемагглютинации [276]. Ряд коррелятов протекции, выраженных в пороговом защитном значении антител, установлен для многих вакциноуправляемых инфекций: гриппа, кори, гепатитов А и В, пневмококковой инфекции и др. [273–276]. Однако эффекторы гуморального адаптивного иммунитета не являются оптимальными маркерами эффективности вакцин, когда защита, индуцированная иммунизацией, опосредована клеточным иммунитетом.

В отличие от антител, клеточный иммунный ответ не блокирует само инфицирование, но осуществляет контроль и элиминацию возбудителя, ослабляя проявления болезни и развитие осложнений. Роль клеточного звена иммунитета в вакциноиндуцированном иммунитете охарактеризована недостаточно, что во многом обусловлено многообразием Т-лимфоцитов и их взаимосвязей с другими элементами иммунной системы. Т-лимфоциты опосредуют реакции клеточного звена иммунитета, осуществляя либо цитотоксические (CD8+), либо хелперные (CD4+) функции. Цитотоксические CD8+-лимфоциты (Т-киллеры) запускают

апоптотическую гибель клеток-мишеней, инфицированных внутриклеточными патогенами, используя разнообразный арсенал цитотоксических медиаторов и цитокинов [336]. CD4<sup>+</sup>-клеткам (Th-клетки, Т-хелперы) отводится центральная роль в функционировании нетворкинга иммунной системы. Они координируют экспансию и регуляцию Т-киллеров, содействуют В-клеточному ответу, обеспечивают рекрутирование и активацию компонентов врожденного иммунного ответа, а также супрессируют иммунные реакции. Выполнение столь разнообразных функций осуществляется за счет дифференциации CD4<sup>+</sup>-клеток в несколько популяций, продуцирующих различные профили цитокинов: Th1-, Th2-, Th17-, Т-регуляторные клетки (Foxp3<sup>+</sup>Treg), Т-фолликулярные хелперы (Tfh), Th22- и Th9-клетки. К основным эффекторным популяциям относятся Th1, Th2 и Th17, условия дифференцировки, спектр медиаторов межклеточного взаимодействия и биологические функции которых описаны достаточно глубоко. Так, Th1-клетки продуцируют ведущий эффекторный цитокин IFN- $\gamma$ , а также провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$  и TNF- $\beta$ , стимулирующие клеточные реакции врожденного и адаптивного иммунитета. В частности, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  активируют макрофаги и образование ими активных форм азота, способствующих киллингу внутриклеточных патогенов вирусной и бактериальной природы. Th2-лимфоциты активно содействуют развитию гуморального ответа, стимулируя пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов. Они продуцируют целый ряд интерлейкинов – IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13, среди которых IL-4 является важнейшим цитокином, контролирующим дифференцировку самих Th2-клеток. Th2-поляризованный иммунный ответ важен для борьбы с внеклеточными патогенами, включая гельминтов. Th17-лимфоциты участвуют в развитии иммунного ответа к внеклеточным патогенам и возбудителям грибковых инфекций, в том числе, мукозального. Их ключевые эффекторные цитокины включают IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22. Передача сигналов IL-17A и IL-17F происходит через общий рецептор, IL-17RA, широко распространенный в макроорганизме. IL-17 индуцирует синтез провоспалительных цитокинов, в том числе IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , а также провоспалительных хемокинов, обеспечивающих хемотаксис фагоцитирующих

клеток к очагам воспаления. Таким образом, Th17-клетки способствуют интенсификации Th1-ответа против ряда внутриклеточных бактерий. Доказана значимая роль Th17-ответа в развитии аутоиммунных реакций [336]. Цитокиновый ответ остается одним из главных функциональных маркеров клеточного ответа, позволяющий также определить хелперную направленность генерируемого вакцинацией иммунитета.

С точки зрения лабораторной диагностики, для оценки поствакцинального иммунного ответа ряд параметров эффекторных реакций адаптивного иммунитета требует детальной характеристики. Первым из них является тип индуцируемых вакцинацией иммунных реакций, который напрямую зависит от природы иммуногена. Так, полисахаридные вакцины вызывают короткоживущий T-независимый В-клеточный ответ, не формирующий иммунологической памяти. Адаптивный ответ на белковые антигены в составе конъюгированных, инактивированных и живых аттенуированных вакцин вовлекает антиген-специфические CD4<sup>+</sup> T<sub>fh</sub>-клетки, обеспечивая образование высоко-аффинных антител и долгоживущих клеток памяти. Живые вакцины, содержащие аттенуированные реплицирующиеся микроорганизмы, потенциально наиболее иммуногенны. Сигнальные молекулы PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) (липополисахариды, флаггелины, молекулы ДНК и РНК и т. д.) в их составе активируют врожденный иммунитет, что необходимо для развертывания наиболее эффективного адаптивного ответа. Кроме того, аттенуированные штаммы способны к ограниченной репликации и колонизации макроорганизма, обеспечивая продолжительный антигенный стимул для иммунной системы. Внутриклеточное размножение может индуцировать образование клонов специфических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, что характерно для некоторых аттенуированных и вирусных векторных вакцин [177, 322]. Протективный CD4<sup>+</sup>-ответ также ассоциирован в основном с живыми вакцинами. Общепринятой в настоящее время считается ведущая роль CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в поствакцинальном иммунитете, индуцированном БЦЖ, а также защите от реактивации вируса герпеса у привитых



против ветряной оспы, хотя достоверные иммунологические маркеры клеточного ответа, коррелирующие с защитой в том и другом случае, не установлены [280, 322]. В отличие от живых, неживые вакцины (инактивированные, субъединичные) в отсутствие репликации вызывают преимущественно гуморальный ответ, для усиления которого зачастую требуется использование адъювантов и бустерные иммунизации [280, 352].

Установление антигенной специфичности выявляемых реакций адаптивного иммунного ответа является следующим параметром, требующим уточнения. Этот этап особенно важен для дальнейшей разработки тестов, пригодных для оценки поствакцинального ответа в рутинной лабораторной диагностике. Идеальным сенситином является высокоиммуногенный белок, индуцирующий в результате вакцинации высокие титры антител у большинства вакцинированных. Выбор таргетного белка не представляет трудностей в случае иммунизации субъединичными вакцинами. Однако вакцинация мультивалентными вакцинными препаратами обычно инициирует иммунный ответ к нескольким иммунодоминантным антигенам, входящим в ее состав. Исследования сывороточных антител методом белкового микроэррея у доноров, привитых различными живыми и инактивированными бактериальными и вирусными вакцинами или иммунных в результате перенесенной инфекции, демонстрируют образование антител, специфичных к множеству (более десятка) антигенов возбудителя [246, 173, 157]. Однако в большинстве работ показано, что значительный процент иммунных сывороток перекрёстно реагирует с белками гетерологичных патогенов, вероятно, за счет структурного сходства белков, выполняющих схожие функции, наиболее выраженного между филогенетически близкими микроорганизмами. Необходимость дифференциации поствакцинального и постинфекционного ответа также требует внимания, в особенности на эндемичных территориях с высоким уровнем заболеваемости [315, 316].

Еще больший потенциал для индукции перекрестной реактивности присущ Т-клеточному ответу, ввиду распознавания в процессе иммуногенеза чрезвычайно коротких (8-12aa для МНС I и до 30aa для МНС II) пептидов, представленных в

комплексе с молекулами МНС. Индукция перекрестных Т-клеточных реакций неоднократно наблюдалась на экспериментальной мышинной модели [354]. Кросс-протективный эффект вакцин, ассоциированных с развитием защитного Т-клеточного иммунитета, был продемонстрирован и у людей: на примере вакцинации БЦЖ – против лепры [249], и вакцины против натуральной оспы – против оспы обезьян [243], что позволяет предположить значительную кросс-реактивность Т-клеточных протективных антигенов, входящих в состав данных вакцин. Вакцинация БЦЖ также является наглядным примером трудностей, связанных с выбором Т-клеточного антигена для дифференциации поствакцинальной реакции от случаев активного заболевания или латентной туберкулезной инфекции. Так, использование классического сенситина – туберкулина, представляющего собой очищенный протеиновый дериват инактивированной культуры *M. tuberculosis* [71, 247], в большинстве случаев не дает возможности дифференцировать реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЧЗТ), вызванную сенсбилизацией в результате вакцинации БЦЖ, от контакта с нетуберкулезными микобактериями или туберкулезной инфекции. Использование специфичных для вирулентных штаммов *M. tuberculosis* рекомбинатных белков CFP10 и ESAT6M, кодируемых утраченным *M. bovis* BCG и большинством нетуберкулезных микобактерий RD1 регионом генома, в качестве сенситина в *in vivo* и Т-клеточных *in vitro* тестах позволило с большей специфичностью разграничивать ответ на инфицирование от вакциноиндуцированных реакций клеточного иммунитета [135, 326]. Таким образом, выбор маркера поствакцинального иммунитета должен основываться на его высокой специфичности, чтобы отражать достоверные отличия вакциноиндуцированного ответа от иммунологических реакций непривитых доноров.

Наконец, важным параметром при оценке поствакцинального иммунного ответа является продолжительность его реакций. Длительность циркуляции специфических антител различна и во многом зависит от характеристик вызывающего его иммуногена. Так, полисахаридные бактериальные антигены

индуцируют образование короткоживущих плазматических клеток, продуцирующих антитела низкой и средней аффинности на протяжении нескольких месяцев после иммунизации, после чего плазматические клетки подвергаются апоптозу. Клеток памяти в этом случае не образуется. В отличие от полисахаридов, белковые антигены индуцируют Т-зависимый В-клеточный ответ, в результате которого в герминативных центрах лимфатических узлов при участии Т-лимфоцитов, помимо короткоживущих эффекторных клеток, образуются долгоживущие плазматические клетки и В-клетки памяти, способные длительно сохраняться в организме привитого [280, 322]. Поддержание уровня поствакцинальных антител в отсутствие антигенной стимуляции осуществляется плазматическими клетками [95], тогда как В-клетки памяти активируются только при повторной встрече с антигеном. Показано, что длительность гуморального ответа различается между разными белковыми иммуногенами. Например, время полужизни IgG, специфичных к столбнячному анатоксину, составляет ~11 лет, а к дифтерийному – ~19 лет [93]. К характеристикам белкового иммуногена, определяющим длительность циркуляции гомологичных антител, относятся как структурные особенности белка (например, способность к формированию макромолекулярных комплексов), так и функциональные (например, наличие иммуносупрессивных свойств) [325]. Вакцинация живыми вирусными вакцинами против таких инфекций как натуральная оспа, желтая лихорадка, корь, эпидемический паротит и краснуха индуцирует наиболее устойчивые уровни антител, определяемые на протяжении десятилетий после иммунизации [89, 93, 94]. Slifka M.K., Amanna I. показано, что длительность циркуляции сывороточных антител различается не только между различными возбудителями, но даже между отдельными антигенами одного возбудителя. Например, у больных ВИЧ-инфекцией наблюдается быстрое исчезновение антител к белкам вируса HIV gp120 и gp41, и гораздо более длительная циркуляция (более 10 лет) иммуноглобулинов, специфичных к белку p55 Gag [325]. Таким образом, маркеры короткоживущего и длительного гуморального иммунного ответа могут иметь различную антигенную специфичность.

В отличие от гуморального иммунитета, продолжительность жизни эффекторных Т-лимфоцитов кратковременна, и более 90 % Т-клеточных эффекторов погибают в результате апоптоза в течение нескольких дней после начала функционирования. Таким образом, эффективность Т-клеточных вакциноиндуцированных реакций полностью определяется Т-клетками памяти, основными характеристиками которых являются их количество, фенотип, локализация и продолжительность жизни. Количество Т-клеток памяти напрямую зависит от выраженности начальной Т-клеточной экспансии, главной детерминантой которой является уровень и продолжительность антигенной стимуляции во время прайминга. Эта зависимость также определяет значительные преимущества живых вакцин в генерации Т-клеточной памяти [322].

Характеристика Т-клеток памяти при вакциноиндуцированном ответе может быть основана на определении их фенотипа и связанных с ними функций. Центральные Т-клетки памяти (Т<sub>cm</sub>) фенотипически схожи с наивными лимфоцитами и обладают высоким пролиферативным потенциалом, но слабыми эффекторными возможностями. Курсируя между лимфатическими узлами и костным мозгом, Т<sub>cm</sub> распознают презентируемые дендритными клетками антигены и стремительно пролиферируют, порождая значительный пул эффекторных клеток. Эффекторные Т-клетки памяти (Т<sub>em</sub>) более близки по фенотипу к недавно активированным Т-клеткам и обладают высоким эффекторным потенциалом. Лишенные рецепторов хоминга к лимфатическим узлам, Т<sub>em</sub> циркулируют в крови, патрулируя нелимфоидные органы и ткани в поисках повторной встречи с антигеном [210]. Резидентные Т-клетки памяти (Т<sub>rm</sub>) локализуются в периферических органах в местах возможного проникновения патогена и играют значимую роль в мукозальном иммунитете [307].

Помимо фенотипа и числа Т-клеток памяти, качество Т-клеточного ответа обеспечивается продукцией разнообразных информационных молекул, цитокинов, факторов роста и хемоаттрактанов, способствующих киллингу патогена [311]. Цитокиновый ответ остается одним из главных функциональных маркеров

клеточного ответа, позволяющий также определить хелперную направленность генерируемого вакцинацией иммунитета.

На сегодняшний день данные о долговечности вакциноиндуцированной Т-клеточной памяти у человека ограничены. Потенциально, Т-клеточная память может сохраняться продолжительное время. Так, вакцинация против натуральной оспы вызывает образование пула антигенспецифических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, обнаруживаемых в периферической крови у привитых на протяжении десяти и более лет после вакцинации [94]. Аналогично, специфичные к вирусу желтой лихорадки CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты сохранялись в детектируемом количестве на протяжении 18 лет у вакцинированных после однократной иммунизации живой аттенуированной вакциной [89]. Учитывая, что индуцируемые вакцинацией антигенспецифические лимфоциты памяти распределяются неоднородно между кровью, лимфоидными органами и тканевыми резервуарами, вероятно, что продолжительность жизни Т-клеточной памяти может быть значительно больше при исследовании и других, помимо периферической крови, мест их локализации [118].

Резюмируя, оценка иммунологической эффективности вакцин производится путем исследования маркерных реакций адаптивного иммунитета, индуцируемого вакцинацией. Приоритетную значимость она приобретает для вакцин против инфекций, характеризующихся в настоящее время спорадической заболеваемостью. Уровень специфических антител широко используется для оценки поствакцинального протективного иммунитета, медиированного гуморальным иммунным ответом, тогда как оценка иммунного ответа против инфекционных заболеваний со смешанным или преимущественно клеточным иммунитетом затруднена.

### **1.3 – Особенности постинфекционного и поствакцинального адаптивного иммунитета против чумы и антигенная специфичность их реакций**

Среди вакцин, оценка иммунологической эффективности которых имеет приоритетное значение, особое место занимают вакцины против особо опасных инфекций (ООИ). В Российской Федерации, как и во всем мире, для специфической

профилактики ООИ используются, в основном, вакцины первого поколения на основе аттенуированных штаммов микроорганизмов, созданные в первой половине XX века с применением эмпирического подхода без четкого понимания патогенеза заболевания и механизмов протективного иммунитета [166]. В результате для большинства ООИ корреляты протекции, которые можно использовать как показатели эффективности вакцинации, не установлены. Этот факт является серьёзным препятствием для решения основных проблем в вакцинопрофилактике ООИ – создания современных безопасных вакцинных препаратов и разработки методов оценки поствакцинального иммунитета. Наглядным примером описанной ситуации является чума, для специфической профилактики которой в Российской Федерации на протяжении более чем 80 лет используется живая чумная вакцина на основе аттенуированного штамма EV НИИЭГ.

Чума – острая бактериальная инфекция, вызываемая грамотрицательной бактерией *Yersinia pestis*. Три исторические пандемии чумы совместно унесли жизни примерно 200 млн человек [258, 378], а также оставили неизгладимый след в культуре человечества, сделав слово «чума» нарицательным для обозначения масштабного, неотвратимого бедствия. В настоящее время, по данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется около 2000 случаев чумы [332], 97 % которых приходятся на страны Африки [378]. Хотя заболеваемость чумой в настоящее время имеет спорадический характер, за последние 20 лет крупные вспышки были зарегистрированы в Уганде, Китае, Демократической республике Конго и на Мадагаскаре [369], подтверждая статус «ре-эмерджентной» инфекции, присвоенный чуме в 2006 г. [92]. В 2014–2016 гг., после практически 30 лет эпидемического благополучия по данному заболеванию, три случая бубонной чумы были зафиксированы на территории Российской Федерации, на Горном Алтае [23, 74, 84].

Чума относится к первичным зоонозным природно-очаговым трансмиссивным инфекциям. Основным источником заражения человека служат дикие грызуны и зайцеобразные, однако, в целом, более 200 видов млекопитающих могут быть инфицированы возбудителем чумы в естественных условиях, включая

домашних животных, кошек и собак, и верблюдов [269, 378]. Различают три основные формы заболевания: бубонную, септическую и легочную. Наиболее распространенная форма чумы – бубонная, возникающая, в большинстве случаев, в результате укуса инфицированной блохи или контакта раневой поверхности с инфицированным материалом. В отсутствие антибиотикотерапии бубонная чума переходит в более тяжелую септическую форму, представляющую собой системную чумную инфекцию, характеризующуюся массивной бактериемией и поражением внутренних органов. Первичная септическая форма диагностируется при отсутствии первичных бубонов и обычно ассоциирована с высокой заражающей дозой, выраженной вирулентностью конкретного штамма или иммунокомпromетированным статусом заболевшего [250]. Легочная форма развивается вследствие гематогенного заноса возбудителя в легкие (вторично-легочная чума) или при вдыхании богатого бактериями аэрозоля (первично-легочная чума), образующегося при кашле больного человека или животного, и представляет собой стремительно прогрессирующее, фатальное заболевание, в отсутствие лечения приводящее к смерти пациента в течение нескольких дней. Легочная чума представляет чрезвычайную опасность в эпидемическом плане, поскольку легко передается напрямую от больного человека здоровому [250, 258, 305]. В отсутствие релевантного лечения смертность от бубонной формы чумы достигает 60 %, при септической и легочной формах – 100 % [258]. Хотя бубонная чума поддается антибиотикотерапии (уровень смертности снижается до 5–10 %), от 25 до 50 % случаев легочной чумы летальны даже при своевременно начатом (24 часа от манифестации) лечении [309, 378]. Большую настороженность вызывают сообщения о появлении антибиотикорезистентных штаммов, в том числе, с множественной лекарственной устойчивостью [240, 242, 260], а также возможность применения природных или генно-модифицированных штаммов возбудителя чумы в качестве биологического оружия [108, 263]. Совместно, эти данные подтверждают существующую необходимость в наличии эффективных средств специфической профилактики заболевания, индуцирующих стойкий и продолжительный противочумный иммунитет.

Процесс иммуногенеза при чуме чрезвычайно сложен и до конца не исследован. Его особенностями является активное подавление микроорганизмом механизмов врожденного и адаптивного иммунитета хозяина. Первичной мишенью чумного микроба являются реакции врожденного иммунитета, для ингибирования и ускользания от которых он реализует несколько стратегий. Температурозависимая модификация компонентов ЛПС блокирует распознавание патогена TLR4 и индукцию противовоспалительного ответа [34, 235]. Устойчивость к механизмам внутриклеточного киллинга позволяет чумным бактериям успешно выживать и реплицироваться в наивных макрофагах, укрываясь от фагоцитирующих нейтрофилов и системы комплемента, блокируя антигенную презентацию и накапливая антигостальные и антифагоцитарные факторы [106, 127]. Нейтрофилы обладают большей, чем макрофаги, способностью к элиминации чумных бактерий на начальных стадиях инфекции [254, 374]. Однако часть из них становится неспособной к киллингу возбудителя, и, более того, индуцирует синтез сигнальных молекул фосфатидилсерина на клеточных мембранах, инициируя процесс поглощения макрофагами и дальнейшее «бесшумное» распространение по лимфатической системе макроорганизма [375]. На сегодняшний день имеются данные, что практически все типы клеток врожденного иммунитета могут быть инфицированы чумными бактериями.

Последующему фагоцитозу бактерий, переживших внутриклеточную стадию жизненного цикла, препятствуют разнообразные антифагоцитарные факторы патогена. Основным антигостальным механизмом чумного микроба является T3SS, цитотоксические белки-эффекторы которой патоген инъецирует преимущественно в фагоциты врожденного иммунитета: дендритные клетки, макрофаги и нейтрофилы [264]. Белки-эффекторы T3SS нарушают работу клеточного цитоскелета, подавляя фагоцитоз и презентацию антигенов лимфоцитам [146], и ингибируют множество провоспалительных сигнальных путей врожденного иммунитета [308]. В свою очередь, капсула, представленная макромолекулярным белковым комплексом, защищает бактерии от фагоцитоза, экранируя антигены, ассоциированные с адгезией к фагоцитам [65, 147, 351]. Устойчивость к



комплемент-зависимому лизису также относится к механизмам противодействия чумного микроба иммунной системе макроорганизма [127, 344]. Таким образом, избегание и подавление механизмов врожденного иммунитета при чуме обеспечивает отсутствие выраженного воспалительного сигнала, что, с одной стороны, позволяет возбудителю стремительно распространиться по организму, а с другой – снизить эффективность индукции адаптивного иммунного ответа.

Фагоцитоз, по-видимому, является центральным событием реакций протективного иммунитета при чуме [49, 279]. Недавние исследования демонстрируют, что специфическое усиление активности нейтрофилов и макрофагов в самом начале заболевания может контролировать инфекционный процесс, вызываемый *Y. pestis*. Так, на мышинной модели легочной чумы активное рекрутирование нейтрофилов, индуцированное искусственным введением хемоаттрактанов, улучшало выживаемость зараженных животных [128]. Адоптивный перенос поляризованных по M1-типу макрофагов, усиленно продуцирующих провоспалительные цитокины и обладающих повышенной бактерицидной активностью и устойчивостью к патоген-индуцированному апоптозу, также повышала выживаемость мышей на модели бубонной формы инфекции [152]. В связи с этим, реакции адаптивного иммунитета, амплифицирующие фагоцитоз, представляются наиболее эффективным иммунным механизмом протекции против развития заболевания. Тем не менее, чумные бактерии способны размножаться не только в наивных, но и в активированных макрофагах, как было показано *in vitro* на модели инфицирования культуры макрофагов костного мозга с последующим внесением в среду IFN- $\gamma$  (пост-активация). Данный цитокин *in vivo* секретируется активированными Т-лимфоцитами и НК-клетками и регулирует выработку фагоцитами активных бактерицидных соединений азота. Выживание бактерий внутри макрофагов, ассоциированное с геном *ripA*, расположенным в *pgm*-области бактериальной хромосомы, сопровождалось снижением уровня оксида азота (NO) [292]. В то же время, пред-активированные воздействием IFN- $\gamma$  и/или TNF- $\alpha$  макрофаги значительно ограничивали внутриклеточное содержание живых бактерий в ранние

сроки после инфицирования клеточной линии. Активация с использованием комбинации обоих цитокинов была наиболее успешной в редукции внутриклеточной репликации патогена [254].

Механизмы адаптивного постинфекционного иммунного ответа достаточно сложны, поскольку инфекция вызывает индукцию выраженных реакций как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Более того, оба звена адаптивного иммунитета играют значимую роль в протекции против чумы и действуют синергически для достижения оптимальной защиты, что наглядно показано на модели вакциноиндуцированного иммунитета [328].

### **1.3.1 – Гуморальный противочумный иммунитет**

Введение иммунных сывороток от переболевших чумой или иммунизированных животных обеспечивает защиту некоторых видов лабораторных животных от последующего заражения [120, 340]. Протективная роль антител была показана в конце XIX века в опытах по созданию лечебных сывороток против чумы. Ряд успешных экспериментов был проведен первооткрывателем чумного микроба, А. Йерсенем, положившим начало серотерапии чумы. Однако последующие опыты по лечению больных иммунными сыворотками были малоэффективны. В целом, большинство исследователей отмечали, что обработка антисыворотками давала положительный эффект при бубонной, но не системной или легочной форме инфекции [99]. Для оценки потенциальной активности антисывороток был разработан метод, впоследствии применяемый для суррогатной оценки эффективности защитных антител, индуцируемых иммунизацией. Эффективность специфических антител оценивалась по способности сыворотки иммунизированных биомоделей или человека защищать мышей от заражения высоковирулентным штаммом *Y. pestis*. Сыворотка вводилась внутривенно группе не менее чем из 10 мышей (по 0,5 мл неразведенной или разведенной 1:2 сыворотки на мышь), после чего животным немедленно инокулировали 100 MLD (minimal lethal dose) вирулентного штамма подкожно и наблюдали в течение 14 дней. Мышиный протективный индекс (МПИ) выражался как соотношение между процентом павших животных и средней

продолжительностью их жизни после заражения [230]. Значения МПИ  $\leq 10$  рассматривались как показатель протекции, при этом МПИ  $\leq 5$  наблюдались при исследовании сывороток, полученных от людей, перенесших инфекцию [229, 266].

Попытки установить антигенную специфичность чумных антисывороток показали, что значительная доля антител была направлена к «оболочечному» антигену чумного микроба [279]. Капсула чумного микроба представляет собой полимерную структуру, достигающую в размерах несколько мегадальтон и способную диффундировать в окружающую среду [10, 355]. Антиген, образующий капсулу, был выделен в 1952 г. [125, 330]. Белок F1 – структурная единица капсулы – кодируется геном *caf1*, расположенным на видоспецифической плазмиде чумного микроба pFra/pMT1 [14], и максимально экспрессируется при температуре 37°C. Однако небольшое количество антигена обнаруживается и при меньших температурах (примерно от 28°C) [32, 330]. Капсульный антиген F1 играет многообразные роли в патогенезе чумы у млекопитающих, основной его функцией считается устойчивость к фагоцитозу [147]. Тем не менее, было установлено, что наличие капсулы не обязательно для проявления вирулентности чумного микроба, поскольку F1<sup>-</sup>-штаммы способны вызывать развитие полноценной летальной инфекции у некоторых видов восприимчивых животных и человека [255, 302]. Несмотря на это, F1 является одним из доминантных иммуногенов *Y. pestis*. Антитела к капсульному антигену обнаруживаются у диких животных на эндемичных территориях [102, 313, 314], у иммунизированных живыми аттенуированными и инактивированными F1<sup>+</sup>-штаммами чумных бактерий биомоделей и людей [132, 188, 219, 266, 371], у лабораторных и диких животных при экспериментальном заражении [19, 130, 155, 193, 194, 233, 278], а также у людей, перенесших чумную инфекцию [101, 134, 169, 189, 227, 272, 277, 312, 321, 331]. Эти *in vivo* данные свидетельствуют о значимой роли F1 в формировании гуморального иммунного ответа при чуме. Учитывая иммуногенность и высокую специфичность капсульного антигена, детекция антител к нему является основой лабораторных тестов для серодиагностики чумы, ретроспективных эпидемиологических и эпизоотологических исследований [44, 105, 144, 169, 256, 318, 349]. В свою

очередь, обнаружение F1-антигена с применением иммунотестов на основе анти-F1-антител является вспомогательным методом индикации возбудителя в клиническом и патологоанатомическом материале, в тканях животных, эктопаразитов и в объектах окружающей среды [44, 362].

Постинфекционные антитела к капсульному антигену обнаруживаются у пациентов к 5–7 суткам заболевания. Титры достигают максимума примерно к 15–30 дню после манифестации клинических симптомов и затем снижаются до неопределяемых в течение нескольких месяцев или лет, однако могут сохраняться на детектируемом уровне на протяжении более десяти лет у отдельных индивидуумов [101, 116, 169, 190, 320]. Описана выраженная вариативность постинфекционного антительного ответа к F1. По наблюдениям Rasoamanana B. et al. и McCrumb Jr.F.R. et al., до 20 % пациентов с бактериологически подтвержденным диагнозом не отвечали образованием детектируемых уровней антикапсульных антител в ранний реконвалесцентный период [169, 331]. Среди серопозитивных реконвалесцентов вариативность гуморального ответа проявлялась в формировании групп с высокими (82 %) и низкими (18 %) титрами антител к F1 [169]. При исследовании отдаленного ответа, по данным Andrianaivoarimanana V. et al., в среднем через 2,5 года после перенесенной инфекции антитела к F1 регистрировались менее чем у половины переболевших, при этом соотношение доноров с высоким и низким уровнем антител составляло 60 % и 40 %, соответственно [320]. Напротив, в исследовании Li B. et al., серопозитивными к F1 были 88 % пациентов, перенесших заболевание 1–5 лет назад, а у 69,5 % антитела к капсульному антигену регистрировались через 10–16 лет после перенесенной инфекции [190]. Разнообразие антительного ответа к F1 связано, по-видимому, с индивидуальными особенностями пациентов, поскольку различия не были ассоциированы с полом или возрастом переболевших [169, 190, 321].

Несмотря на видоспецифичность капсульного антигена, серореактивность к F1 была обнаружена в РПГА у небольшого числа наивных доноров, не проживающих на эндемичных по чуме территориях при использовании в качестве сенситина химически очищенного препарата [4]. Коссе Л.В. с соавт. при изучении

капсульного антигена чумного микроба, выделенного по Baker E. et al., был идентифицирован иммунореактивный компонент с молекулярной массой 17 кДа, реагирующий с поликлональными и моноклональными антикапсульными антителами. Аналогичный компонент, полученный тем же способом из других видов сем. *Enterobacteriaceae*, взаимодействовал с серодиагностикумами, направленными на детекцию специфического для *Y. pestis* F1 [10, 41]. Кроме того, ложноположительные ответы были зарегистрированы в ТИФА с рекомбинантным F1 в качестве сенситина при тестировании сывороток от больных, инфицированных такими патогенами как *M. tuberculosis*, *Schistosoma haematobium*, *Salmonella typhi* и *Salmonella paratyphi* [169]. Представленные данные свидетельствуют о возможности кросс-реакций F1 с белками гетерологичных возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных.

Опыты по иммунизации лабораторных мышей и крыс химически очищенным и рекомбинантным капсульным антигеном показали, что F1 индуцирует высокие титры специфических антител, обеспечивающих выраженный протективный иммунитет против бубонной и, в меньшей мере, легочной формы инфекции при заражении инкапсулированными штаммами чумных бактерий, а пассивная иммунизация поликлональными и моноклональными анти-F1-антителами защищает наивных мышей от последующего заражения [154, 172, 192, 233, 288, 323, 363, 371]. Однако иммуногенность F1 и эффективность иммунизации была вариабельной для морских свинок и разных видов нечеловекообразных обезьян [61, 195, 233, 268]. Выраженная корреляция между титрами антикапсульных антител, определяемых количественными серологическими методами (РПГА, реакция связывания комплимента – РСК), и уровнем протекции была получена при иммунизации крыс и мышей [233, 363]. Так, на модели лабораторных крыс, иммунизированных аттенуированным штаммом *Y. pestis* EV76 (51f), убитой вакциной USP или капсульным антигеном, было показано, что титры антикапсульных антител  $> 1:512$ , определяемые в РПГА, коррелировали с защитой более, чем 90 % животных при подкожном и интраназальном заражении. В то же время на некоторых видах нечеловекообразных приматов было

продемонстрировано отсутствие зависимости уровня защиты против чумы от гуморального ответа к F1: при экспериментальном заражении некоторые вакцинированные животные заболели при наличии детектируемых уровней антикапсульных антител или, наоборот, проявляли резистентность к инфекции при их отсутствии [363]. Тем не менее определение титров антител к F1 было предложено в качестве критерия оценки эффективности гуморального противочумного иммунитета, формируемого в ответ на введение вакцинных препаратов. Однако на сегодняшний день «защитные титры» антикапсульных антител так и не установлены.

Дальнейшее изучение и оценка антигенной специфичности гуморального постинфекционного ответа показало образование антител к ряду компонентов T3SS [74, 101, 102, 227, 291], кодируемой родоспецифической плазмидой вирулентности pCad/pCD1, общей для чумного микроба и двух других патогенных для человека видов иерсиний, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* [258]. Основа T3SS представляет собой «инжектосому» – иглоподобную структуру, приспособленную для транслокации эффекторных белков в цитоплазму клеток иммунной системы макроорганизма. Активация T3SS у иерсиний термозависима и происходит при температуре тела млекопитающих (37°C) и контакте с таргетными клетками хозяина. T3SS чумного микроба представлена аппаратом секреции (в том числе, белками YscF, YopB, YopD и LcrV), системой шаперонов Syc, регуляторными белками и самими белками-эффекторами, YopE, YopM, YpkA, YopJ, YopT и YopH [271].

Среди белков T3SS антительный ответ к «антигену вирулентности» LcrV (V-антигену) документирован наиболее часто. LcrV – мультифункциональный белок, локализующийся на вершине инжектосомы [341] и участвующий в транслокации в таргетные клетки макроорганизма Yops-эффекторов, реализующих множество антигостальных функций. Установлено, что LcrV обладает собственными иммуносупрессивными свойствами, стимулируя клетки иммунной системы к индукции регуляторного интерлейкина IL-10, медирующего снижение синтеза провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  [114]. В отличие от F1, экспрессия

LcrV абсолютно необходима для осуществления вирулентности чумного микроба [258].

Постинфекционные антитела к LcrV обнаруживаются у чумных реконвалесцентов и лабораторных животных после экспериментального заражения [19, 101, 193, 291], а также у диких животных в эндемичных регионах [102]. Однако серопревалентность к LcrV и титры гомологичных постинфекционных антител обычно ниже, чем к F1 [19, 101, 193, 291]. Динамика выявляемого гуморального ответа к LcrV также неоднозначна. Так, в исследовании Li B. et al. постинфекционные титры анти-LcrV-антител обнаруживались у 2 из 7 реконвалесцентов и нарастали до 60-го дня с момента заболевания, после чего в течение 30 дней снижались до недетектируемого уровня [291]. В работе Del Prete G. et al. тестирование сывороток 20 перенесших инфекцию доноров в сроки 20 дней – 11 лет после подтверждения диагноза показало отсутствие антител, специфичных к LcrV [272]. Изучив динамику индуцированных иммунизацией инбредных мышей аттенуированным штаммом EV76 сывороточных антител, Braciale V.L. et al. предположили, что анти-LcrV-антитела имеют тенденцию к выходу из циркуляции в течение довольно короткого периода после запуска иммунного ответа [137]. Однако в другой работе Li B. et al. было продемонстрировано длительное сохранение сывороточных антител, специфичных к LcrV, у реконвалесцентов, перенесших заболевание чумой за десять и более лет до исследования [190]. Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что постинфекционный антительный ответ к LcrV менее выражен, чем к F1, и достаточно вариативен.

Напротив, иммунизация биомоделей препаратами LcrV вызывает образование высоких титров гомологичных антител, индуцируя защиту от экспериментальной бубонной и легочной чумы при заражении как инкапсулированными, так и бескапсульными штаммами. Показано, что иммуногенные и протективные свойства LcrV превосходят аналогичные характеристики капсульного антигена [91, 195, 214, 238, 268, 299, 371]. Как и в случае с F1, выраженный протективный иммунитет может быть получен путем пассивной иммунизации антисыворотками, поликлональными и моноклональными

антителами к LcrV [195, 237, 268, 301]. Тем не менее, титры/концентрация анти-LcrV-антител не всегда коррелируют с уровнем индуцируемой защиты [145]. В связи с этим был предложен ряд тестов для оценки функциональной активности защитных анти-LcrV-антител. Первый основан на конкурентном ТИФА, где сывороточные антитела конкурируют с протективным моноклональным анти-LcrV-антителом за связывание с сенситином [187]. Второй основан на способности специфических протективных анти-LcrV-антител, содержащихся в иммунных сыворотках, ингибировать T3SS-опосредованную цитотоксичность к клеткам иммунной системы макроорганизма. Цитотоксический эффект оценивается в макрофагальных клеточных линиях по индукции маркеров апоптоза (активность каспазы-3) или анализу жизнеспособности клеток с использованием флюоресцентных красителей. Показана предсказательная способность данного суррогатного теста как предиктора протективного иммунитета у мышей и нечеловекообразных обезьян [145]. Недавно тест на основе определения уровня защиты макрофагов от лизиса антителами к LcrV, содержащимися в иммунных сыворотках, был успешно применен в клинических исследованиях вакцины на основе слитного белка F1-LcrV, дополненной флагеллином. В этом исследовании обратные уровни каспазы-3, использованные для измерения протективного эффекта анти-LcrV-антител, достоверно повышались на 14-й и 28-й день после бустерной вакцинации добровольцев, соответственно [170]. Однако, несмотря на перспективы их использования, предложенные тесты пока не получили широкого распространения.

Специфичность гуморального постинфекционного ответа к другим антигенам чумного микроба менее исследована. Сыворотки реконвалесцентов, а также вакцинированных чумной вакциной людей, лабораторных мышей и кроликов, иммунизированных живыми авирулентными иерсиниями, реагировали с продуктами плазмиды вирулентности в иммуноблоте [227, 234]. Дальнейшие исследования на мышьях-реконвалесцентах показали наиболее выраженный антительный ответ к белкам-эффекторам T3SS YopN и YopM, а также белку YopD, участвующему в формировании порообразующего комплекса инъектосомы [193].



Методами белкового эррея и ТИФА показано, что у перенесших инфекцию людей наиболее часто регистрировались антитела к YopD, YopE, YopM, YopN и YscF, однако только для YopD на сегодняшний день была зарегистрирована длительная циркуляция гомологичных постинфекционных антител [101, 190, 248]. Белок YopN – тирозинфосфатаза, которая ингибирует активацию T- и, опосредованно, В-лимфоцитов, за счет дефосфорилирования цитоплазматических тирозинкиназ, участвующих в преобразовании сигнала от TCR [213, 259]. YopE – бактериальный антифагоцитарный цитотоксин. Имитируя GTPаза-активирующие белки, он снижает продукцию хозяйских малых гуанозинтрифосфат гидролаз Rho GTPаз, что приводит к изменению и разрушению структуры клетки («округление»), нарушению захвата фагоцитами бактерий и нормальной продукции цитокинов [308]. Белок YopM связывает каспазу-1, предотвращая сборку и активацию инфламассомы, а также модулирует синтез IL-10 на уровне мРНК в ядре [308]. Кроме того, YopM также способен запускать некроз хозяйской клетки за счет наличия убиквитин-лигазной активности [343]. Наконец, YopM+ чумные бактерии вызывают системное истощение натуральных киллеров на мышинной модели, возможно, за счет снижения синтеза IL-15 инфицированными клетками [203]. Белок YscF представляет собой структурообразующую единицу инъектосомы иерсиний с молекулярной массой мономерной формы ~ 6–10 kDa. За счет способности к полимеризации YscF формирует полую иглу, проходящую через внутреннюю и внешнюю мембраны бактерии [333]. Также YscF принимает участие в регуляции секреции Yops [348] и обладает некоторой иммуномодулирующей активностью к TLR2/4 *in vitro* [350]. Большинство из перечисленных антигенов системы T3SS чумного микроба, антитела к которым обнаруживаются у переболевших людей и животных, обладают выраженной иммуногенностью при активной иммунизации биомоделей [162, 289, 367]. Однако способность вызывать протективный иммунитет была показана только для некоторых из них. Частичная защита от подкожного заражения была продемонстрирована при иммунизации лабораторных мышей белками YscF [226, 303, 333], YopD [290, 352] и YopE [162,

300, 352, 353]. Тем не менее, уровень протекции, индуцируемый данными антигенами, уступает аналогичным характеристикам F1 и LcrV.

Помимо антител, специфичных к F1 и белкам T3SS, у переболевших людей, лабораторных и чувствительных диких животных обнаруживаются антитела к поверхностной протеазе чумного микроба Pla [19, 102, 148, 155, 194]. Продукция Pla кодируется видоспецифической плазмидой pPst/pPCP1 и наблюдается при широком диапазоне температур, однако температурный шифт имеет значение для проявления различных биологических активностей белка [310]. Установлена критическая роль Pla в патогенезе бубонной и первично-легочной, но не септической формы чумы [304, 212]. Биологические функции Pla разнообразны. Широко известны его коагулазная и фибринолитическая активность, обеспечивающие деградацию экстрацеллюлярного матрикса и диссеминацию патогена в макроорганизме [310]. Pla-медиированный протеолиз строго ассоциирован с R-формой ЛПС, характерной для чумного микроба [208]. Биологическая активность Pla оказывает непосредственное влияние на иммуногенез при чуме. В частности, показано, что Pla осуществляет посттрансляционный протеолиз Yops при выращивании бактерий *in vitro*, что *in vivo* может играть роль в ограничении иммунного ответа макроорганизма на чужеродные белки внешней мембраны иерсиний при их попадании в межклеточное пространство [156, 235]. Кроме того, Pla расщепляет белки хозяина, непосредственно вовлеченные в иммунный ответ: C3 и C4b компоненты системы комплемента, пероксидазу PrdX6 и Fas-лиганд на поверхности лимфоцитов, участвующий в запуске апоптоза [310]. Недавние исследования Smiley S.T. et al. показывают, что Pla также участвует в подавлении фибрин-зависимой медиированной CD8+-клетками защиты от интраназального заражения вирулентным штаммом чумного микроба на мышинной модели, однако механизмы данного феномена не установлены [373]. Pla считается видоспецифическим антигеном чумного микроба, а его температурно-независимая экспрессия позволяет рассматривать активатор плазминогена как перспективный диагностический маркер *Y. pestis* [159, 161, 221]. Тем не менее, данные об индикации гена *pla* в

геноме ряда неродственных энтеропатогенных бактерий [339], а также структурное сходство белка с другими представителями семейства поверхностных протеаз Omp<sub>tin</sub>, широко распространенного среди грамотрицательных бактерий [206], демонстрирует возможность кросс-реактивных Pla-специфичных серологических реакций. Так, например, в работе по оценке гуморального ответа у привитых живой аттенуированной противочумной вакциной антитела к Pla чумного микроба обнаруживались у наивных доноров [137].

Pla проявляет иммуногенные свойства при активной иммунизации биомоделей, однако данные о его протективности на мышинной модели противоречивы [60, 193]. В то же время, иммунизация рекомбинантным белком крыс обеспечивала частичную (60 %) защиту против легочной чумы при заражении бескапсульным вариантом чумного микроба [155].

Антитела к ряду других антигенов чумного микроба образуются после перенесенной инфекции у человека и животных [19, 190, 291]. Среди них поверхностно расположенные на мембране бактерии белки рН6, OmpA, Ail и множество не охарактеризованных белков *Y. pestis*. Таким образом, данные литературы свидетельствуют об индукции выраженного постинфекционного гуморального ответа, специфичного к различным белкам, составляющим сложную антигенную структуру чумного микроба.

### **1.3.2 – Клеточные реакции адаптивного противочумного иммунитета**

Мнение о том, что клеточные реакции адаптивного иммунитета играют важную роль в протекции против чумы, было сформировано еще в середине XX века [200, 279]. Тем не менее, роль адаптивного клеточного иммунитета была мало изучена, во многом, ввиду первоначального успеха исследований антитело-опосредованной защиты и методологических трудностей, присущих исследованиям клеточных реакций. При этом лишь ограниченное число работ посвящено постинфекционному клеточному ответу при чуме. При оценке отдаленного постинфекционного иммунитета методом ELISpot у пациентов, перенесших чуму за 4–6 лет до исследования, не было обнаружено Т-клеточного ответа к главным иммуногенам чумного микроба, F1 и LcrV [190], хотя Т-

клеточные эпитопы описаны для обоих антигенов [113, 204, 241, 376]. В другой работе лимфоциты 7 из 11 пациентов, перенесших чуму за 2–20 месяцев до начала исследования, отвечали умеренной пролиферацией в реакции бластной трансформации лимфоцитов в ответ на ре-стимуляцию рекомбинантными белками F1, LcrV или слитным белком F1-LcrV, что свидетельствовало о формировании Т-клеток памяти, циркулирующих в периферической крови; при этом ответ на LcrV был менее выражен, чем на капсульный антиген. Лишь 1 из 6 доноров демонстрировал сохранение слабовыраженных Т-клеточных реакций, специфичных к F1, но не к LcrV, спустя более двух лет после контакта с возбудителем чумы. Эти данные позволили авторам предположить, что перенесенная инфекция обуславливает формирование лишь короткоживущих Т-клеток памяти у некоторого числа реконвалесцентов, а LcrV является менее сильным Т-клеточным иммуногеном, чем F1 [272].

Гораздо больше информации было получено в работах по изучению и анализу клеточного иммунного ответа на иммунизацию убитыми и живыми аттенуированными штаммами *Y. pestis*, а также по созданию защитного иммунитета путем трансфера праймированных патоген-специфичных иммунных клеток. Одними из первых данные в пользу клеточного противочумного иммунитета получили J. Wong и S. Elberg. Культивируя спленоциты иммунных мышей в присутствии убитых бактерий *Y. pestis*, они обнаружили, что собранный супернатант предохраняет наивные фагоциты от цитолиза в результате воздействия живых вирулентных микробов [366]. На сегодняшний день показано, что предобработка фагоцитов *in vitro* провоспалительными цитокинами IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , *in vivo* генерируемыми клетками адаптивного иммунитета, значительно ограничивает внутриклеточное размножение чумного микроба [254], а их парентеральное введение обеспечивает некоторый уровень защиты наивным мышам от внутривенного заражения [244]. Wake A. et al., исследуя механизмы короткоживущего и длительного иммунитета против чумы, продемонстрировали, что иммунизация несущими плазмиду вирулентности бактериями *Y. pseudotuberculosis* индуцирует некоторый клеточный ответ, ассоциированный с

возросшей устойчивостью против заражения *Y. pestis* [359]. В другом исследовании мыши в ответ на иммунизацию убитыми бактериями *Y. pestis* демонстрировали выраженную реакцию замедленной гиперчувствительности, хотя корреляции между уровнем ГЧЗТ и протекцией животных выявлено не было [191].

Убедительные данные в пользу значимости клеточных реакций адаптивного иммунитета для защиты против чумы были получены на мышах, дефицитных по различным компонентам механизмов клеточного и гуморального иммунного ответа. На модели бестимусных мышей Wake A. и Sutoh Y. показали возможность передачи протективного иммунитета против заражения вирулентным штаммом чумного микроба за счет трансфера спленоцитов, выделенных от иммунизированных мышей, имеющих тимус и, соответственно, полноценный Т-клеточный ответ [358]. Некоторые исследования демонстрируют, что одного клеточного иммунитета без образования антител достаточно для защиты против инфекции. Отчетливо такая тенденция прослеживается при иммунизации живыми вакцинными штаммами. Так, иммунизация морских свинок значительно защищала последних против заражения в отсутствие выраженных титров антител [176]. Дефицитные по В-клеткам  $\mu$ MT мыши, не способные к образованию антител, были эффективно защищены против легочной чумы в результате вакцинации пигмент-негативными аттенуированными штаммами *Y. pestis*. Более того, обработка животных моноклональными антителами, вызывающая деплецию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, значительно снижала их выживаемость после инфицирования, в то время как адаптивный перенос изолированных от вакцинированных животных праймированных Т-лимфоцитов обеспечивал защиту от летального заражения наивных  $\mu$ MT мышей [120]. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что индуцированная иммунизацией живыми аттенуированными *pgm*-штаммами чумного микроба защита против легочной чумы может быть достигнута за счет специфических Т-клеточных реакций иммунитета.

Поскольку как постинфекционный, так и поствакцинальный иммунный ответ сопровождается образованием специфических антител, Th2-ответ является обязательным компонентом противочумного иммунитета. Однако большинство

исследований демонстрируют критическое значение Th1-поляризованного T-клеточного ответа в протекции против чумы [106, 365]. Например, Stat4-дефицитные мыши, не способные утилизировать Th1-цитокины, несмотря на индукцию специфических антител в ответ на иммунизацию субъединичной вакциной F1+LcrV, были недостаточно защищены от заражения вирулентным штаммом, тогда как Stat6-дефицитные мыши с полноценным Th1-, но дефектным Th2-ответом, демонстрировали выраженную степень защиты, индуцированную иммунизацией [151]. На модели легочной чумы и иммунизации субъединичной вакциной показано, что провоспалительные Th1-цитокины IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  способствуют развитию протективного гуморального ответа [174]. Индукция Th1-ассоциированных цитокинов обнаружена у биомоделей, иммунизированных различными вариантами живых аттенуированных противочумных вакцин [75, 132, 189, 216, 332]. В то же время клеточная память с Th1/Th2 сдвигом была зарегистрирована у добровольцев, вакцинированных инактивированной цельноклеточной чумной вакциной [218].

CD4+ Th17-лимфоциты ассоциированы с развитием мукозального иммунитета и усилением Th1-опосредованных реакций. В недавних исследованиях на модели мышей, вакцинированных живыми аттенуированными вакцинами, была показана значимая роль Th17-ответа в защите против экспериментальной легочной чумы [189, 216, 220].

Помимо CD4+-клеток, CD8+-лимфоциты участвуют в формировании T-клеточного протективного ответа при чуме. Прайм-буст иммунизация живым аттенуированным штаммом *Y. pestis* индуцировала образование патоген-специфических CD4+- и CD8+-клеток, адаптивный перенос которых защищал наивных мышей от легочной формы инфекции. При этом основная защитная функция была ассоциирована с CD8+ T-клетками. CD4+ T-клетки значительно усиливали уровень протекции, опосредованной CD8+-лимфоцитами, тогда как одни только CD4+-лимфоциты не были способны обеспечить детектируемый уровень защиты животных. Эти данные показывают, что CD4+ и CD8+ T-клетки

синергически участвуют в протективном иммунитете против легочной формы инфекции [261].

Антигенная специфичность вызываемых вакцинацией и естественным инфицированием клеточных реакций адаптивного иммунитета практически не изучена [106, 328]. F1 и, особенно, LcrV – иммуногены, индуцирующие выраженный гуморальный иммунитет, по-видимому не являются сильными Т-клеточными иммуногенами [190, 261, 272]. В исследовании Philipovski A.V. и Smiley S.T. высказано предположение, что капсульный антиген и иммуногены, кодируемые плазмидой вирулентности pCD1 (LcrV, белки T3SS) и плазмидой pPCP (Pla), не участвуют в индукции Т-клеточного *Y. pestis*-специфичного ответа, поскольку праймированные вакцинацией живым аттенуированным pCD1<sup>+</sup>/pPCP<sup>+</sup>-штаммом чумного микроба CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоциты отвечали выраженной продукцией IFN- $\gamma$  на ре-стимуляцию F1<sup>-</sup>/pCD1<sup>-</sup>/pPCP<sup>-</sup>-штаммом [261]. Тем не менее, в другом исследовании научной группы под руководством Smiley S.T. было показано, что цитотоксический белок-эффектор YopE является основным иммуногеном, узнаваемым праймированными *Y. pestis*-специфичными клонами CD8<sup>+</sup>-клеток, полученными от иммунизированных живым аттенуированным штаммом и переживших последующие экспериментальное заражение мышей линии C57BL/6, а иммунизация иммунодоминантным пептидом YopE<sub>69-77</sub> индуцирует протективный иммунитет против легочной формы инфекции [377]. Определение конкретных иммуногенов чумного микроба, распознаваемых Т-клетками, будет способствовать не только разработке Т-клеточных противочумных вакцин, но и созданию чувствительных Т-клеточных анализов, позволяющих количественно оценивать и дифференцировать специфический иммунный ответ от неспецифического [377].

### **1.3.3 – Вакцины против чумы и особенности поствакцинального противочумного иммунитета**

Практически сразу после открытия чумного микроба было обнаружено, что животные, выжившие после перенесенной чумной инфекции, устойчивы к повторному заражению [176]. Эта приобретенная способность противостоять

инфекции предполагает возможность разработки вакцин, обеспечивающих протекцию против чумы за счет предварительного запуска механизмов иммунной защиты. Однако, как показывают некоторые наблюдения, постинфекционный иммунитет нестойк и может иметь короткую продолжительность. Так, Butler T. и Hudson B.W. наблюдали повторные случаи бубонной чумы у двух пациентов во Вьетнаме по истечении 4 и 6 лет после первого заражения, подтвержденного бактериологическим анализом [116].

По прошествии 130 лет с установления этиологического агента чумы, на сегодняшний день в большинстве регионов мира отсутствуют лицензированные противочумные вакцины. В 2018 году группа экспертов ВОЗ сообщила о 17 кандидатных вакцинах, разрабатываемых государственными и частными лабораториями в мире, часть из которых находилась либо на I–II фазе клинических исследований, либо планировалась к инициации исследований у человека [149]; к 2024 году число вакцин-кандидатов превысило 21 [285]. Ряд цельноклеточных вакцин первого поколения используется для вакцинопрофилактики чумы у лиц, постоянно контактирующих с возбудителем и проживающих на эндемичных территориях в Российской Федерации, Казахстане, Индонезии и Индии [10, 47, 82]. Однако ни одна из них не соответствует требованиям ВОЗ, согласно которым противочумные вакцины должны обеспечивать длительную защиту за счет индукции гуморального и клеточного иммунитета, не требовать выполнения холодной цепи, вводиться безыгольным методом и иметь надежные профили безопасности, в том числе, для иммунокомпрометированных лиц [369].

### **1.3.3.1 – Вакцины первого поколения**

Два типа созданных на основе эмпирического подхода вакцин, называемых вакцинами первого поколения, были использованы для масштабной иммунизации человека: цельноклеточные убитые и живые аттенуированные вакцины. Инактивированные вакцины широко применялись в западных странах, в то время как живые – преимущественно в СССР и бывших французских колониях. Хотя за время использования вакцин первого поколения накопилось достаточно косвенных



доказательств их эффективности у человека, ни одна из них не проходила контролируемые рандомизированные клинические исследования [202, 345].

Среди инактивированных вакцин наибольшее распространение получила американская убитая вакцина USP, разработанная в конце 30-х годов XX столетия на основе вирулентного штамма *Y. pestis*, инактивированного формальдегидом. Существовали три последовательно применяемые версии данной вакцины (А, В и С), отличающиеся исходным штаммом, используемым для приготовления вакцинного препарата, питательными средами для накопления культуры и содержанием микробных клеток в мл. Все три версии вакцины были испытаны на людях, однако только последняя (С), на основе штамма *Y. pestis* 195/P, активно использовалась в целях вакцинопрофилактики [265]. Данный штамм характеризовался четырехкратно повышенной продукцией капсульного антигена, что, по мнению разработчика и апологета вакцины К.Ф. Мейер, обеспечивало эффективный защитный иммунный ответ [266]. Вакцина выпускалась Cutter Laboratories, США, практически до конца XX века. Для создания напряженного иммунитета требовалось две-три инъекции, первичная и бустерные с интервалом в несколько месяцев, с последующей ежегодной ревакцинацией [163]. Она так же обладала достаточно высокой реактогенностью с развитием локальных и системных побочных реакций у 11–24 % и 4–10 % привитых, соответственно [163, 265].

Научная группа под руководством К.Ф. Мейер активно изучала эффективность иммунизации вакциной USP на большом разнообразии лабораторных животных. Особое внимание ученых было направлено на эксперименты с высокочувствительными к чуме морскими свинками, а также нечеловекообразными приматами. Согласно результатам их исследований, двукратная иммунизация вакциной USP обеспечивала защиту 60–70 % морских свинок и 60 % лангуров Ханумана от летального подкожного заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* [229]. При оценке иммунологической эффективности вакцины у человека К.Ф. Мейер и соавторы широко применяли разработанные серологические тесты (РСК и РПГА) с использованием очищенного

капсульного антигена F1 в качестве сенситина [123], а также суррогатный показатель – МПИ. Согласно полученным ими данным, двукратное подкожное введение вакцины USP (в дозе  $2 \times 10^9$  КОЕ и  $4 \times 10^8$  КОЕ, соответственно) индуцировало образование защитных антител, определяемых методом МПИ ( $\text{МПИ} \leq 10$ ) и в РПГА, у 60–65 % привитых [229].

Протективный иммунитет, индуцируемый инактивированной вакциной USP, был направлен к капсульному антигену чумного микроба. На мышинной модели иммунитет был преимущественно гуморальным, хотя некоторый уровень F1-специфичного Т-клеточного ответа также был зафиксирован при оценке пролиферативного ответа Т-лимфоцитов, изолированных от иммунизированных животных. Напротив, ни антительного, ни клеточного ответа к LcrV не было обнаружено в данных исследованиях [86, 137].

Вакцина USP широко применялась для профилактики чумы среди американских военнослужащих во время войны во Вьетнаме в 1966–1971 гг. Несмотря на высокий уровень заболеваемости чумой среди местного населения, только 8 клинических случаев было зафиксировано среди американских военных (из них два случая легочной чумы), что приблизительно соответствует одному случаю заболевания на 1 000 000 человеко-лет воздействия [229, 267]. Эти данные послужили косвенным доказательством эпидемиологической эффективности вакцины против бубонной и, по мнению исследователей, легочной формы заболевания [267]. Тем не менее, способность вакцины USP индуцировать протективный иммунитет против легочной формы чумы не была подтверждена в экспериментах на животных [85]. Кроме того, ряд случаев заболевания легочной чумой был зафиксирован у привитых убитой вакциной людей [129, 229, 231]. В 1998 году вакцина USP была снята с производства [150, 163].

Живые аттенуированные цельноклеточные противочумные вакцины представляют собой аттенуированные варианты чумного микроба, полученные из изначально вирулентных изолятов путем длительного (до нескольких десятков лет) пересева на рутинных питательных средах. Это приводит к стойкому снижению или полной потере вирулентности возбудителя при сохранении возможности

бактериальных клеток к ограниченному размножению в организме хозяина, обеспечивающему эффективную стимуляцию врожденного и адаптивного иммунитета. Такой механизм действия обуславливает высокую иммуногенность живых вакцин по сравнению с убитыми. Отсутствие консервантов, широко используемых при приготовлении убитых вакцин, снижает потенциальную реактогенность препаратов на основе живых ослабленных штаммов возбудителя. В то же время способность к размножению и колонизации тканей и органов хозяина несет опасность развития полноценной инфекции за счет реверсии вирулентных свойств или проявления остаточной вирулентности, что предопределило настороженное отношение к живым противочумным вакцинам западного мира [163, 229].

Среди живых вакцин наибольшее распространение получил беспигментный аттенуированный штамм, обозначенный как *Y. pestis* EV76. Штамм был получен Girard G. и Robic J. в результате пятилетнего культивирования (76 пассажей) на питательных средах исходного вирулентного штамма, выделенного из трупа девочки, умершей от чумы. Вакцинный штамм был изучен на разных биомоделях и наиболее тщательно – на морских свинках, с оценкой показателей безвредности и иммуногенности. Было установлено, что целая агаровая культура патогена безвредна для данных лабораторных животных при различных способах введения, а 100 % иммунизированных животных переживают заражение большими дозами вирулентной культуры с сохранением напряженного противочумного иммунитета длительностью до 13 месяцев. Girard G. и Robic J. связывали высокие иммуногенные свойства штамма EV76 с его остаточной вирулентностью, проявляющейся, в том числе, в виде характерных морфологических изменений внутренних органов биомоделей, в первую очередь – органов иммунной системы [39, 78, 176]. Наличие остаточной вирулентности объясняло также выраженную реактогенность штамма.

Как было установлено позднее (Fetherstan J.D. et al., Galimand M. et al.), причиной выраженного снижения вирулентности штамма EV76 является спонтанная делеция нестабильного хромосомного локуса *pgm* [168, 258]. *Pgm*-

область включает не только *hms*-локус, ответственный за сорбцию гемина и проявление пигмент<sup>+</sup>-фенотипа, но и важнейший фактор вирулентности иерсиний – остров высокой патогенности (High Pathogenicity Island (HPI)), кластер генов, обеспечивающих биосинтез и транспорт сидерофора иерсиниабактина для эффективной утилизации железа в условиях его дефицита [257].

Оценка вакциноиндуцированного иммунного ответа на мышинной модели показала, что иммунизация EV76 индуцирует выраженный антительный ответ к F1 антигену, а также детектируемый, но меньший по магнитуде, к LcrV [86, 87, 137]. При этом в исследовании Braciale V.L. et al. титры специфических антител к LcrV начинали снижаться уже с 8-й недели после иммунизации, в то время как антикапсульные антитела сохранялись дольше [137]. В работах Qi Z. et al. и Wang Z. et al. было продемонстрировано, что иммунизация EV76 различных биомоделей (мышей, морских свинок, кроликов, макак-резусов) индуцировала высокие титры анти-F1-антител и не вызывала детектируемого гуморального ответа к LcrV270, рекомбинантному варианту антигена вирулентности, лишенному ассоциированного с иммуносупрессирующей активностью участка с 271 aa по 326 aa [132, 133, 219]. Wang Z. et al. показали, что мышинные антитела к F1, вызванные прайм-буст иммунизацией EV76 и последующим заражением вирулентным штаммом, оставались на детектируемом уровне на протяжении более 16 месяцев, демонстрируя потенциал живой аттенуированной вакцины к индукции продолжительного гуморального иммунитета [219]. В дальнейшем на мышинной модели китайскими учеными было установлено, что однократная иммунизация EV76 индуцирует образование F1-специфичных короткоживущих В-клеток памяти, а длительная циркуляция антикапсульных антител обеспечивается, в основном, плазматическими клетками [205]. Наконец, методом белкового микроэрея была определена антигенная специфичность антительного ответа у кроликов, иммунизированных EV76. Сто сорок девять рекомбинантных белков чумного микроба хромосомного и плазмидного происхождения были включены в исследование. Антитела к 50 из них были зарегистрированы у иммунизированных

животных, включая F1, LcrV, YopD, YscF, OmpA, PsaA и ряд менее охарактеризованных белков [291].

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что иммунизация EV76 индуцирует спектр антител различной антигенной специфичности, но доминантный гуморальный ответ направлен к капсульному антигену, тогда как антитела к LcrV обнаруживаются не во всех исследованиях. Сходные результаты были получены при иммунизации биомоделей другими пигмент-негативными штаммами чумного микроба [371]. Quenee L.E. et al. предположили, что протективный иммунитет живых аттенуированных вакцин строго F1-специфичен. Отчасти это предположение подтверждается их низкой эффективностью против заражения бескапсульными штаммами *Y. pestis* [296, 371, 372].

Иммунизация EV76 сопровождается активацией клеточного звена иммунитета и индукцией IL-12 в сыворотках крови иммунизированных биомоделей [132]. При исследовании вакциноиндуцированного Т-клеточного ответа у мышей выраженная пролиферация лимфоцитов также была отмечена в ответ на ре-стимуляцию F1, но не LcrV [86, 137]. Напротив, в работе Wei L. et al. методом ELISpot было показано, что у иммунизированных EV76 мышей Т-клеточный ответ в виде продукции IFN- $\gamma$  направлен к LcrV, а не к капсульному антигену. Помимо LcrV, ре-стимуляция еще 33 белками из 101 исследованного инициировала продукцию IFN- $\gamma$  иммунными спленоцитами, среди них – YopM, YopD и YscF [183].

С 1937 по 1941 гг. на эндемичном по чуме острове Мадагаскар живой аттенуированной вакциной EV76 было проиммунизировано несколько миллионов человек, включая как первичные, так и повторные вакцинации. По итогам вакцинальной кампании авторы вакцины сделали вывод о ее безопасности для человека и высокой эпидемиологической эффективности. Так, заболеваемость чумой среди привитых снизилась в 4 и более раз, а смертность – на 80 % по сравнению с непривитым населением. Важным наблюдением стало значимое снижение случаев развития вторичной легочной формы заболевания и септицемии

у вакцинированных [39, 67, 176, 360]. Впоследствии способность вакцины защищать от первично-легочной чумы была показана при экспериментальном интраназальном и ингаляционном заражении морских свинок и мышей, иммунизированных вакциной EV76 подкожно и внутримышечно [39, 85]; при этом повторная иммунизация увеличивала как процент выживших животных, так и длительность сохранения напряженного иммунитета [39].

Успех применения аттенуированного штамма *Y. pestis* EV76 на острове Мадагаскар привлек огромное внимание исследователей из разных стран. Штамм был передан для приготовления вакцины и дальнейшей характеристики в различные лаборатории мира, в том числе, в СССР. Учитывая способность колоний чумного микроба к диссоциации, в разных лабораториях появились субкультуры исходного штамма, которым присваивались новые названия для дифференциации используемого варианта от родительского: EV Saigon, EV Madagascar, EV НИИЭГ и т.д. [163, 360]. Такие субкультуры могли значительно различаться между собой по показателям иммуногенности и остаточной вирулентности, что сильно усложнило систематизацию данных по эффективности EV76 и ее дериватов. Дальнейшее активное изучение и оценка вакцинного штамма выявило также один из важнейших его недостатков: возможность развития полноценной инфекции при введении внутривенно или в сочетании с солями железа [217, 357]. Так, Meyer K.F. в своих экспериментах показал, что дериват вакцинного штамма EV76 – штамм *Y. pestis* EV76-51f, полученный многократным пассированием через организм морских свинок, обработанных солями железа, значительно повышает свою вирулентность, вызывая фатальную септическую чуму при инокуляции у некоторых видов приматов [180, 217]. В дальнейшем эти данные и ряд других подобных наблюдений [85, 122, 182] стигматизировали использование штамма EV76 и его производных в США и Европейских странах.

### **1.3.3.2 – Современные разработки в области вакцин против чумы**

Логичным продолжением вакцины USP стали попытки научной группы под руководством К.Ф. Meyer создать противочумную вакцину на основе капсульного антигена F1, ставшую прототипом субъединичных вакцин второго поколения.

Выделенный ими в 1952 г. путем химической экстракции антиген [330] обладал высокой иммуногенностью для мышей и приматов и широко использовался как сенситин в серологических тестах. Meyer К.Ф. и соавт. показали, что иммунизация капсульным антигеном обеспечивала защиту от бубонной чумы до 100 % иммунизированных мышей и до 60 % иммунизированных обезьян в течение нескольких месяцев после иммунизации, а также вызывала образование специфических антител у 30–64 % привитых добровольцев после первого введения иммуногена и у 95 % – после бустерной инъекции. Длительность поствакцинального иммунитета у добровольцев, оцениваемая по циркуляции анти-F1-антител, составляла от 3 до 7 месяцев [124, 233].

Развитие технологии рекомбинантной ДНК позволило исследователям получить белки чумного микроба в высокоочищенном виде и исследовать их иммуногенные и протективные свойства. Как и ожидалось, иммунизация мышей рекомбинантным F1 обеспечивала формирование протективного иммунитета, сопоставимого по уровню защиты с протекцией, индуцированной химически очищенным антигеном, и коррелирующего с титрами специфических антител при подкожном и аэрозольном заражении инкапсулированными, но не F1-негативными полновирулетными штаммами [171, 323, 371]. Это обстоятельство стало обоснованием разработки вакцин на основе другого значимого фактора вирулентности чумного микроба, LcrV. Иммунизация биомоделей различными вариантами рекомбинантного LcrV продемонстрировала его способность индуцировать высокие титры специфических антител и активировать клеточное звено иммунитета, обеспечивая даже более выраженную защиту против аэрозольного и подкожного заражения, чем капсульный антиген [86, 91, 196, 214, 238, 245, 268, 283, 286, 299]. В дальнейшем было установлено, что совместное введение LcrV и капсульного антигена имело синергический эффект и обеспечивало высокий уровень защиты против заражения, превосходящий таковой, индуцированный каждым антигеном по отдельности или убитой чумной вакциной [86, 132, 297]. Эти данные, вкупе с отсутствием выраженных сайд-эффектов, характерных для вакцин первого поколения, определили F1 и LcrV как

два обязательных компонента современных субъединичных противочумных вакцин [163, 346, 364]. Начиная с середины 90-х годов XX столетия, было предложено множество вариантов вакцинных кандидатов, основанных на комбинации этих двух иммуногенов как в виде смеси двух белков (F1+V), так и в виде слитного гибридного белка F1-V. Их высокая иммуногенность, способность индуцировать мощный гуморальный ответ и протективные свойства были показаны на широком круге лабораторных животных, включая мышей разных линий, крыс, морских свинок, нечеловекообразных приматов [48, 88, 90, 133, 171, 278, 283, 289, 298, 364]. Как итог, к 2019 году три вакцинных кандидата, включающие F1 и LcrV, а именно rF1-V, RypVax и SV1, разработанные и запатентованные, соответственно, в США, Великобритании и Китае, прошли фазы I и II клинических испытаний в соответствии с правилами ВОЗ [252, 296, 332, 369]. Еще одна субъединичная вакцина, rV10, предложена на основе трункированного белка LcrV, лишённого участка 271-300aa. Данный пептидный участок вызывает супрессию Th1-клеток за счет стимуляции синтеза IL-10 [214]. Вакцина rV10 находится на стадии одобрения Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для последующего включения в I фазу клинических исследований [332]. В 2018 г. в Российской Федерации также была разработана и зарегистрирована химическая микроинкапсулированная вакцина на основе двух рекомбинантных белков, F1 и LcrV, с повышенной иммуногенностью последнего, проявившейся в результате точечной мутации [9].

Предварительные данные об иммуногенности субъединичных вакцин-кандидатов у человека демонстрируют высокую вариабельность иммунного ответа. Гуморальный ответ индуцируется к обоим белкам, однако титры значительно разнятся внутри иммунизируемой группы [187]. Сероконверсия (четырёхкратное превышение титров специфических антител) к F1 и LcrV часто не достигает 100 % [181, 306]. В исследовании Назаровой Е.Л. с соавт. 33 % иммунизированных химической микроинкапсулированной вакциной F1+LcrV доноров не отвечали образованием антител ни к одному из используемых белков [16]. Опубликованные данные о продолжительности иммунного ответа,



индуцируемого субъединичными вакцинами у человека, ограничены [181, 197]. Ну J. et al. показали, что уровень сероконверсии к F1 и титры анти-F1 антител у добровольцев, иммунизированных кандидатной вакциной, состоящей из химически очищенного F1 и рекомбинантного LcrV, остаются высокими на протяжении 12 месяцев, тогда как титры анти-LcrV-антител и сероконверсия к данному белку резко снижаются, начиная с 6го месяца после первичной иммунизации и вплоть до конца срока наблюдения [252]. В то же время на мышинной модели при иммунизации двухвалентной вакциной детектируемый уровень антикапсульных и анти-LcrV-антител регистрировался на протяжении 1–1,4 года [219, 227]. Оценка Т-клеточного ответа на иммунизацию субъединичной вакциной, дополненной алгидрогелем, была проведена в отдельных исследованиях. Анализ числа Т- и В-клеток и поверхностных маркеров их активации не выявил значимых вакциноиндуцированных изменений, что свидетельствовало об ограниченной способности субъединичной вакцины стимулировать выраженный Т-клеточный иммунитет [187].

Несмотря на значительный прогресс на пути к лицензированию F1/LcrV вакцин, остаются неразрешенными сомнения в их безусловной эффективности при применении у человека. Показано, что субъединичные вакцинные кандидаты не способны вызывать протективный иммунитет против легочной чумы у таких высокочувствительных видов приматов, как зеленые мартышки [145, 283]. Эффективность F1/LcrV вакцин для данного вида животных варьировала от 0 до 75 % по результатам пяти клинических исследований [262]. Рекомбинантные белки индуцируют преимущественно Th2-поляризованный иммунитет, что недостаточно для полноценной и длительной защиты против чумы [88, 287, 288, 327]. В связи с этим, ряд стратегий, таких как включение Th1-адьювантов, микроинкапсулирование, использование бактериофагов как платформ для создания вакцин и т.д. рассматриваются как средство усиления Т-клеточного ответа, индуцируемого субъединичными противочумными вакцинами [285, 306, 332].

В то же время ряд вопросов возникает и касательно антигенной композиции субъединичных вакцин. Известно, что F1<sup>-</sup>-штаммы широко распространены в природе и не уступают F1<sup>+</sup>-штаммам *Y. pestis* в вирулентности как для животных, так и для человека [255, 302]. Иммуный ответ, индуцированный капсульным антигеном, разумеется, неэффективен против бескапсульных штаммов возбудителя [371]. Кроме того, наличие аминокислотного полиморфизма, установленного как для F1 [370], так и для LcrV [96], может обуславливать снижение кросс-протективного иммунитета против вариантов белка, отличного от использованного при иммунизации [253, 281, 370]. В связи с этим, активно продолжается поиск других протективных иммуногенов чумного микроба для включения их в состав субъединичных вакцин. На сегодняшний день, помимо LcrV и F1, более 20 рекомбинантных белков *Y. pestis*, включая белки T3SS YpkA, YopD, YopH, YopK, YopM, YopN, YopE, YscF, адгезины YadC и PsA (pH6 антиген), белок наружной мембраны OmpA и активатор плазминогена Pla, были протестированы в экспериментах по активной иммунизации биомоделей с целью создания протективного иммунитета [332]. Лишь некоторые из них продемонстрировали протективные свойства в применяемых условиях иммунизации. Наиболее перспективными в качестве потенциальных дополнительных компонентов субъединичной вакцины являются активатор плазминогена Pla [155] и структурный белок инъектосомы T3SS YscF [226, 333].

Помимо субъединичных вакцин, современные подходы к разработке вакцин против чумы включают создание ДНК- и мРНК-вакцин, бактериальных теней, векторных вакцин на основе бактериальных и вирусных векторов, а также использование авирулентных для человека (*Y. pestis* *Microtus* 201) или прецизионно аттенуированных штаммов (как гомологичных, так и с использованием близкородственного возбудителя *Y. pseudotuberculosis*), экспрессирующих один или несколько иммуногенов чумного микроба (например, F1, LcrV, YscF, Pla). Особенно перспективными представляются живые вакцины на основе множественных делеционных мутантов чумного микроба и аттенуированных штаммов *Y. pseudotuberculosis* [163, 285, 306, 332].

Таким образом, в настоящее время множество вакцинных кандидатов против чумы, показавших эффективность на биомоделях, находятся на различных этапах доклинических и клинических исследований. Однако серьезным препятствием к их лицензированию являются отсутствие четко установленных коррелятов протекции. Ранние исследования предполагали зависимость уровня протективного противочумного иммунитета от гуморального ответа к капсульному антигену [116]. Трехкратная иммунизация добровольцев химически очищенным капсульным антигеном стимулировала образование специфических антител только у 50–62 % вакцинированных. Несмотря на это, при оценке защитных свойств сывороток у 2/3 вакцинированных МПИ соответствовал уровню, наблюдаемому у реконвалесцентов от чумы [232]. Вариабельность уровня анти-F1-антител также была обнаружена у добровольцев, многократно (до 51 инокуляции) привитых вакциной USP: из 117 вакцинированных 72 % отвечали образованием высоких титров специфических антител к F1, 20 % – образованием средних титров и 8 %, включающих добровольцев с числом иммунизаций от 4 до 42, не отвечали продукцией анти-F1-антител на детектируемом уровне. Хотя общая тенденция к корреляции высоких титров антител и низкого значения МПИ сохранялась, одна сыворотка из 16 выборочно исследованных, с низким уровнем антикапсульных антител (1:8 в тесте пассивной геммаглютинации), пассивно защищала 100 % мышей [224]. Исследования серореактивности сывороток добровольцев, вакцинированных различными вариантами живой аттенуированной вакцины (беспигментные штаммы), демонстрировали еще более низкий процент сероконверсии по F1 [229]. Эти данные дают основания предполагать, что антитела к капсульному антигену, будучи достаточно адекватным критерием формирования противочумного иммунитета на одной животной модели и для конкретного вакцинного препарата, могут быть не показательными для оценки иммунитета, инициируемого другими вакцинами и на других биомоделях [30, 363].

Выраженная корреляция анти-F1- и анти-LcrV-антител IgG1-подкласса и эффективности защиты была показана на модели BALB/c мышей и нечеловекообразных приматов, иммунизированных экспериментальной

субъединичной вакциной F1+LcrV [97, 198]. Уровень защиты мышей в результате пассивного переноса иммунных человеческих сывороток также достоверно коррелировал с общими IgG титрами к rF1+rV при проведении клинических исследований [187]. Аналогичный тренд наблюдался и при исследовании слитной вакцины [287]. Однако в работе Bashaw J. et al. титры специфических антител, индуцируемых иммунизацией слитной вакциной F1-V, не были достоверно связаны с выживаемостью иммунизированных мышей и приматов при заражении [145]. Титры антител к LcrV, определяемые в сыворотках добровольцев, иммунизированных Flagellin/F1/V вакциной, коррелировали с результатами теста антитело-опосредованной защиты макрофагов от лизиса рекомбинантным штаммом *Y. pseudotuberculosis*, экспрессирующим V-антиген чумного микроба [170]. Тем не менее, использование данного теста не дает представления о вкладе антикапсульных антител в вакциноиндуцированный иммунитет. Ни один из предложенных тестов не учитывает антительный ответ к другим антигенам чумного микроба. Кроме того, практически не исследована антигенная специфичность клеточных реакций поствакцинального иммунитета, что тормозит разработку тестов для оценки клеточного звена противочумного иммунитета.

#### **1.3.4 – Живая чумная вакцина EV НИИЭГ: реакции адаптивного иммунитета и методы оценки поствакцинального иммунного ответа**

Среди вакцинных препаратов против чумы единственной используемой на регулярной основе для иммунизации людей является живая чумная вакцина на основе штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (EV НИИЭГ, ЖЧВ) [75]. В 1936 г. вакцинный штамм EV76, подробно описанный выше, был передан его авторами советским исследователям. Силами научного коллектива противочумного института «Микроб» и бывшего Научно-исследовательского института эпидемиологии и гигиены (НИИЭГ) были проведены тщательные испытания его иммуногенности и безвредности на лабораторных моделях и добровольцах, подтвердившие характеристику штамма, данную Girard G. и Robic J., а также преимущество EV76 перед другими доступными профилактическими препаратами против чумы [31, 39, 66]. На протяжении нескольких лет в каждом из институтов

выпускались вакцины на основе сублиний, полученные при пересеве вакцинного штамма EV76. В середине XX века было установлено, что большинство линий значительно снизили свою иммуногенность. Сравнительные испытания показали, что наибольшей иммуногенностью и стабильностью обладала линия НИИЭГ, которая получила статус «эталонной» культуры как для производства чумной живой сухой вакцины, так и для оценки разрабатываемых противочумных вакцинных кандидатов [31, 39, 66, 167].

В масштабных экспериментах на животных моделях было показано, что бактерии вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ способны до 2 недель существовать в организме иммунизированного животного, осуществляя выраженную антигенную стимуляцию иммунной системы. В результате даже однократное введение вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ различными способами (подкожно, накожно, внутривенно, ингаляционно и т. д.) индуцировало быстрое (на 4-е–7-е сутки) формирование иммунитета против бубонной и легочной формы заболевания [39, 164-166]. Длительность напряженного иммунитета против подкожного заражения у однократно иммунизированных морских свинок составляла 6 месяцев, у двукратно – 8 и более месяцев [39]. В отличие от других дериватов EV76, для бактерий штамма EV НИИЭГ не было отмечено усиления вирулентности при многократном пассировании через организм чувствительных биомоделей. Штамм практически авирулентен для белых аутбредных мышей при подкожном введении ( $LD_{50} > 10^8$ ), однако при внутривенной инъекции вызывает смерть 100 % животных [165].

Массовые прививки живой чумной вакциной были организованы с 1942 г. Важнейшей характеристикой ЖЧВ является большой опыт полевого применения – более 10 млн человек были вакцинированы ею в СССР и Маньчжурии. В отсутствие исследований, соответствующих современным стандартам оценки эпидемиологической эффективности вакцинации, о полевой эффективности ЖЧВ свидетельствуют документированные факты. Так, благодаря вакцинальной кампании, проводимой во время вспышки в Монголии в 1945 г., удалось значительно (в 2,5 раза при подкожной и в 130 раз при конъюнктивальной

иммунизации) снизить заболеваемость по сравнению с невакцинированным контингентом. В случае, если заболевание все же развивалось, у вакцинированных наблюдалось более легкое течение и отсутствие смертельных исходов [50, 51, 163]. Имеются единичные сведения об эпидемиологической эффективности ЖЧВ в условиях ограниченных вспышек чумы на территории стран бывшего СССР. Так, по данным Свистунова В.М., в зоне интенсивной вспышки в одном из населенных пунктов удалось провести экстренную вакцинацию 92 % населения. Заболеваемость среди непривитых в 4,2–8 (индекс эффективности) раз превышала заболеваемость среди привитых, а коэффициент эффективности составил 78–87 (с учетом заболевших через 30 дней после вакцинации) [69]. Эти данные согласуются с многочисленными наблюдениями об эффективности других дериватов EV76 в очагах чумы, например, в Южной и Восточной Африке [39, 50].

Важно, что реактогенность, характерная для родительского штамма EV76 и описанная Meyer K.F. и другими западными специалистами, намного менее выражена у штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Иммунизация ЖЧВ может сопровождаться локальными и, редко, системными (повышение температуры, слабость и т.д.) реакциями, наблюдаемыми в течение 24–48 часов после инокуляции. Случаи лимфангита и лимфаденита, описанные в литературе, наблюдались, в основном, при подкожном или внутрикожном способе введения [18, 163], в то время как в настоящее время для вакцинации ЖЧВ используют, в большинстве случаев, наименее реактогенную, накожную иммунизацию [50].

Как и исходный родительский штамм EV76, вакцинный штамм EV НИИЭГ проявляет Pgm<sup>-</sup>-фенотип и содержит три «типичные» плазмиды чумного микроба, pFra, pPst, pCad, продуцируя в соответствующих условиях видоспецифические (F1, Ymt, Pla), и общие для всех патогенных иерсиний (LcrV и Yops) антигены [163]. Анализ полногеномной последовательности *Y. pestis* EV НИИЭГ подтвердил, что штамм имеет протяженную делецию размером  $\approx 102$  т.п.н, соответствующую хромосомной области пигментации *pgm*. Таким образом, невозможность реверсии вирулентных свойств вакцинного штамма EV НИИЭГ, показанная в обширных опытах на лабораторных животных [39, 66], была подтверждена современными

молекулярно-генетическими методами [2, 76]. Хотя серьезным недостатком ЖЧВ, как и других аттенуированных *pgm*-штаммов *Y. pestis*, остается возможность развития фатальной инфекции при внутривенном введении или инокуляции лицам с выраженными нарушениями обмена железа [121, 182], за более чем 80 лет применения ЖЧВ для профилактики чумы у человека не было задокументировано ни одного летального случая, ассоциированного с вакцинацией [31, 50, 66, 163]. В настоящее время в Российской Федерации ЖЧВ применяется для специфической профилактики чумы у отдельных групп населения по эпидемическим показаниям (при проживании на территории природных очагов чумы, ухудшении эпидемической обстановки) или в группах риска (медработники, сотрудники противочумных лабораторий, эпидотрядов и т.д.) [50]. Вакцинация ЖЧВ обеспечивает защиту от бубонной и легочной формы заболевания длительностью 6–12 месяцев. Ревакцинация, согласно инструкции, проводится через 12 месяцев после первого введения вакцины. Основным путем введения ЖЧВ является кожная скарификация, однако подкожная, интрадермальная, ингаляционная и пероральная (специальная пероральная форма) вакцинации также могут быть применены [166].

В ранних работах по исследованию механизмов иммунитета, индуцируемого EV76 и ее дериватами, было показано существование двух последовательных фаз: нестерильной, характеризующейся ограниченным приживлением и размножением бактерий вакцинного штамма в органах и тканях животного (вакцинный процесс), и стерильной, когда бактерии полностью удаляются из макроорганизма и не могут быть выделены из органов и тканей [39, 176, 201]. В экспериментах Е.И. Коробковой и Л.В. Самойловой по прерыванию вакцинного процесса введением стрептомицина было убедительно показано, что длительность и напряженность иммунитета при иммунизации ЖЧВ напрямую зависит от длительности и интенсивности нестерильной фазы [39, 67]. Таким образом, запуск механизмов врожденного иммунитета играет ведущее значение для формирования эффективной защиты при вакцинации ЖЧВ. Усиление экспрессии иммунокомпетентными клетками биомоделей и человека, иммунизированных

ЖЧВ, таких PRRs, как TLR2 и TLR9, но не TLR4, является одним из доказанных этапов его активации [73, 81].

Интересно, что уже в первые сутки после иммунизации ЖЧВ животные демонстрировали некоторый уровень защиты от летального заражения [39, 67]. Как было установлено недавно группой израильских ученых, способность вакцинного штамма EV76 защищать против летального заражения полновирулентным штаммом в ранние сроки после иммунизации связана с повышением в сыворотке крови мышей уровня белков-транспортёров трансферрина и гемопексина. Создаваемый ими дефицит свободного железа ограничивает размножение бактерий вирулентного штамма, позволяя механизмам врожденного иммунитета более эффективно элиминировать возбудителя [185]. Таким образом, механизмы ранней защиты, индуцируемые ЖЧВ, вероятно включают индукцию «голода» по одному из важнейших нутритивных факторов возбудителя.

Центральная роль в эффективной защите против чумы отводится клеточному иммунитету, в частности, системе фагоцитирующих клеток и фагоцитозу. В ранних экспериментах были показаны ключевые различия в процессах фагоцитоза бактерий *Y. pestis* у иммунизированных ЖЧВ и наивных лабораторных моделей: при моделировании инфекции у иммунных животных фагоцитоз протекал активнее и имел завершённый характер, то есть заканчивался киллингом возбудителя, в отличие от незавершённого характера фагоцитоза у наивных животных [11, 20, 37 49, 67]. На сегодняшний день достоверное повышение фагоцитарной активности гранулоцитов и мононуклеарных фагоцитов биомodelей и человека, иммунизированных ЖЧВ, в отношении бактериальных клеток *Y. pestis* рассматривают двояко: как результат активации, вызванной эффекторными молекулами адаптивного иммунитета (в частности, антителами и цитокинами), и как возможное проявление «иммунологической памяти» клеток врожденного иммунитета [12, 15, 42]. Показано, что иммунизация ЖЧВ усиливает хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов в зону заражения, увеличивает способность последних к адгезии, усиливает бактерицидную активность фагоцитов



за счет стимуляции лизосомальных ферментов и кислород- и NO-зависимого киллинга [21, 49].

Основу современных представлений об адаптивном поствакцинальном иммунитете, вызываемом ЖЧВ, заложили масштабные исследования, проведенные отечественными учеными в середине и конце XX века. Их данные постулировали ведущую роль клеточного иммунного ответа в формировании эффективной поствакцинальной защиты против чумы, убедительные доказательства которой были получены в опытах на животных с индуцированной иммуносупрессией по Т-клеточному звену иммунитета. Так, обработка антилимфоцитарной сывороткой животных с сформированным (39-й–41-й день после иммунизации ЖЧВ) противочумным иммунитетом резко снижала их устойчивость к подкожному заражению, приводящему к развитию летальной генерализованной инфекции [6]. Аналогично, иммунизация ЖЧВ бестимусных мышей не защищала их от последующего заражения вирулентным штаммом [26]. Эти данные подкреплялись сведениями об отсутствии убедительной корреляции между сероконверсией или титрами антител к капсульному антигену и приобретенной резистентностью к заражению у иммунизированных ЖЧВ биомоделей [38, 49, 67, 79].

К концу XX века были получены экспериментальные данные о выраженной активации лимфоцитов в ответ на иммунизацию ЖЧВ, оцениваемой по множеству параметров: миграции и пролиферации стволовых кроветворных и лимфоидных клеток, активации хроматина, увеличению числа Т- и В-лимфоцитов в периферических органах иммунной системы, перераспределению субпопуляций Т-клеток [49].

Роль гуморального звена в поствакцинальном иммунитете, вызванном ЖЧВ, неоднозначна. Ранние работы показывали его незначительную роль в медиации ЖЧВ протекции лабораторных животных. Так, Самойлова Л.В. исследовала превентивные свойства сывороток и дефибринированной крови морских свинок, иммунизированных ЖЧВ, в тесте пассивной защиты мышей. В этих экспериментах иммунные сыворотки/плазма крови, введенные подкожно, не защищали мышей от последующего заражения вирулентной культурой *Y. pestis*

[67]. Позднее, Филиппов А.Ф. и соавт., наоборот, продемонстрировали значительный уровень протективной активности антисывороток, собранных от иммунизированных ЖЧВ кроликов. МПИ, полученный ими при иммунизации ЖЧВ и рассчитанный по методу К.Ф. Meyer, составил 1,5 (очень хорошее предохранение от заражения). Исследуемые сыворотки создавали напряженный пассивный иммунитет, защищая 80 % мышей от заражения  $80 \times 10^3$  Dcl (Dosis certae letalis) вирулентного штамма и оказывая выраженное протективное действие даже в разведениях 1:5–1:25 [59]. Причины столь разительно отличных результатов, видимо, следует искать в деталях методов, использованных исследователями, а также в источниках специфических антител. В отличие от Самойловой Л. В., Филиппов А. Ф. и соавт. применяли наиболее приближенную к оригинальной, разработанной К. Ф. Meyer, методику, в частности, вводили мышам антисыворотки внутривенно. В свою очередь, иммунизация кроликов, в отличие от рефрактерных к капсульному антигену морских свинок, вероятно, обеспечивала синтез высокопротективных для мышей антикапсульных антител. Стоит отметить, что дальнейшая оценка роли гуморального звена в формировании опосредованного ЖЧВ иммунитета базировалось, в основном, на оценке антительного ответа к капсульному антигену, как наиболее описанному и доступному для получения в препаративных количествах.

Как и в случае постинфекционного иммунитета, образование антикапсульных антител в ответ на иммунизацию ЖЧВ сильно варьируется, как среди биомоделей, так и у человека. Уже в ранних исследованиях было показано отсутствие обязательной сероконверсии по данному антигену у однократно иммунизированных ЖЧВ мышей и еще более выражено – у морских свинок. При этом у серопозитивных животных антикапсульные антитела обнаруживались в низких титрах [67]. Эти данные, наряду с отсутствием стопроцентной сероконверсии у вакцинированных биомоделей, выживших после заражения чумой, позволили Самойловой Л. В. сделать вывод о неосновной роли антикапсульных антител в формировании противочумного иммунитета и возможности рассматривать их лишь как дополнительный иммунологический

маркер поствакцинального иммунитета, индуцируемого ЖЧВ [67]. Отсутствие выраженной корреляции между титрами поствакцинальных антител к F1 и напряженностью иммунитета к экспериментальной чуме было продемонстрировано и в более поздних работах [24, 30, 80].

Для детекции антикапсульных антител в разное время использовали различные серологические реакции: РСК, РПГА, реакцию нейтрализации антител (РНА), и, позднее, ТИФА [10, 17, 44, 64]. РПГА долгое время служила золотым стандартом определения серологического ответа у переболевших и вакцинированных против чумы [115, 123, 233, 363]. Однако в настоящее время РПГА вытеснена ТИФА, по специфичности, чувствительности и удобству применения превосходящему РПГА [134, 318]. Кроме классического ТИФА, ряд лабораторий для определения поствакцинальных или постинфекционных антител к капсульному антигену использовали его варианты, основанные на применении нитроцеллюлозной мембраны в качестве твердой фазы – дот-иммуноанализ (ДИА) [77, 140] и иммуноблоттинг [312]. Девдариани З. Л. и соавт. при исследовании гуморального ответа у привитых ЖЧВ, обнаружили, что ДИА в 62,5–125 раз чувствительнее ТИФА в детекции антикапсульных антител [77]. В свою очередь, Neubauer H. et al. показали, что, по сравнению с ТИФА, иммуноблоттинг может быть более специфичным анализом для выявления анти-F1-антител, что позволяет использовать его как подтверждающий диагностический тест [312]. Современным направлением также является разработка экспресс-тестов на основе детекции антител к F1 при помощи микроструктурных волноводов [62, 70, 83].

У людей однократная вакцинация ЖЧВ также не вызывает 100 % серопревалентности к F1. Однако ревакцинации увеличивают процент серопозитивных доноров. По данным Пчелинцева С. Ю. и соавт., первичная иммунизация индуцировала образование антикапсульных антител, определяемых в РПГА без использования порога отсечения диагностических титров, у 63 % и 42 % добровольцев через 6 и 12 месяцев после вакцинации, соответственно, тогда как после ревакцинации число серопревалентных к F1 доноров составляло 100 % и 56 % в те же сроки после второго введения вакцины [25]. Sagiyev Z. et al.

исследовали динамику антительного ответа к F1 на протяжении года после иммунизации ЖЧВ. Они также использовали РПГА, однако в качестве порога отсечения выбрали титры  $\geq 1:160$  как потенциально протективные [188]. Выбор точки отсечения был обоснован представленными Центрами по контролю и профилактике заболеваний, США, данными о том, что титры  $> 1:128$  защищают животных от заражения вирулентным штаммом [270]. Тем не менее следует отметить, что ни в одном из исследований на сегодняшний день не показана взаимозаменяемость условно протективных титров анти-F1-антител у биомоделей и человека. В работе Sagiyev Z. et al. процент вакцинированных, в сыворотках которых обнаруживались антитела к F1 в титрах  $\geq 1:160$ , составил всего 16,2 %, 7,8 % и 5,7 % через 4, 8 и 12 месяцев после первичной иммунизации. Множественные ревакцинации (2–4, 5 и более) приводили к увеличению числа серопозитивных доноров до 33,1 %, 18,9 % и 13,6 % в указанные временные точки наблюдения. Количество вакцинаций в этом исследовании было статистически значимым фактором, влияющим на процент серопревалентности к F1 среди привитых ЖЧВ. Серопревалентность к капсульному антигену среди всех вакцинированных независимо от числа иммунизаций составила 26 % через 4 месяца после вакцинации, 15 % через 8 месяцев и 11 % через 12 месяцев после последнего введения вакцины [188]. Сходная временная динамика наблюдалась в работах сотрудников противочумной системы РФ, в рамках иммунологического мониторинга изучавших иммунный ответ, индуцируемый первичной и повторной вакцинацией ЖЧВ у населения, проживающего на территории природных очагов чумы [50, 52, 53, 55, 56, 57]. В этих исследованиях для оценки гуморального ответа к F1 использовали коммерческий набор ТИФА, диагностическим разведением антител в котором, согласно инструкции, считается 1:80. В серии работ Корятова К.М. и соавт. детально показана динамика образования антикапсульных антител у первично и повторно вакцинированных [52, 57]. Интересно, что результаты исследования различались у привитых в разных регионах Российской Федерации. Так, в Горно-Алтайском очаге сероконверсия к F1 через месяц после вакцинации наблюдалась у 91 % привитых ЖЧВ, при этом титры специфических антител выше

диагностического были зарегистрированы у 43 % человек. Через 6 и 12 месяцев после первичной вакцинации наблюдалось резкое снижение числа серопозитивных доноров, и серопревалентность к капсульному антигену составила всего 4 % с титрами антител к F1 на уровне диагностического. Ревакцинация ЖЧВ индуцировала выраженный буст гуморального ответа. Через месяц после ревакцинации 46 % привитых были серопозитивны к F1, и 16 % всех доноров демонстрировали титры выше диагностического. Максимальная (100 %) сероконверсия наблюдалась через 3 месяца после ревакцинации, когда у 76 % доноров титры анти-F1-антител были  $> 1:80$ . Через 6 месяцев после ревакцинации доля серопозитивных доноров снижалась до 39 %, при этом 31 % привитых имели титры выше диагностического [52]. Динамика антительного ответа к F1 у привитых ЖЧВ в Тувинском природном очаге чумы демонстрировала более сильный гуморальный ответ на вакцинацию, выраженный в значительной доле серопозитивных доноров (87 %), имеющих титры специфических антител на уровне диагностического через 6 месяцев после первичной иммунизации. В этом случае ревакцинация приводила к образованию высоких уровней антикапсульных антител (выше диагностического) у 91 % и 96 % привитых через 1 и 3 месяца после ревакцинации, соответственно. Однако через полгода после второй иммунизации доля серопозитивных доноров снижалась до 5 % привитых [57]. Таким образом, ревакцинация ЖЧВ повышает серопревалентность к капсульному антигену чумного микроба. Однако, по данным Фирстовой В.В. и соавт., множественные вакцинации не всегда сопровождаются значительным увеличением титров антител, что было продемонстрировано в ходе анализа гуморального ответа в экспериментальной ИФА-тест-системе у людей, периодически прививающихся ЖЧВ на протяжении более 20 лет [54]. Следует отметить, что в этом исследовании антикапсульные антитела в титрах 1:100–1:400 обнаруживались у 30 % наивных доноров контрольной группы, тогда как анти-F1 антитела в титрах 1:100–1:1600 наблюдались через месяц после последней иммунизации у многократно привитых ЖЧВ. Авторы сделали заключение о возможности развития перекрестных реакций

капсульного антигена с антителами, индуцированными антигенами других патогенов [54].

Гуморальный ответ к другим антигенам ЖЧВ практически не исследован. Антитела к ЛПС чумного микроба и еще одному иммуногену, мышинному токсину, обнаруживались у 29 % и 4 % вакцинированных ЖЧВ добровольцев через месяц после иммунизации [163]. Уткин Д. В. с соавт. показали, что при использовании экспериментального биологического чипа для одновременного определения антител к нескольким антигенам чумного микроба у привитых ЖЧВ доноров на разных сроках после вакцинации, помимо антикапсульных антител, регистрируются антитела к ЛПС (38,5–66,7 % случаев) и основному соматическому антигену (ОСА) (5,3 %–66,7 %) [63]. В работе Фирстовой В.В. показано, что иммунизация мышей ЖЧВ индуцирует образование антител к LcrV в низких титрах у отдельных животных. Через месяц после ревакцинации, анти-LcrV-антитела в титрах 1:100–1:800 регистрировались также у 54,5 % доноров, многократно привитых ЖЧВ, и, в то же время, у 25 % наивных доноров контрольной группы в титрах 1:400–1:800. Как и в случае с F1, ревакцинация не всегда вызывала увеличение титров антител по сравнению с таковыми до очередной иммунизации [81]. Микеров А. Н. исследовал иммунный ответ на вакцинацию ЖЧВ с использованием ряда антигенов T3SS, фракционированных из цельноклеточного антигена в ПААГ-SDS и выделенных методом элюции из геля. На ограниченном числе наблюдений им было показано, что у отдельных привитых ЖЧВ доноров в сыворотках крови обнаруживаются антитела к YopB, а также неразделенным электрофоретически слитным белкам, таким как YopD-N и YopH-M [46].

Отдаленный антительный ответ у привитых ЖЧВ был проанализирован в единичных работах. Уткин Д. В. с соавт. на ограниченном количестве доноров (3 человека) показали, что через 1,5 года после последней иммунизации у вакцинированных ЖЧВ обнаруживаются антитела к F1 (33,3–100,0 %), ЛПС и ОСА (66,7 %) [63]. Показано, что в сроки более чем год после последней вакцинации у 10–15 % трех-четырекратно привитых ЖЧВ людей регистрируются антитела к

капсульному антигену и ЛПС чумного микроба. Более длительная непрерывная иммунизация приводила к более выраженной иммунологической перестройке. Так, антитела к F1 и ЛПС обнаруживались у непрерывно вакцинирующихся в течение двух десятилетий доноров даже через 7–15 лет после последней вакцинации в ~ 50 % и ~ 80 % случаев, соответственно [77]. Эти данные свидетельствуют о возможности индукции долгоживущего гуморального ответа к отдельным антигенам чумного микроба у многократно вакцинированных ЖЧВ.

Гораздо большую проблему представляет оценка клеточных реакций поствакцинального адаптивного иммунитета. Накопление данных об участии клеточного звена в формировании противочумного иммунитета, индуцированного ЖЧВ, определило поиски клеточного маркера и теста, способного отражать клеточные реакции в иммунизированном организме. Внимание исследователей в середине XX века привлекла возможность использования с этой целью реакцию ГЧЗТ на внутрикожное введение специфического чумного аллергена пестина. В качестве последнего изначально использовались убитая или живая аттенуированная микробная взвесь культуры вакцинного штамма (микробный пестин) или ее центрифугат (безмикробный пестин) [39, 40]. На модели морских свинок положительная внутрикожная проба с указанными аллергенами коррелировала с выживаемостью вакцинированных животных после заражения, тогда как у невакцинированных свинок проба, за редким случаем, была отрицательной [39]. У людей при постановке пробы с использованием микробного/безмикробного пестина отмечалось большое количество ложноположительных реакций в контрольных невакцинированных группах [13]. В дальнейшем был выделен более чистый антиген в виде полисахаридной фракции, извлеченной из культуры вакцинного штамма путем гидролиза с последующей очисткой от белковой примеси. Полученный аллерген, обозначенный как пестин ПП, представлял собой полисахарид-полипептидный комплекс, разделяющийся при гельхроматографии на несколько компонентов, которые обладали серологической специфичностью основного соматического антигена и ЛПС чумного микроба [5, 27]. У вакцинированных проба на пестин становилась

положительной на 10–15 сутки после иммунизации и исчезала в большинстве случаев через год, то есть, по мнению авторов, отражала сроки развития напряженного противочумного иммунитета. В то же время была отмечена значительная разница в реакции на введение пестина в зависимости от кратности вакцинации. Так, у многократно вакцинированных ЖЧВ людей положительная проба регистрировалась в 91,2 % случаев, тогда как лишь 50 %–60 % однократно вакцинированных проявляли реакцию на внутрикожную пробу [13, 17, 40]. Несмотря на значительное увеличение специфичности за счет более глубокой очистки антигена, положительные реакции наблюдались и у невакцинированных лиц [40], что также затрудняло интерпретацию результатов пробы и ограничивало ее повсеместное внедрение. Кроме того, при проведении пробы с пестином и его аналогами регистрировались побочные реакции, вплоть до лимфангоита, лимфаденита и повышения температуры тела до фебрильных цифр [40]. Многократное введение аллергена могло избыточно раздражать иммунную систему и вызывать состояние повышенной чувствительности, как было продемонстрировано на неиммунизированных морских свинках при повторной постановке внутрикожной пробы [39].

Альтернативой инвазивной внутрикожной пробе стали методы, отражающие иммунологические сдвиги клеточного звена иммунитета *in vitro*. Ряд таких разработок был предложен и для оценки противочумной вакцинации: анализ фагоцитарной активности лейкоцитов [80], НСТ-тест (восстановление нитросинего тетразолия), реакция бластной трансформации лимфоцитов [49]. РБТЛ как метод, позволяющий проводить объективную характеристику пролиферативных клеточных реакций, получила широкое распространение [22, 68]. Однако использование только стандартных коммерческих митогенов или цельноклеточных антигенов чумного микроба в качестве стимуляторов в РБТЛ снижает ее диагностическую ценность, зачастую не позволяя разграничить специфический и неспецифический ответ. Ввиду отсутствия пригодных для использования в клеточных реакциях рекомбинантных антигенов, лишь единичные работы исследуют антиген-специфический вакциноиндуцированный клеточный



иммунный ответ на вакцинацию ЖЧВ. Микеровым А. Н. была показана способность некоторых белков *Yops* к инициации реакции бластной трансформации сенсibilизированных Т-лимфоцитов, полученных из периферической крови привитых ЖЧВ [46]. В работе Фирстовой В. В. было отмечено, что спленоциты мышей, иммунизированных ЖЧВ, отвечали достоверным усилением пролиферации как Т-, так и В-клеток в ответ на рестимуляцию *in vitro* F1, но не LcrV. Однако подобной пролиферативной активности мононуклеаров периферической крови в ответ на стимуляцию антигенами чумного микроба не было зафиксировано при оценке клеточного ответа у привитых ЖЧВ доноров [81]. Эти данные свидетельствуют о недостаточности анализа только пролиферативной функции лимфоцитов памяти, циркулирующих в чрезвычайно низких количествах в периферической крови у людей, вакцинированных ЖЧВ.

В настоящее время для оценки клеточных реакций поствакцинального противочумного иммунитета нередко применяется определение экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов методом проточной цитофлуорометрии. Наиболее широко в этих целях используется детекция маркеров ранней (CD69, CD25) и поздней (HLA-DR) активации лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигенами или ультразвуковым дезинтегратором (УЗД) чумного микроба. Было показано усиление экспрессии маркера клеточной активации CD69 CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами мышей, иммунизированных ЖЧВ, при стимуляции капсульным антигеном [81]. Под влиянием F1 также было отмечено достоверное увеличение экспрессии ко-стимуляторной молекулы CD154 Т-лимфоцитами и CD86 – В-лимфоцитами иммунных мышей [81], что свидетельствует об участии капсульного антигена в индукции как Т- так В-клеточного ответа на иммунизацию ЖЧВ.

Значимыми маркерами В-клеточного ответа у привитых ЖЧВ доноров были усиление экспрессии В-лимфоцитами рецепторов CD86 и CD138 (маркер плазматических клеток) в ответ на F1. Однако уровень экспрессии молекул CD69 Т-клетками вакцинированных доноров под влиянием белков чумного микроба F1, LcrV или P1a достоверно не менялся по сравнению с контрольной группой [81]. По наблюдениям Кожевникова В. А. и соавт., повышенная экспрессия CD69

регистрируется у отдельных групп вакцинированных и ревакцинированных ЖЧВ доноров через месяц после введения антигена в ответ на стимуляцию ультразвуковым дезинтегратором (УЗД) бактерий *Y. pestis*, культивируемых при 28°C [1]. По данным Фирстовой В. В., оценка уровня поверхностного клеточного маркера поздней активации HLA-DR в ответ на стимуляцию F1 антигеном была более информативной. CD4+ и CD8+ лимфоциты памяти (CD45RO+), оцениваемые у привитых ЖЧВ доноров через 1 месяц после вакцинации, достоверно усиливали экспрессию молекул HLA-DR [54, 81]. Аналогично, повышение уровня данного маркера наблюдалось через 6 месяцев после ревакцинации у отдельных групп доноров, вакцинированных ЖЧВ, под влиянием УЗД *Y. pestis* или комплекса водорастворимых антигенов чумного микроба [1, 29]. Стимуляция последним вызывала также значимое увеличение экспрессии маркера молекул CD25 на поверхности лимфоцитов периферической крови, выделенных от привитых ЖЧВ через 1–3 месяца после очередной вакцинации [29].

Таким образом, хотя представленные данные демонстрируют потенциал тестов на основе определения маркеров клеточной активации для оценки поствакцинального иммунного ответа у привитых ЖЧВ, отсутствие стандартизированных охарактеризованных сенситинов значительно усложняет их расширенное применение и взаимную интерпретацию результатов различных исследований.

Определение продукции цитокинов является одним из основных способов анализа клеточного адаптивного иммунитета и позволяет охарактеризовать Т-хелперную направленность клеточных реакций. В последние годы в рамках иммунологического мониторинга в природных очагах чумы силами сотрудников противочумной системы России проведена грандиозная работа по характеристике маркерных цитокинов и Th-поляризации иммунного ответа у людей, вакцинированных ЖЧВ [43, 50]. Согласно разработанному ими подходу, Т-клеточные реакции оценивались по спонтанной и стимулированной классическим митогеном конконовалином А (ConA) секреции Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-10) и Th17 (IL17) цитокинов лимфоцитами в образце периферической цельной

крови без выделения пула мононуклеаров [43, 50]. Оценка расширенной панели медиаторных молекул использовалась в отдельных работах [36].

На основании проведенного анализа было сделано заключение о том, что маркерными цитокинами при оценке противочумного иммунитета, индуцированного ЖЧВ, являются IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 и IL17, поскольку статистически значимые изменения их продукции наблюдаются у привитых ЖЧВ в большинстве исследований [33, 36, 50]. Уровни как спонтанной, так и ConA-индуцированной секреции данных цитокинов характеризуются сложной динамикой, включающей периоды подъема и снижения в течение года после вакцинации. В исследовании Щуковской Т. Н. и соавт. ConA-индуцированная продукция IFN- $\gamma$  и IL-4 достоверно увеличивалась по сравнению со спонтанной продукцией цитокинов через 3 месяца после введения вакцины. Через 1 год уровень митоген-индуцированного IL-4 не отличался от спонтанного уровня и уровня, зарегистрированного в контрольной невакцинированной группе. Однако митоген-индуцированная продукция IFN- $\gamma$  иммунными лимфоцитами сохранялась у привитых до года после иммунизации [28]. В дальнейшем детальная характеристика динамики спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов показала, что клеточные реакции поствакцинального иммунитета к ЖЧВ значительно варьируют в разных регионах РФ и у разных национальностей, а также в зависимости от пола привитых и HLA-профиля [3, 35, 52, 57]. Обобщая вышеизложенное, следует отметить, что первичная вакцинация индуцировала, в основном, развитие Th1-/Th17- и в меньшей степени – Th2-поляризованного ответа за счет гиперпродукции соответствующих цитокинов в ответ на митогенную стимуляцию [33, 52, 53, 56, 57]. При этом повышение индуцированных уровней IFN- $\gamma$  и IL-17 у привитых было наиболее стойким и сохранялось до года после иммунизации. Важно отметить, что усиление индуцированной продукции указанных цитокинов спленоцитами мышей, иммунизированных ЖЧВ, достоверно коррелировало с увеличением выживаемости мышей при подкожном заражении полновирulentным штаммом чумного микроба [33]. Ревакцинация стабилизировала преобладание Th1-/Th17-ответа в начальные сроки (1–3 месяца)

после повторного введения вакцины. Тем не менее, выраженное усиление спонтанной и митоген-индуцированной продукции IL-4 через 6 месяцев после ревакцинации свидетельствовало о переключении типа Th1-ответа на Th2-поляризованный. Через 12 месяцев после ревакцинации происходила обратная перестройка иммунного ответа на Th1/Th17. Аналогичные тренды были зафиксированы при исследовании реакций клеточного иммунитета, индуцируемых повторной ревакцинацией ЖЧВ [35, 52, 55, 57].

Таким образом, в описанных выше масштабных исследованиях было показано развитие Th1/Th17/Th2-иммунного ответа у привитых ЖЧВ. Однако спонтанная или индуцированная в ответ на стимуляцию ConA продукция цитокинов может быть использована лишь для косвенной оценки клеточных реакций поствакцинального адаптивного иммунитета, поскольку характеризует, в основном, общее функциональное состояние лимфоцитов и их резервные возможности. Корректная оценка поствакцинального иммунного ответа к ЖЧВ может быть произведена только при использовании Т-клеточных иммуногенов чумного микроба в качестве сенситинов [50, 57, 75].

В работе Фирстовой В. В. было продемонстрировано, что спленоциты мышей (CD4+ и CB8+), иммунизированных ЖЧВ, усиливают образование IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию капсульным антигеном. Исследование антиген-индуцированных уровней цитокинов в супернатантах, полученных при культивировании иммунных спленоцитов, показало, что под влиянием капсульного антигена и LcrV мышинные лимфоциты специфически продуцируют IFN- $\gamma$  и IL-17. В свою очередь, у привитых ЖЧВ было выявлено специфическое F1-индуцированное усиление продукции IFN- $\gamma$  CD3+CD69+-клетками, тогда как другие антигены, LcrV или Pla, не оказывали влияния на изменение содержания ИФН- $\gamma$ -синтезирующих субпопуляций лимфоцитов. Однако исследование активности синтеза Th1/Th2/Th17-цитокинов в клеточных супернатантах, полученных при инкубации МНК вакцинированных ЖЧВ доноров с капсульным антигеном, было малоинформативным [81].

Согласно недавним публикациям, анализ результатов иммунологического мониторинга, проводимого силами сотрудников учреждений противочумной

службы Российской Федерации, позволил охарактеризовать 4 варианта иммунного ответа, индуцируемого ЖЧВ у привитых: i) нон-респондеры, ii) лица с преимущественно гуморальным типом ответа (индукция антикапсульных антител в титрах 1:80–1:160, не сопровождающаяся усилением митоген-стимулированной продукции Th1-цитокинов), iii) лица с преимущественно клеточным типом ответа (независимо от уровня анти-F1-антител регистрируется нарастание секреции маркерных цитокинов в пять и более раз по сравнению с уровнем до вакцинации), и iv) лица со смешанным типом ответа (двухкратное превышение уровней митоген-стимулированной продукции Th1-цитокинов через год после вакцинации по сравнению с показателями до вакцинации, а также детекция уровня антикапсульных антител выше диагностического титра используемой тест-системы). Предварительные данные показывают, что доля различных вариантов среди привитых ЖЧВ ассоциирована с числом ревакцинаций и может составлять от 6 % до 30 % – для нон-респондеров, от 10 % до 30 % – для лиц с гуморальным, от 15 % до 33 % – для лиц с клеточным и от 25 % до 51 % – для лиц со смешанным типом ответа. Продемонстрировано, что смешанный и клеточный варианты иммунного ответа более характерны для многократно вакцинированных ЖЧВ, тогда как наибольший процент нон-респондеров и лиц с гуморальным типом реактивности наблюдался среди первично-вакцинированных. С практической точки зрения, определение типа иммунного ответа в предыдущем сезоне вакцинальной кампании должно способствовать прогнозированию развития индивидуальных иммунологических реакций в ответ на очередную ревакцинацию, а также косвенной оценке эффективности вакцинации ЖЧВ, влияющей на принятие решений о необходимости, объемах и сроках ревакцинации [43, 75]. Вероятно, действенность данного подхода будет определена в ближайшие десятилетия. Разработка современных тестов для оценки антиген-специфичных реакций поствакцинального иммунного ответа на основе иммуногенов чумного микроба будет способствовать повышению его эффективности.

## РЕЗЮМЕ

ЖЧВ безопасно применяется для специфической профилактики чумы в Российской Федерации более 80 лет. Иммунизация ЖЧВ обеспечивает защиту против бубонной и легочной формы заболевания в течение 6–12 месяцев после введения. Существует необходимость в разработке эффективных методов оценки индуцируемого ею поствакцинального иммунитета. Трудности создания достоверных тестов связаны со сложным механизмом протективного иммунитета против чумы, включающим синергическое действие гуморального и клеточного звеньев иммунной системы, а также недостаточной изученностью антигенной специфичности реакций адаптивного противочумного иммунитета. Несмотря на данные о вовлеченности в постинфекционный и поствакцинальный иммуногенез многих антигенов чумного микроба, оценка гуморального иммунного ответа при ЖЧВ сосредоточена на двух наиболее изученных белках, F1 и LcrV, а клеточный иммунитет оценивается по продукции маркерных цитокинов иммунными клетками, стимулированными ConA, ввиду отсутствия установленных T-клеточных иммуногенов возбудителя чумы. Практически неисследованным является отдаленный (более года после последней иммунизации) иммунный ответ на вакцинацию. Определение иммуногенов ЖЧВ, способных индуцировать формирование B- и T-клеточной памяти, может стать основой для разработки путей совершенствования современных вакцин против чумы с длительным иммунитетом. В связи с вышеперечисленным, исследование антигенной специфичности и продолжительности реакций поствакцинального иммунного ответа у привитых ЖЧВ с использованием расширенной панели рекомбинантных белков чумного микроба представляется актуальной задачей.

## ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 – Участники исследования

В исследование был включен 51 человек, из них 34 донора декретированной группы, вакцинированных ЖЧВ по рабочим показаниям с разным числом вакцинаций и длительностью периода после последней иммунизации ЖЧВ (опытная группа, А-Total), а также 17 здоровых добровольцев, составивших группу контроля (группа В).

Исследование было одобрено комитетом по этике ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России (*протокол №12 от 30.06.2022*) и проводилось в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и Российского законодательства, регламентирующего вопросы здоровья граждан и основ клинической практики. Все доноры подписывали информированное согласие и дали разрешение на использование результатов иммунологического анализа и их медицинских данных, релевантных к тематике исследования, для опубликования в рамках диссертационной работы и в открытой печати.

Критериями включения для всех исследуемых групп являлись: совершеннолетний возраст (> 18 лет) и информированное согласие. Для опытной группы (вакцинированные ЖЧВ, А-Total) критерием включения являлось наличие одной или большего количества иммунизаций ЖЧВ; для контрольной группы В – отсутствие контактов с возбудителем чумы и/или его антигенами.

Критерии исключения для всех групп доноров составили: острый инфекционный процесс на момент взятия клинического материала; наличие аллергических реакций немедленного типа на вакцинацию ЖЧВ или другими вакцинами (отек Квинке, анафилактический шок); установленные аутоиммунные заболевания, наличие злокачественных новообразований; беременность и

кормление грудным молоком; прием иммуномодулирующих лекарственных средств (цитостатики, гормональная терапия).

Группа вакцинированных была обозначена как группа A-Total и подразделялась на две подгруппы в зависимости от сроков последней вакцинации ЖЧВ:

1. A-RV (recently vaccinated, недавно вакцинированные) – доноры, забор клинического материала (образцов периферической крови) у которых производился в течение не более, чем 1 года после последней иммунизации ЖЧВ (n=14);

2. A-EV (early vaccinated, ранее вакцинированные) – доноры, забор клинического материала у которых производился в сроки более 1 года после последней иммунизации ЖЧВ (n=20).

Иммунизация выполнялась квалифицированными медицинскими работниками противочумных организаций. Все потенциальные доноры группы A-Total на основании медицинских карт соответствующих учреждений самостоятельно заполняли разработанные нами анкеты, в которых указывали: количество и сроки иммунизаций ЖЧВ; количество и сроки иммунизаций против других особо опасных и карантинных инфекций; наличие контакта и сроки работы непосредственно с возбудителем чумы или его антигенами; системные нежелательные реакции, регистрируемые после вакцинации ЖЧВ, в случае их появления; наличие хронических соматических и аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Ни у одного из вакцинированных доноров не было зарегистрировано случаев заболевания чумой в анамнезе.

Характеристика групп участников представлена в таблице 1.

Среди участников исследования преобладали женщины (более двух третей в каждой группе) и доноры среднего возраста (по критериям ВОЗ). Кратность иммунизации ЖЧВ в группе A-Total составила от 1 до 51 введения вакцины, максимальная длительность поствакцинального периода – 30 лет (таблица 1).



**Таблица 1 – Характеристика групп доноров, участвующих в исследовании**

Параметры		Группы доноров			
		A-Total (n=34)	A-RV (n=14)	A-EV (n=20)	B (n=17)
Возраст, лет (Среднее, Min-Max)		49,3 (26–81)	46,1 (27–72)	51,5 (26–81)	40,1 (19–75)
Пол	Мужчины, абс (%)	4 (12%)	1 (7%)	3 (15%)	4 (24%)
	Женщины, абс (%)	30 (88%)	13 (93%)	17 (85%)	13 (76%)
Число иммунизаций ЖЧВ	Ме, меж- квартильный размах	11 (3,75–21,25)	13 (7,00–31,00)	9 (3,00–20,00)	-
	Min-Max	1–51	1–51	1–49	-
Длительность поствакцинального периода, лет	Ме, меж- квартильный размах	5,5 (0,00–15,00)	0 (0–0)	15 (8,00–19,50)	-
	Min-Max	0–30	0–0	2–30	-

*Примечание:* A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля.

## 2.2 – Клинический материал

Забор клинического материала осуществлялся квалифицированными сотрудниками ООО «Реабилитационный центр» (г. Саратов) и доставлялся в лабораторию в течение 1 часа. Кровь в объеме 20 мл забирали в стерильных условиях из локтевой вены, натошак.

### 2.2.1 – Получение сывороток крови

Для получения сывороток кровь собирали в стерильные стеклянные пробирки без использования антикоагулянта, отстаивали при комнатной температуре в вертикальном положении до формирования сгустка. Сформировавшийся сгусток обводили стеклянной палочкой и отбирали сыворотку в стерильные пробирки. Полученные образцы сыворотки подвергали центрифугированию в течение 15 мин при 3500 об/мин для удаления остаточных эритроцитов, надосадов отбирали в стерильные криопробирки. Сыворотки

инактивировали добавлением мертиолята натрия до конечной концентрации 1:10000 и замораживали на  $-20^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего использования.

### **2.2.2 – Выделение моноклеарных клеток периферической крови**

МНК получали из венозной крови по стандартной методике [110]. Кровь собирали в вакуумные пробирки с гепарином натрия в объеме 10–20 мл. В стерильных условиях кровь разводили средой DMEM/F12 (Биолот, Россия) в соотношении 1:1 и наслаивали на градиент с плотностью 1,077 г/мл (Histopaque, Sigma, США) в пропорции 1 объем гистобака к 3 объемам разведенной крови. Пробирки центрифугировали на скорости 400 g при  $20^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут, затем отбирали пипетманом интерфазное кольцо и переносили в свежую пробирку. МНК подвергали трехкратной отмывке от тромбоцитов в солевой среде DMEM/F12 путем центрифугирования при  $10^{\circ}\text{C}$  на скорости 300 g (1 цикл) и 250 g (2 цикла). После третьей отмывки супернатант удаляли, а осадок разводили в 1 мл среды DMEM/F12. Подсчет клеток и определение их жизнеспособности проводили в камере Горяева с применением 0,1 % трипанового синего (Биолот, Россия). К культивированию допускали образцы с клетками, жизнеспособность которых превышала 95 %.

### **2.3 – Панель рекомбинантных белковых антигенов *Y. pestis***

Панель из шести рекомбинантных антигенов *Y. pestis* F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF была получена, как описано ранее [137]. Белки, конъюгированные гистидином по N- или C-концу, получали путем клонирования в векторе *E. coli* с последующей очисткой аффинной хроматографией на  $\text{Ni}^{2+}$ -содержащей матрице. Для удаления остатков липополисахарида белки подвергали обработке на аффинной колонке с полимиксином В (AffiPrep Polymyxin resin, BioRad, США). Отсутствие контаминации ЛПС подтверждали с использованием коммерческого набора QCL-1000 Chromogenic LAL Assay kit (Fisher Scientific, США). Все рекомбинантные белки из используемой в исследовании панели относились к высокоочищенным, свободным от ЛПС, с уровнем содержания последнего  $< 0,1$  EU/мл.

В качестве контролей в работе использовали инактивированные взвеси бактерий вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, коммерческий лиофилизат которого был получен из ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора. Работа с возбудителями III группы ПБА проводилась на базе лицензированной научной бактериологической лаборатории ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского». Для целей работы бактерии вакцинного штамма выращивали на 1,5 % твердой питательной среде (VactoAgar, Difco, США) с добавлением 2,5 % Heart infusion broth (Difco, США) при двух температурных режимах: при температуре 26°C в течение 48 часов (Yp26); при температуре 26°C в течение 24 часов с последующей инкубацией посевов при 37°C на протяжении 18–24 часов (Yp37). По окончании инкубации бактериальные клетки смывали с чашек забуференным фосфатно-солевым раствором. Для постановки ТИФА и иммуноблоттинга использовали инактивированные двухсуточные культуры вакцинного штамма EV НИИЭГ в концентрации  $1 \times 10^9$  м.кл./мл (ТИФА) и  $25 \times 10^9$  м.кл./мл (иммуноблоттинг), для реакции бластной трансформации лимфоцитов – в концентрации  $2 \times 10^6$  м.кл./мл. Концентрацию клеток определяли на спектрофотометре SmartSpecPlus (BioRad, США).

## **2.4 – Иммунологические методы**

Для характеристики иммунореактивности сывороток крови вакцинированных ЖЧВ и наивных доноров были разработаны экспериментальные иммунотесты на основе двух вариантов иммуноанализа, ТИФА и иммуноблоттинга, и панели рекомбинантных сенситинов. Для оценки участия указанных антигенов в индукции вакциноиндуцированных реакций клеточного иммунитета применяли реакцию бластной трансформации лимфоцитов и исследование цитокинового профиля в супернатантах от антиген-стимулированных МНК.

### **2.4.1 – Постановка твердофазного иммуноферментного анализа**

Условия ТИФА подбирали индивидуально для каждого рекомбинантного полипептида из панели.

Для F1, LcrV, YopM использовали следующий конечный вариант протокола.

Препараты белков разводили в 0,1 М карбонатном буфере до концентрации 2 мкг/мл, вносили в лунки 96-луночного планшета Immulon 2 HB plates (Thermo Scientific, США) и инкубировали при температуре 4°C в течение 18 часов. По окончании сорбции антигенов планшеты однократно промывали фосфатно-солевым буфером (phosphate saline buffer, PBS). На следующем этапе свободные сайты связывания блокировали 20 % раствором сыворотки новорожденного теленка (newborn calf serum, NCS, Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере (BioRad, США) в течение 2 часов при температуре 22°C и орбитальном покачивании в шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan, Россия), затем промывали однократно промывочным раствором (PBS с добавлением 0,05 % Tween-20, PBST). Сыворотки крови предварительно разводили в соотношении 1:25 в 20 % NCS в PBS и вносили в опытные и контрольные (без антигена) лунки планшета в дуплетах в конечном разведении 1:50. Затем сыворотки титровали до разведения 1:12800 и инкубировали при температуре 22°C в течение 2 часов на шейкере при орбитальном перемешивании. После пятикратной промывки добавляли антивидовой конъюгат, меченый пероксидазой хрена (Goat Anti-Human IgG (Fab specific), Sigma, США), и выдерживали планшеты на орбитальном шейкере при температуре 22°C в течение 1 часа. По окончании инкубации планшеты промывали семь раз и вносили хромогенный субстрат ТМВ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Sigma, США). Реакцию останавливали добавлением 1М серной кислоты и учитывали на планшетном ридере BioTek Synergy HT (BioTek Instruments Inc., США) при длине волны 450 нм и отсекающем фильтре 630 нм. Позитивной считали реакцию, не менее чем в два раза превышающую по интенсивности цветового сигнала среднее значение ОП, полученное из контрольных лунок без антигена с тем же разведением сыворотки.

Для P1a и YopE использовали описанный выше протокол анализа со следующими модификациями: перед сорбцией антигены разводили в 8М мочеvine, растворенной в 0,1 М карбонатном буфере при постепенном нагревании до 45 или 97°C.

ТИФА с YscF в качестве сенситина проводили согласно обоим описанным выше протоколам, с использованием в качестве твердой фазы планшетов Maxisorb (Nunc, США).

#### **2.4.2 – Постановка иммуоблоттинга**

Для постановки иммуоблоттинга рекомбинантные белки и инактивированные взвеси вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенные при 26°C и 37°C, как описано выше, фракционировали путем электрофореза в денатурирующих условиях в 12,5 % или 15 % ПААГ-SDS по методу U.K. Laemmli [209].

##### **2.4.2.1 – Электрофорез белковых фракций**

По 1 мл препаратов рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF в концентрации 1 мг/мл и цельноклеточных лизатов вакцинного штамма EV НИИЭГ в концентрации  $25 \times 10^9$  м.кл./мл смешивали в соотношении 1:1 с лизирующим буфером, содержащим 0,125 М Трис-HCl, 20 % глицина, 10 % 2-меркаптоэтанола и 4 % SDS. Полученные образцы выдерживали на водяной бане при температуре 100°C в течение 2 минут, затем добавляли 0,1 % раствор бромфенолового синего в качестве лидирующего красителя. Лизаты вносили в лунки концентрирующего геля в объеме 10 мкл. Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra Cell (BioRad, США) в трис-глициновом-SDS буфере, (25 mM Трис, 0,192 mM глицин, 0,01 % SDS, pH 8,3), при силе тока 20 mA и напряжении 100 V для 4 % концентрирующего геля и 40 mA, 200 V для 12,5 % разделяющего геля. Молекулярные веса белков определяли с использованием стандарта для SDS-PAGE (BioRad, США). Для приготовления референтных гелей по окончании электрофореза проводили окрашивание белковых фракций 0,125 % (W/V) раствором Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad, США) в 50 % (V/V) этаноле и 10 % (V/V) ледяной уксусной кислоте в течение 18 часов. Окрашенные гели обесцвечивали в течение 40 минут – 2 часов в зависимости от размеров геля в водном растворе, содержащем 45 % (V/V) этанола

и 10 % (V/V) ледяной уксусной кислоты, затем отмывали в деионизованной воде до окончательного просветления промежутков, не содержащих белков.

#### **2.4.2.2 – Иммуноблоттинг**

Иммуноблоттинг проводили по базовому протоколу [137] с модификациями. Предварительно фракционированные в 12,5 % или 15 % SDS-ПААГ препараты рекомбинатных белков и лизаты бактерий, выращенных в различных условиях культивирования, переносили в течение 30 минут на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,22 мкм (BioRad, США) буфером для переноса (25 mM Трис, 192 mM глицин, 20% метанола, pH 8,3) с использованием аппарата для полусухого блота TransBlot SD (BioRad, США). Контроль переноса осуществляли окрашиванием мембран в растворе Ponceau S (Serva, Германия). Далее мембраны отмывали деионизованной водой и блокировали свободные сайты связывания 20 % раствором сыворотки новорожденного теленка (NCS, Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0,05 % Tween-20 (BioRad, США) в течение 1 часа при температуре 25°C и орбитальном покачивании в шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan, Россия). Мембраны однократно отмывали промывочным раствором (PBST). Образцы сывороток крови разводили в 20 % растворе NCS в PBST до конечной концентрации 1:200 и инкубировали с мембранами при 4°C в течение 18 часов. Не связавшиеся антитела четырехкратно отмывали, затем вносили антивидовой конъюгат (Goat Anti-Human IgG Antibody, F(ab')<sub>2</sub>, HRP conjugate, Chemicon, США), разведенный в 20 % растворе NCS в PBST, и инкубировали мембраны 2 часа при 25°C и орбитальном покачивании. После четырехкратной промывки добавляли хромогенный субстрат (TMB, Sigma, США) для мембран и инкубировали НЦМ в течение 15 минут в темноте; затем мембраны помещали на 1 минуту в деионизованную воду, после чего высушивали на фильтровальной бумаге без доступа света. Учет реакции проводили визуально по окраске специфических реплик.

### **2.4.3 – Постановка реакции бластной трансформации лимфоцитов и оценка антиген-стимулированного пролиферативного ответа**

Мононуклеарные клетки вакцинированных ЖЧВ и наивных доноров высевали в 96-луночные планшеты Costar (Corning, США) в концентрации  $1 \times 10^5$  кл./лунке и культивировали в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия), дополненной 10 % фетальной сывороткой коров (FBS, Sigma, США) и 1 % раствора антибиотика-антимикотика (Sigma, США), в течение 6 дней. Клетки стимулировали в квадриплетах добавлением высокоочищенных рекомбинатных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF (в дозировке 5 мкг/мл каждый) и инактивированных взвесей бактерий вакцинного штамма EV НИИЭГ Yp26 и Yp37 в концентрации  $2 \times 10^6$  м.кл./мл. В качестве негативного контроля служила среда без добавления сенситинов, в качестве позитивного сигнала использовали коммерческий митоген ConA (Sigma, США) в дозировке 2 мкг/мл. Пролиферативный ответ учитывали с использованием иммуноферментного набора на основе бромдезоксиуридина (BrdU) и гомологичных хемилюминесцентных моноклональных антител Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) (Roche Applied Science, США) в соответствии с инструкциями производителя. Хемилюминесценцию измеряли на ридере BioTek Synergy HT (BioTek Instruments Inc., США). Пролиферативный ответ выражали в виде индекса пролиферации (ИП), подсчитанного как отношение среднего значения относительных световых единиц в сек (rlu/сек), полученных от лунок с антиген-стимулированными МНК, к среднему значению rlu/сек, зарегистрированному от нестимулированного контроля.

### **2.4.4 – Оценка антиген-стимулированной продукции Th1/Th2/Th17 цитокинов**

На 5-е сутки из опытных и контрольных лунок с культивируемыми МНК забирали супернатанты и замораживали на  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего исследования цитокинового профиля с применением коммерческих наборов ТИФА (Вектор-Бест, Россия, Цитокин, Россия). Анализировали спонтанную, митоген- и антиген-

стимулированную продукцию следующих цитокинов: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Th1), IL-4, IL-10 (Th2), IL-17A (Th17).

## 2.5 – Статистический анализ

Хранение и структурирование первичных данных, полученных в ходе выполнения исследования, осуществляли в программе Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Статистическую обработку и графическое представление результатов выполняли с использованием программы GraphPad Prism v. 6.01 (GraphPad Software Inc., США). Для статистического анализа были использованы непараметрические методы, обладающие мощностью в отношении малых выборок:

- точный критерий Фишера – в случае сравнения независимых групп по бинарному признаку;
- критерий Вилкоксона – при сравнении двух связанных групп по количественному признаку;
- критерий Манна-Уитни – при сравнении двух независимых выборок по количественному признаку;
- критерий Краскелла-Уоллиса с апостериорным тестом Данна – при сравнении трех и более независимых выборок по количественному признаку.

Для выявления и оценки корреляционных связей применяли непараметрический тест по Спирмену и шкалу Чеддока [239].

Определение диагностической информативности экспериментальных иммунотестов проводили с применением стандартных статистических методов. Для количественных данных использовали анализ кривой операционной характеристики (Receiver Operating characteristic Curve, ROC-анализ) [223] с вычислением параметра площади под кривой (Area Under Curve, AUC), отражающего качество диагностической модели (AUC = 0,9–1,0 – отличное качество, AUC = 0,8–0,9 – очень хорошее, AUC = 0,7–0,8 – хорошее, AUC = 0,6–0,7 – среднее и AUC = 0,5–0,6 – неудовлетворительное качество модели). Пороговое значение титров специфических антител в иммунотесте определяли по



максимальному значению индекса Юдена, отражающего разницу между долями истинно положительных и ложноположительных результатов.

Диагностическую чувствительность и специфичность иммунотестов с бинарным вариантом анализа определяли в соответствующем разделе программного обеспечения GraphPad Prism. Чувствительность теста определялась как истинно положительные (вакцинированные) / (истинно положительные + ложно отрицательные)  $\times$  100; специфичность – как истинно отрицательные (наивные доноры) / (истинно отрицательные + ложно положительные)  $\times$  100.

## **ГЛАВА 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Основной целью нашего исследования было выявление антиген-специфических реакций адаптивного иммунного ответа, индуцированного вакцинацией ЖЧВ, для определения потенциальных иммунологических маркеров эффективности вакцинации. Для достижения поставленной цели необходимо было определить антигенную специфичность и длительность иммунного ответа у доноров, иммунизированных ЖЧВ, в экспериментальных иммунотестах с использованием панели высокоочищенных рекомбинантных сенситинов.

### **3.1 – Гуморальный ответ привитых живой чумной вакциной доноров к панели рекомбинантных белков**

Иммунизация ЖЧВ у биомоделей и человека сопровождается выраженным антительным ответом. При этом спектр индуцируемых специфических антител и магнитуда гуморального ответа у человека и биомоделей может значительно различаться [81, 137, 190, 291]. Исследования с применением технологии пептидных микрочипов демонстрируют потенциальную вовлеченность значительного числа иммуногенных белков в индукцию образования антител в ответ на введение живой аттенуированной вакцины EV76 – прародителя штамма EV линии НИИЭГ [291]. В то же время специфичность вакциноиндуцированного ответа у людей, привитых ЖЧВ, исследована недостаточно.

Целью данного раздела работы явилось определение антигенной специфичности сывороточных антител, индуцированных вакцинацией ЖЧВ у доноров с использованием панели наиболее значимых иммуногенов чумного микроба, а также поиск потенциальных гуморальных маркеров эффективной противочумной вакцинации и оптимизация метода их детекции.

### 3.1.1 – Иммунореактивность сывороток вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров к панели рекомбинантных белков в твердофазном иммуноферментном анализе

На первом этапе работы для характеристики гуморального иммунного ответа вакцинированных ЖЧВ исследовали иммунореактивность сывороток в экспериментальных вариантах ТИФА. Для этого были разработаны и апробированы ряд модификаций иммуноферментного анализа, конечные протоколы которых подробно изложены в разделе «Материалы и методы». Для повышения чувствительности анализа и предотвращения потери даже минимальных титров антител порог отсечения (cut-off) не устанавливали и все разведения сывороток в лунках с сенситинами, ОП которых превышала в два и более раз таковую в лунках без сенситина, считали положительно реагирующими.

В *таблице 2* представлены данные о структуре и специфичности антительного ответа доноров по числу серопозитивных сигналов (титры антител  $\geq 1:50$ ), зарегистрированных в ТИФА при тестировании с панелью рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF.

**Таблица 2 – Частота обнаружения антител к F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF у вакцинированных живой чумной вакциной и невакцинированных доноров методом твердофазного иммуноферментного анализа**

Группы доноров	Процент положительных ответов (число иммунореактивных сывороток / общее число исследованных сывороток), полученных при тестировании с белками:					
	F1	LcrV	Pla	YopM	YopE	YscF
A-Total	48,5 (16/33)	6,3 (2/32)	<b>35,3</b> <b>(12/34)</b>	40,6 (13/32)	3,2 (1/31)	50,0 (17/34)
A-RV	64,3 (9/14)	0,0 (0/14)	<b>71,4 *</b> <b>(10/14)</b>	21,4 (3/14)	0,0 (0/14)	50,0 (7/14)
A-EV	36,8 (7/19)	11,1 (2/18)	<b>10,0*</b> <b>(2/20)</b>	55,5 (10/18)	5,9 (1/17)	50,0 (10/20)
B	25,0 (4/16)	0,0 (0/16)	100,0 (16/16)	68,8 (11/16)	0,0 (0/16)	56,3 (9/16)

*Примечание:* A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля. Выделено жирным шрифтом – частота встречаемости антител достоверно ниже, чем в контрольной группе ( $p < 0,05$ ), тест Фишера; \* – частота встречаемости антител достоверно различается в группах A-RV и A-EV, ( $p < 0,05$ ), тест Фишера

Как видно из данных, представленных в *таблице 2*, в группе вакцинированных ЖЧВ (А-Total) методом ТИФА были выявлены антитела ко всем сенситинам из панели. При этом наибольшее число серопозитивных ответов было зарегистрировано, в порядке убывания, к белкам YscF, F1, YopM, и Pla: антитела к ним были обнаружены в одной трети – половине случаев. Специфические иммуноглобулины к LcrV и YopE были детектированы только у единичных доноров.

Сравнение распределения серопозитивных ответов к используемым сенситинам в группах А-RV и А-EV показало, что антитела к F1 в 1,7 раз чаще выявлялись у недавно вакцинированных доноров, а сывороточные иммуноглобулины, специфичные к YopM, наоборот, в 2,6 раза чаще обнаруживались у привитых со сроком поствакцинального периода более года, однако статистически значимыми данные различия не являлись. Антитела к Pla достоверно чаще (в 7 раз) регистрировались в группе А-RV ( $p < 0,001$ ). Частота обнаружения анти-YscF-антител была одинакова в обеих группах и составила половину ответов. Антитела к LcrV и YopE были зарегистрированы только в группе А-EV, доля положительных ответов составила менее 12%.

В контрольной группе В были выявлены антитела к 4 белкам из 6 тестируемых. Абсолютно все невакцинированные доноры (100%) были серопозитивны к активатору плазминогена Pla, при этом доля положительных ответов к Pla в группе В достоверно превышала серопозитивные ответы во всех группах вакцинированных ЖЧВ (А-Total:  $p < 0,0001$ , А-RV:  $p < 0,05$ , А-EV:  $p < 0,0001$ ). Более 2/3 сывороток невакцинированных доноров давали позитивную реакцию с YopM, более половины – с YscF и только четверть – с капсульным антигеном F1. Ни один из контрольных доноров не был серопозитивен к LcrV и YopE по данным ТИФА.

Тренды, выявленные для частоты обнаружения антител, специфичных к сенситинам рабочей панели, в целом были применимы к уровню антительного ответа при оценке средних геометрических титров (СГТ). Как видно из *таблицы 3*,

в группе A-Total средние геометрические значения титров регистрировались, в порядке убывания, к YscF > F1 > YopM > Pla; при этом в группе A-RV максимальные СГТ были детектированы к Pla, а в группе A-EV – к YscF. Минимальные СГТ у вакцинированных ЖЧВ доноров были зарегистрированы к LcrV и YopE.

**Таблица 3 – Анализ средних геометрических титров (СГТ) специфических антител, выявляемых к рекомбинантным белкам F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF у вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров**

Рекомбинатные белки	СГТ (95% ДИ), регистрируемые в группах доноров:			
	A-Total	A-RV	A-EV	B
F1	76,10 (46,73–123,9)	100,0 (45,62–219,2)	62,23 (31,89–121,5)	33,86 (25,07–45,73)
LcrV	29,09 (23,41–36,16)	25,00 (25,00–25,00)	32,73 (22,06–48,57)	25,00 (25,00–25,00)
Pla	53,15 (36,07–78,33)	110,4 (56,88–214,3)	31,86 (22,38–45,37)	383,0 (349,3–420,1)
YopM	59,46 (38,48–91,89)	50,0 (22,12–113,0)	68,4 (40,52–114,3)	100,0 (53,13–188,2)
YopE	26,14 (23,86–28,64)	25,00 (25,00–25,00)	27,12 (22,82–32,24)	25,00 (25,00–25,00)
YscF	90,31 (52,46–155,5)	64,04 (35,15–116,7)	114,9 (48,98–269,4)	154,2 (48,78–487,6)

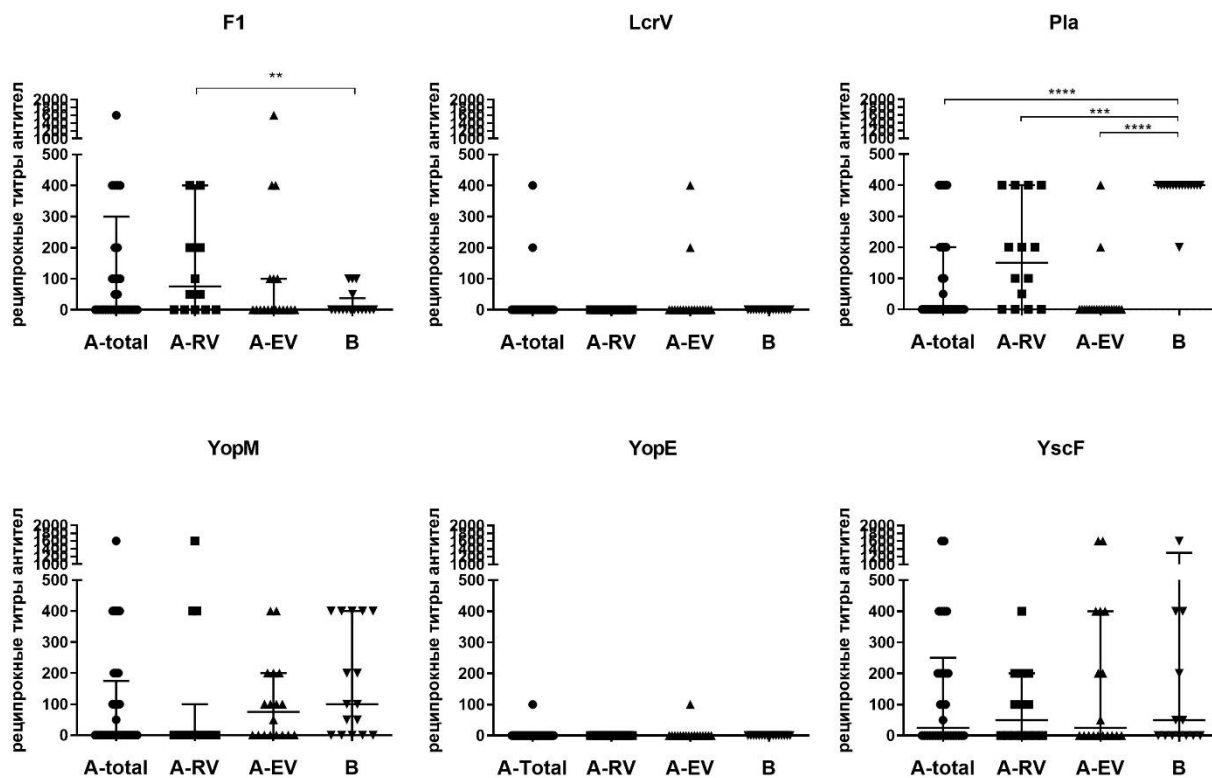
*Примечание:* A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля; ДИ – доверительный интервал. При расчете СГТ для сывороток, в которых титры не определялись (<1:50), значение титров принималось как равное 1:25.

В контрольной группе невакцинированных доноров СГТ к Pla регистрировались на максимальных значениях, почти в два раза превышая СГТ к YscF и в три – СГТ к YopM.

Результаты, полученные при сравнении титров антител, выявленных к белкам рабочей панели у вакцинированных ЖЧВ, с титрами, регистрируемыми у контрольных доноров группы B, представлены на *рисунке 1*.

Проведенный анализ выявил достоверное повышение уровня антител к F1 в группе недавно вакцинированных доноров ( $p < 0,01$ ). В то же время титры антител

к Pla в группах A-Total, A-RV и A-EV были достоверно ниже, чем в группе контроля ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,001$ , соответственно). Во всех остальных случаях титры антител в сравниваемых группах регистрировались в пределах сопоставимых величин.



**Рисунок 1 – Сравнение титров антител, определяемых к рекомбинантным белкам F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF в твердофазном иммуноферментном анализе у вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров**

*Примечание:* A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля. Критерий Манна-Уитни: \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ . Титры  $< 1:50$  отображены как равные нулю.

Таким образом, исследование иммунореактивности сывороток вакцинированных ЖЧВ и наивных доноров методом ТИФА выявило серопревалентность вакцинированных доноров ко всем 6 исследуемым сенситинам. Доминантный, как по числу по частоте встречаемости, так и по уровню выявляемых антител, гуморальный ответ был зарегистрирован к YscF, F1, YopM и Pla, однако антитела к этим же 4 белкам были выявлены у невакцинированных контрольных доноров. Серопозитивность к Pla и уровни

гомологичных антител у последних достоверно превышали аналогичные показатели во всех группах вакцинированных доноров. Характерным для группы недавно вакцинированных доноров было достоверное повышение титров анти-F1-антител. Антитела к LcrV и YopE были зарегистрированы только у вакцинированных ЖЧВ, однако выявлялись у единичных доноров и в минимальных титрах.

### **3.1.2 – Иммунореактивность сывороток вакцинированных живой чумной вакциной и наивных доноров к панели рекомбинантных белков методом иммуоблоттинга**

На предыдущем этапе при использовании метода ТИФА нами была выявлена низкая серопревалентность сывороток вакцинированных ЖЧВ доноров к ряду белков, признанных главными иммуногенами возбудителя чумы. Так, в группе недавно вакцинированных доноров было зарегистрировано менее 65 % серопозитивных ответов к капсульному антигену F1 и ни одной положительной реакции с LcrV. В связи с этим, для прояснения роли белков из рабочей панели в формировании гуморального иммунного ответа, индуцированного вакцинацией ЖЧВ, было решено провести тестирование сывороток с применением иммуоблоттинга – полуколичественного метода, позволяющего визуализировать взаимодействие антигена и антитела. Как известно, в отличие от ТИФА, преимущественно выявляющего конформационные иммунореактивные эпитопы, иммуоблоттинг, в первую очередь, направлен на выявление линейных антигенных детерминант, поскольку белок перед переносом на мембрану подвергается денатурации и фракционированию в SDS-PAGE, и, соответственно, теряет третичную и четвертичную структуры [207]. Считается, что данный метод обладает большей специфичностью по сравнению с ТИФА за счет идентификации специфических бэндов, соответствующих таргетному сенситину [175]. Кроме того, в ряде случаев продемонстрирована его большая чувствительность по сравнению с иммобилизацией сенситина на пластике, в частности, в ряде работ по характеристике постинфекционного и поствакцинального иммунитета к чуме [77, 193]. Результаты анализа суммированы в *таблице 4*.

**Таблица 4 – Частота обнаружения антител к панели рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF у вакцинированных живой чумной вакциной и невакцинированных доноров методом иммуноблоттинга**

Группы доноров (n)	Серопозитивность	Панель рекомбинантных сенситинов					
		F1	LcrV	Pla	YopM	YopE	YscF
1. A-Total (n=34)	Абс (%)	<b>26 (76,5)</b>	7 (20,6)	<b>25 (73,5)</b>	15 (44,1)	6 (17,6)	<b>25 (73,5)</b>
	p1-4	<b>&lt;0,01</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,0001</b>
2. A-RV (n=14)	Абс (%)	<b>13 (92,9)</b>	2 (14,3)	<b>10 (71,4)</b>	8 (57,1)	<b>4 (28,6)</b>	<b>14 (100,0)</b>
	p2-4	<b>&lt;0,001</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	<b>&lt;0,0001</b>
3. A-EV (n=20)	Абс (%)	<b>13 (65,0)</b>	5 (25,0)	<b>15 (75,0)</b>	7 (35,0)	2 (10,0)	<b>11 (55,0)</b>
	p3-4	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	<b>&lt;0,05</b>	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,001</b>
	p2-3	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<b>&lt;0,01</b>
4. B (n=17)	Абс (%)	5 (29,4)	4 (23,5)	17 (100,0)	6 (35,3)	0 (0,0)	0 (0,0)

*Примечание:* A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля. Тест Фишера: p1-4 – вероятность при сравнении групп A-Total и B; p2-4 – вероятность при сравнении групп A-RV и B; p3-4 – вероятность при сравнении групп A-EV и B; p2-3 – вероятность при сравнении групп A-RV и A-EV. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ).

Как видно из представленных данных, методом иммуноблоттинга наиболее часто в группе A-Total регистрировались специфические антитела к рекомбинантному белку F1 – доля серопозитивных доноров составила более 2/3 вакцинированных ЖЧВ. Несколько реже и с одинаковой частотой выявлялись антитела к Pla и YscF, тогда как сывороточные иммуноглобулины к YopM определялись менее чем у половины доноров. Частота встречаемости антител к LcrV и YopE не превышала 20%.

В группе недавно вакцинированных доноров абсолютно во всех сыворотках были зарегистрированы антитела к YscF и в более чем 90% случаев – к F1. Частота встречаемости антител к остальным белкам из панели была следующей: более чем 2/3 сывороток были иммунореактивны к Pla, более половины – к YopM, более четверти – к YopE и менее 1/6 – к LcrV. При этом в группе A-EV частота выявления



анти-YscF антител достоверно снижалась вдвое ( $p < 0,01$ ), а анти-F1 и анти-YopM иммуноглобулинов – в 1,4 и 1,6 раз, соответственно, однако изменения не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ). Доля позитивных ответов к Pla в группах A-RV и A-EV не различалась. Антитела к YopE у недавно вакцинированных ЖЧВ выявлялись в 2,8 раз чаще, чем у давно вакцинированных доноров, а к LcrV – в 1,7 раз реже.

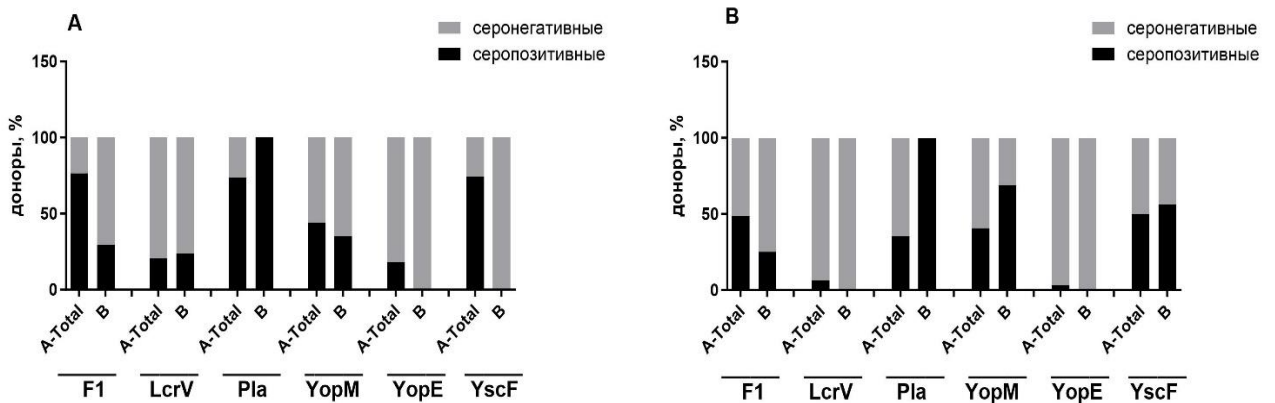
В контрольной группе В были обнаружены антитела к 4 белкам из 6 тестируемых. Как и при использовании ТИФА, 100% невакцинированных доноров оказались серопозитивны к Pla. Около трети сывороток реагировали с YopM и F1, и менее четверти – с LcrV. Антител к YopE и YscF методом иммуноблоттинга в группе контроля выявлено не было.

Сравнение частоты выявления антител к рекомбинантным белкам рабочей панели между группами вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров показало, что у привитых ЖЧВ доноров достоверно чаще встречались антитела к YscF (A-Total:  $p < 0,0001$ , A-RV:  $p < 0,0001$ , A-EV:  $p < 0,01$ ) и F1 (A-Total:  $p < 0,01$ , A-RV:  $p < 0,01$ , A-EV:  $p < 0,05$ ), а у невакцинированных доноров – к Pla ( $p < 0,05$ ). Характерным для группы A-RV также было достоверное увеличение позитивных ответов к YopE ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, при исследовании методом иммуноблоттинга максимальное количество серопозитивных ответов среди вакцинированных ЖЧВ было зарегистрировано к YscF, F1 и Pla. При этом, антитела к первым двум белкам достоверно чаще выявлялись в группе вакцинированных доноров, а к Pla – в контрольной невакцинированной группе. Частота выявления антител к YopM и LcrV не отличалась между группами вакцинированных ЖЧВ и контролем. Характерным для недавно вакцинированных доноров было достоверное увеличение частоты встречаемости анти-YopE-антител.

При сравнении результатов, полученных при использовании обоих серологических методов, следует отметить, что результаты экспериментальных вариантов иммуноблота, проведенного нами с целью верификации серопревалентности вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров к

рекомбинантным белкам рабочей панели, подтвердили полученные нами в ТИФА данные о достоверной сероконверсии к F1 в группе A-RV, а также о достоверно значимом снижении антител к Pla в группе привитых ЖЧВ. Однако в целом иммуноблоттинг в нашем исследовании оказался более информативным, чем ТИФА. В большинстве случаев применение иммуноблоттинга позволяло значительно (в 1,5–5,5 раз) увеличить выявление серопозитивных доноров, как среди вакцинированных ЖЧВ, так и среди контрольных волонтеров (*рисунок 2*).



**Рисунок 2 – Эффективность выявления в реакциях иммуноблоттинга (А) и твердофазного иммуноферментного анализа (В) серопозитивных доноров, специфичных в отношении рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF, в группах A-Total и B**

Как видно из *рисунка 2*, основные тренды в соотношении положительных ответов у вакцинированных и невакцинированных доноров были сохранены при использовании экспериментальных вариантов обоих методов для большинства сенситинов из рабочей панели. Максимальные расхождения были получены при исследовании иммунореактивности к YscF: в ТИФА антитела к данному белку были обнаружены у 50 % вакцинированных и контрольных доноров, тогда как в иммуноблоте анти-YscF антитела выявлялись исключительно у вакцинированных ЖЧВ. Полученные данные позволяют предположить, что специфичными для вакцинированных ЖЧВ были антитела, гомологичные секвенциальным эпитопам антигена, определяемым методом иммуноблоттинга, а не конформационным эпитопам YscF, чаще выявляемым в ТИФА. Кроме того, большая чувствительность иммуноблоттинга, вероятно, связана с техническими особенностями метода –

надежной сорбцией сенсирина на НЦМ, предотвращающей его потерю на этапах отмывок. Эта особенность могла определить значительные расхождения между результатами определения антител к YscF, белку с чрезвычайно малой молекулярной массой (~6,5 кДа), наблюдаемые в ТИФА и иммуноблоте.

### 3.1.3 – Комбинации белков, вовлеченных в гуморальный ответ доноров, вакцинированных живой чумной вакциной

Важной, на наш взгляд, характеристикой антительного ответа в исследуемых группах было его разнообразие по количеству сенсиринов, вовлеченных в специфическое взаимодействие с индивидуальными сыворотками. Для оценки данного параметра использовали результаты иммуноблоттинга, ввиду удобства применения бинарной переменной (есть ответ – нет ответа).

В нашем исследовании индивидуальные сыворотки крови вакцинированных ЖЧВ доноров наиболее часто давали положительную реакцию с 4 сенсиринами из панели одновременно. Этот показатель в 5,9–8,5 раз превышал аналогичный в группе В ( $p < 0,001$ ) (таблица 5).

**Таблица 5 – Детекция антител к одному или нескольким рекомбинантным белкам рабочей панели в сыворотках крови вакцинированных живой чумной вакциной и контрольных наивных доноров**

Группы доноров (число доноров в группе)	Сыворотки (абс (%)), реагирующие с сенсиринами в количестве:							Контрольными (Yp26 и Yp37)
	0	1	2	3	4	5	6	
A-Total (n=34)	3 (8,8)	1 (2,9)*	7 (20,6)	7 (20,6)	12 (35,3)**	4 (11,8)	0 (0)	34 (100)
A-RV (n=14)	0 (0)	0 (0)*	2 (14,3)	3 (21,4)	7 (50,0)**	2 (14,3)	0 (0)	14 (100)
A-EV (n=20)	3 (15,0)	1 (5,0)*	5 (25,0)	4 (20,0)	5 (25,0)	2 (10,0)	0 (0)	20 (100)
В (n=17)	0 (0)	8 (47,1)	4 (23,5)	4 (23,5)	1 (5,9)	0 (0)	0 (0)	17 (100)

*Примечание:* данные суммированы по результатам иммуноблоттинга. Тест Фишера; \* – ответ, регистрируемый достоверно реже в опытной группе по сравнению с контрольной ( $p < 0,001$ ); \*\* – ответ, регистрируемый достоверно чаще в опытной группе по сравнению с контрольной ( $p < 0,05$ ).

Напротив, в группе невакцинированных доноров сыворотки крови чаще всего (в 47,1 % случаев) реагировали только с 1 белком из панели, что достоверно превышало аналогичный показатель в группах привитых ЖЧВ ( $p < 0,05$ ).

В целом антительный ответ вакцинированных доноров отличался большим разнообразием и включал как нон-респондеров (доноры, сыворотки крови которых не реагировали ни с одним из белков панели), так и взаимодействие с 1–5 сенситинами (таблица 5).

Учитывая это, нами было определены наиболее часто встречающиеся комбинации белков, антитела к которым одновременно выявлялись в иммуноблоте у индивидуального донора, вакцинированного ЖЧВ. Всего было подсчитано 54 возможных сочетания сенситинов (от 2 до 6). Из них в группе A-Total был зафиксирован ответ на 49 комбинаций, в группе A-RV – на 37, в группе A-EV – на 43. При этом число комбинаций белков, антитела к которым были зарегистрированы у контрольных не вакцинированных ЖЧВ доноров, составило 11 (таблица 6).

**Таблица 6 – Частота встречаемости антител к комбинациям белков рабочей панели у вакцинированных живой чумной вакциной и контрольных наивных доноров**

Комбинации сенситинов	Количество серопозитивных доноров в группе:							
	A-Total, n=34		A-RV, n=14		A-EV, n=20		B, n=17	
	abc	%	abc	%	abc	%	abc	%
<i>l</i>	2	3	4	5	6	7	8	9
F1+LcrV	6	17,6	2	14,3	4	20,0	1	5,9
F1+Pla	20	58,8	9	64,3	11	55,0	5	29,4
<b>F1+YopM</b>	13	38,2	<b>8</b>	<b>57,1</b>	5	25,0	3	17,6
<b>F1+YopE</b>	6	17,6	<b>4</b>	<b>28,6</b>	1	5,0	0	0,0
<b>F1+YscF</b>	<b>22</b>	<b>64,7</b>	<b>13</b>	<b>92,9</b>	<b>9</b>	<b>45,0</b>	0	0,0
LcrV+Pla	6	17,6	1	7,1	5	25,0	4	23,5
LcrV+YopM	4	11,8	1	7,1	4	20,0	3	17,6
LcrV+YopE	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0

<i>1</i>	2	3	4	5	6	7	8	9
LcrV+YscF	5	14,7	2	14,3	3	15,0	0	0,0
Pla+YopM	12	35,3	5	35,7	7	35,0	6	35,3
Pla+YopE	5	14,7	3	21,4	2	10,0	0	0,0
<b>Pla+YscF</b>	<b>19</b>	<b>55,9</b>	<b>10</b>	<b>71,4</b>	<b>9</b>	<b>45,0</b>	0	0,0
YopM+YopE	4	11,8	3	21,4	1	5,0	0	0,0
<b>YopM+YscF</b>	<b>12</b>	<b>35,3</b>	<b>8</b>	<b>57,1</b>	4	20,0	0	0,0
<b>YopE+YscF</b>	5	14,7	<b>4</b>	<b>28,6</b>	1	5,0	0	0,0
F1+LcrV+Pla	5	14,7	1	7,1	4	20,0	1	5,9
F1+LcrV+YopM	4	11,8	1	7,1	3	15,0	1	5,9
F1+LcrV+YopE	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0
F1+LcrV+YscF	4	11,8	2	14,3	2	10,0	0	0,0
F1+Pla+YopM	10	29,4	5	35,7	5	25,0	3	17,6
F1+Pla+YopE	3	8,8	3	21,4	1	5,0	0	0,0
<b>F1+Pla+YscF</b>	<b>16</b>	<b>47,1</b>	<b>9</b>	<b>64,3</b>	<b>6</b>	<b>30,0</b>	0	0,0
F1+YopM+YopE	4	11,8	3	21,4	1	5,0	0	0,0
<b>F1+YopM+YscF</b>	<b>11</b>	<b>32,4</b>	<b>8</b>	<b>57,1</b>	4	20,0	0	0,0
F1+YopE+YscF	4	11,8	4	28,6	0	0,0	0	0,0
LcrV+Pla+YopM	4	11,8	0	0,0	4	20,0	3	17,6
LcrV+Pla+YopE	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0
LcrV+Pla+YscF	4	11,8	1	7,1	3	15,0	0	0,0
LcrV+YopM+YopE	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0
LcrV+YopM+YscF	3	8,8	1	7,1	2	10,0	0	0,0
Pla+YopM+YopE	3	8,8	2	14,3	1	5,0	0	0,0
<b>Pla+YopM+YscF</b>	<b>9</b>	<b>26,5</b>	<b>5</b>	<b>35,7</b>	4	20,0	0	0,0
Pla+YopE+YscF	4	11,8	3	21,4	1	5,0	0	0,0
YopM+YopE+YscF	3	8,8	3	21,4	0	0,0	0	0,0
F1+LcrV+Pla+YopM	3	8,8	0	0,0	3	15,0	1	5,9
F1+LcrV+Pla+YopE	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0
F1+LcrV+Pla+YscF	3	8,8	1	7,1	2	10,0	0	0,0
F1+LcrV+YopM+YopE	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0
F1+LcrV+YopM+YscF	2	5,9	1	7,1	1	5,0	0	0,0
F1+Pla+YopM+YopE	3	8,8	2	14,3	1	5,0	0	0,0

<i>1</i>	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>F1+Pla+YopM+YscF</b>	<b>8</b>	<b>23,5</b>	<b>5</b>	<b>35,7</b>	3	15,0	0	0,0
F1+Pla+YopE+YscF	3	8,8	3	21,4	0	0,0	0	0,0
F1+YopM+YopE+YscF	3	8,8	3	21,4	0	0,0	0	0,0
LcrV+Pla+YopM+YopE	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0
LcrV+Pla+YopM+YscF	2	5,9	0	0,0	2	10,0	0	0,0
Pla+YopM+YopE+YscF	2	5,9	2	14,3	0	0,0	0	0,0
F1+LcrV+Pla+YopM+YopE	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0
F1+LcrV+Pla+YopM+YscF	1	2,9	0	0,0	1	5,0	0	0,0
F1+Pla+YopM+YopE+YscF	2	5,9	2	14,3	0	0,0	0	0,0

*Примечание:* данные суммированы по результатам иммуноблоттинга.

Комбинации сенситинов (5 сочетаний: LcrV+YopE+YscF, F1+LcrV+YopE+YscF, LcrV+YopM+YopE+YscF, LcrV+Pla+YopM+YopE+YscF, F1+LcrV+Pla+YopM+YopE+YscF), не встречающиеся ни у одного из вакцинированных или контрольных доноров, не представлены в таблице. Жирным шрифтом отмечены показатели, достоверно отличные от результатов в контрольной группе В ( $p < 0,05$ ), тест Фишера.

Проведенный анализ показал, что из 49 сочетаний только 7 достоверно чаще встречались в группе А-Total, чем в контрольной группе В. Из них почти у двух третей детектировались специфические антитела к сочетанию капсульного антигена и структурного компонента инъектосомы T3SS F1+YscF, затем, в порядке убывания, были зарегистрированы антитела к комбинациям Pla+YscF > F1+Pla+YscF > YopM+YscF > F1+YopM+YscF > Pla+YopM+YscF > F1+Pla+YopM+YscF (таблица 6).

В группе А-RV количество комбинаций, антитела к которым достоверно чаще выявлялись по сравнению с наивными донорами, было больше и составило 10 из 37. Среди них так же преобладали антитела к F1+YscF, Pla+YscF, F1+Pla+YscF. Реже и с одинаковой частотой регистрировались специфические иммуноглобулины к сочетаниям F1+YopM, YopM+YscF, F1+YopM+YscF (более половины наблюдений) и Pla+YopM+YscF и F1+Pla+YopM+YscF (около трети наблюдений). Особенностью структуры антительного ответа у недавно вакцинированных ЖЧВ лиц было включение в маркерные комбинации антигенов

цитотоксического белка YopE – антитела к сочетанию F1+YopE и YopE+YscF обнаруживались более чем у четверти доноров (*таблица 6*).

В группе А-EV достоверное, по сравнению с контролем, превышение частоты встречаемости антител наблюдалось только к 3 комбинациям сенситинов: F1+YscF, Pla+YscF и F1+Pla+YscF (*таблица 6*).

Таким образом, тщательный анализ полученных данных позволил выявить особенности антительного ответа у иммунизированных ЖЧВ – вовлечение в реакцию большего количества сенситинов из панели, а также выявил маркерные комбинации сенситинов для различных групп вакцинированных ЖЧВ доноров.

Подводя итог, исследование антительного ответа вакцинированных ЖЧВ доноров выявило серопревалентность ко всем белкам рабочей панели. Наиболее часто у привитых ЖЧВ регистрировались антитела к YscF, F1, Pla и YopM, и крайне редко выявлялись антитела к LcrV и YopE. Однако антитела к пяти белкам из панели (F1, LcrV, Pla, YopM, YscF) с большей или меньшей частотой выявлялись так же в крови невакцинированных доноров при использовании одного или обоих современных серологических методов, применяемых нами в исследовании. В целом, применение иммуноблоттинга позволяло увеличить выявление серопозитивных доноров в 1,5–5,5 раз по сравнению с ТИФА, как в группе вакцинированных, так и невакцинированных доноров. Максимальные расхождения в результатах ТИФА и иммуноблоттинга были получены при выявлении антител, специфичных к YscF.

Достоверно значимыми ( $p < 0,05$ ) гуморальными маркерами вакцинации ЖЧВ были: i) более высокие титры антител к F1 в группе недавно вакцинированных (А-RV, СГТ 100,0 (45,62–219,2)); ii) более частое выявление анти-F1-антител как у недавно (А-RV), так и у давно вакцинированных ЖЧВ (А-EV) методом иммуноблота; iii) более частое выявление антител к YopE в группе недавно вакцинированных доноров А-RV – они выявлялись в иммуноблоте у трети привитых в течение года после вакцинации; iv) более частое по сравнению с группой контроля обнаружение анти-YscF-антител во всех группах доноров, привитых ЖЧВ (А-RV и А-EV); v) меньшие титры и превалентность анти-Pla-

антител, выявляемая как в ТИФА, так и в блоте у вакцинированных ЖЧВ независимо от длительности поствакцинального периода (А-RV и А-EV) по сравнению с контрольными наивными донорами; vi) более частое выявление антител к комбинации 4 различных сенситинов в индивидуальной сыворотке. Комбинации иммуногенов, антитела к которым достоверно чаще регистрировались у вакцинированных ЖЧВ доноров в иммуноблоте, составили F1+YscF, Pla+YscF и F1+Pla+YscF. Наоборот, было показано отсутствие значимых различий в иммунореактивности сывороток вакцинированных и невакцинированных доноров к белкам LcrV и YopM.

Оценка длительности циркуляции выявленных маркерных антител, проведенная путем сравнения серопревалентности в группах вакцинированных ЖЧВ с длительностью поствакцинального периода менее 1 года (А-RV) и от 2 до 30 лет (А-EV), позволила заключить, что особенностями гуморального ответа у вакцинированных ЖЧВ доноров была длительная циркуляция (в среднем, в течение 15 лет после последней иммунизации ЖЧВ) антител к F1 (65,0–92,0%) и к линейным эпитомам YscF (55,0–100,0%). Антитела к YopE выявлялись у 28,6% доноров в течение года после последней вакцинации. В то же время, было отмечено, что серопревалентность и титры антител к Pla у привитых ЖЧВ были достоверно ниже, чем у невакцинированных доноров. В целом, для вакцинированных ЖЧВ было характерно высокое разнообразие антительного ответа, выраженное в более частом обнаружении антител к комбинации 4 различных антигенов в индивидуальной сыворотке, а также появлении нон-респондеров. Для выявления обнаруженных маркеров разработанные экспериментальные варианты иммуноблоттинга были более информативны, чем ТИФА.

### **3.1.4 – Определение диагностической информативности экспериментальных тестов на основе рекомбинантных сенситинов для оценки качества поствакцинального иммунного ответа**

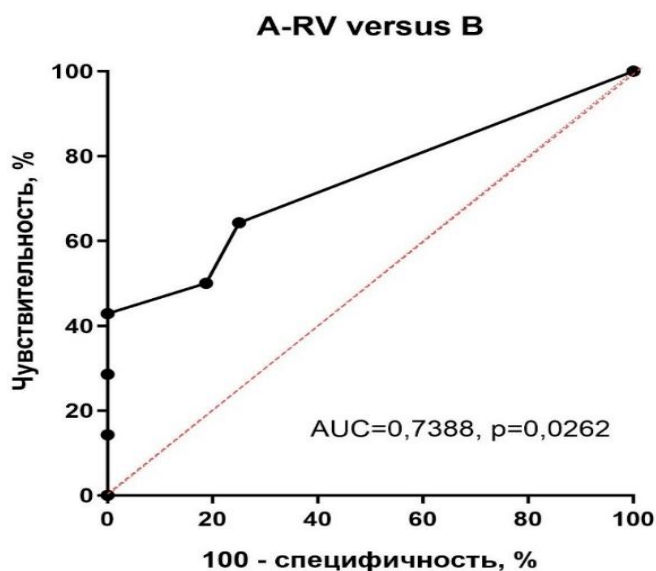
Одной из задач диссертационного исследования явилась оценка параметров диагностической информативности разработанных экспериментальных



иммунотестов на основе панели рекомбинантных сенситинов. Поскольку ревакцинации ЖЧВ согласно инструкции по применению вакцины проводятся ежегодно, наибольший интерес представляет оценка качества поствакцинального иммунитета у лиц, получивших первую иммунизацию или ревакцинацию в течение года до взятия материала для анализа. В связи с этим, показатели информативности разработанных серологических тестов оценивали в рамках выборки группы A-RV в сравнении с группой B.

Чувствительность и специфичность тестов устанавливали для тех сенситинов и вариантов анализа, при использовании которых разница в частоте или уровне выявления антител к рекомбинантным белкам панели между группами A-RV и B была статистически достоверной.

Диагностическую информативность определения титров анти-F1 антител в экспериментальном варианте ТИФА в группе A-RV оценивали посредством построения характеристической ROC-кривой (рисунок 3).



**Рисунок 3 – Определение показателей диагностической информативности выявления антикапсульных антител в экспериментальном твердофазном иммуноферментном анализе в сыворотках крови доноров, вакцинированных живой чумной вакциной, со сроком поствакцинального периода менее 1 года (группа A-RV)**

Основные характеристики чувствительности и специфичности определения антикапсульных антител в экспериментальном ТИФА-иммуноteste в зависимости от выбора уровня cut-off представлены в *таблице 7*.

**Таблица 7 – Значения показателей диагностической информативности выявления анти-F1-антител в твердофазном иммуноферментном анализе в зависимости от порогового значения (cut-off) обратных титров антител**

AUC	SE (95% ДИ)	p	Cut-off, обратные титры антител	Чувствительность, % (95% ДИ)	Специфичность, % (95% ДИ)	Индекс Юдена
0,7388	0,0947 (0,5532–0,9245)	0,0262	> 25,00	64,29 (35,14–87,24)	75,00 (47,62–92,73)	39,29
			> 75,00	50,00 (23,04–76,96)	81,25 (54,35–95,95)	31,25
			> 150,0	42,86 (17,66–71,14)	100,0 (79,41–100,0)	<b>42,86</b>
			> 300,0	28,57 (8,389–58,10)	100,0 (79,41–100,0)	28,57
			> 600,0	14,29 (1,779–42,81)	100,0 (79,41–100,0)	14,29

*Примечание:* AUC (area under the curve) – площадь под кривой; SE – стандартная ошибка среднего; ДИ – доверительный интервал. Жирным шрифтом выделено максимальное значение индекса Юдена.

Результаты анализа полученной ROC-кривой позволили оценить прогностическую силу рассматриваемого теста как хорошую ( $AUC = 0,7338 \pm 0,0947$ ) для дифференциации недавно вакцинированных ЖЧВ доноров от наивных. Пороговое значение обратных титров антител, выявляемых в ТИФА с учетом максимального индекса Юдена, составило 150,0. Хотя рассчитанная в этом случае специфичность теста была абсолютной (100 %), чувствительность оказалась относительно низкой и составила всего 42,86 %.

Показатели диагностической информативности определения специфических антител в сыворотках крови доноров группы А-RV методом иммуноблоттинга рассчитывали согласно стандартным методикам.

Как видно из *таблицы 8*, определение специфических антител методом иммуноблоттинга с использованием в качестве сенситинов YopE, F1 и YscF

позволяло достоверно дифференцировать вакцинированных доноров от наивных с различной информативностью. Детекция антител к активатору плазминогена Pla была неспецифичной для привитых (специфичность 0,00 %). Обнаружение анти-YopE антител выявляло недавно привитых ЖЧВ доноров с высокой специфичностью (100,00 %), но низкой чувствительностью (28,57 %), тогда как детекция антикапсульных антител – с высокой чувствительностью (92,86 %), но относительно низкой специфичностью (70,59 %). Максимальные показатели диагностической чувствительности и специфичности в нашей работе имело определение методом иммуноблоттинга антител к структурной субъединице инжектосомы T3SS YscF.

**Таблица 8 – Характеристики чувствительности и специфичности твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга при тестировании сывороток крови привитых живой чумной вакциной и контрольных доноров**

Сенситины	Чувствительность, (95% ДИ)	Специфичность, (95% ДИ)	p
F1	92,86% (68,5–99,63)	70,59% (46,87–86,72)	0,0007
LcrV	нп	нп	p>0,05
Pla	71,43% (45,35–88,28)	0,00% (0,00–18,43)	0,0318
YopM	нп	нп	p>0,05
YopE	28,57% (11,72–54,65)	100,00% (81,57–100,00)	0,0318
YscF	100,00% (78,47–100,00)	100,00% (81,57–100,00)	<0,0001

*Примечание:* нп – неприменимо, ввиду p>0,05.

Таким образом, нами были определены показатели диагностической информативности разработанных экспериментальных иммунотестов на основе рекомбинантных белков чумного микробов для оценки поствакцинального иммунитета, индуцированного ЖЧВ, в течение года после последней иммунизации. Специфичность и чувствительность определения антикапсульных антител в экспериментальном ТИФА-иммунотесте составила 100% и 42,86%,

соответственно, при пороговом значении обратных титров специфических антител, равным 150,0. Экспериментальные иммунотесты на основе иммуноблоттинга выявляли иммунологические маркеры вакцинации ЖЧВ со следующими показателями специфичности и чувствительности: анти-YopE-антитела – 100 % и 28,57 %, анти-F1-антитела – 70,59 % и 92,86 %, анти-YscF-антитела – 100 % и 100 %, соответственно.

### **3.2 – Исследование реакций клеточного иммунитета у вакцинированных живой чумной вакциной с применением панели рекомбинантных белков**

Несмотря на доказательства значимой роли клеточного ответа в реализации противочумного иммунитета [120, 347], общепринятых маркеров его оценки как при естественном инфицировании, так и при вакцинации лицензированными вакцинными препаратами не установлено [149, 365].

Целью данного раздела работы явилось исследование митоген- и антиген-индуцированной пролиферации МНК и определение типа Th1/Th2/Th17-поляризации ответа у вакцинированных ЖЧВ доноров с использованием панели рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF для выявления специфических маркерных реакций клеточного иммунитета при вакцинации ЖЧВ.

#### **3.2.1 – Пролиферативный ответ мононуклеаров периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной при стимуляции *in vitro* рекомбинантными белками**

Пролиферативный ответ МНК оценивали на выборке доноров, серологические показатели которых были определены на предыдущем этапе работы: А-RV, n=5, А-EV, n=13 (А-Total, n=18); В, n=6. В качестве положительного контроля использовали коммерческий митоген ConA и инактивированные препараты исходного вакцинного штамма Yp26 и Yp37.

Для сравнения результатов, полученных у вакцинированных ЖЧВ, с данными, зарегистрированными в группе контроля, применяли критерий Манна-Уитни. Результаты исследования суммированы в *таблице 9* и проиллюстрированы в *рисунке 4*.

**Таблица 9 – Антиген- и митоген-стимулированная пролиферация лимфоцитов вакцинированных живой чумной вакциной и контрольных доноров, определяемая *in vitro***

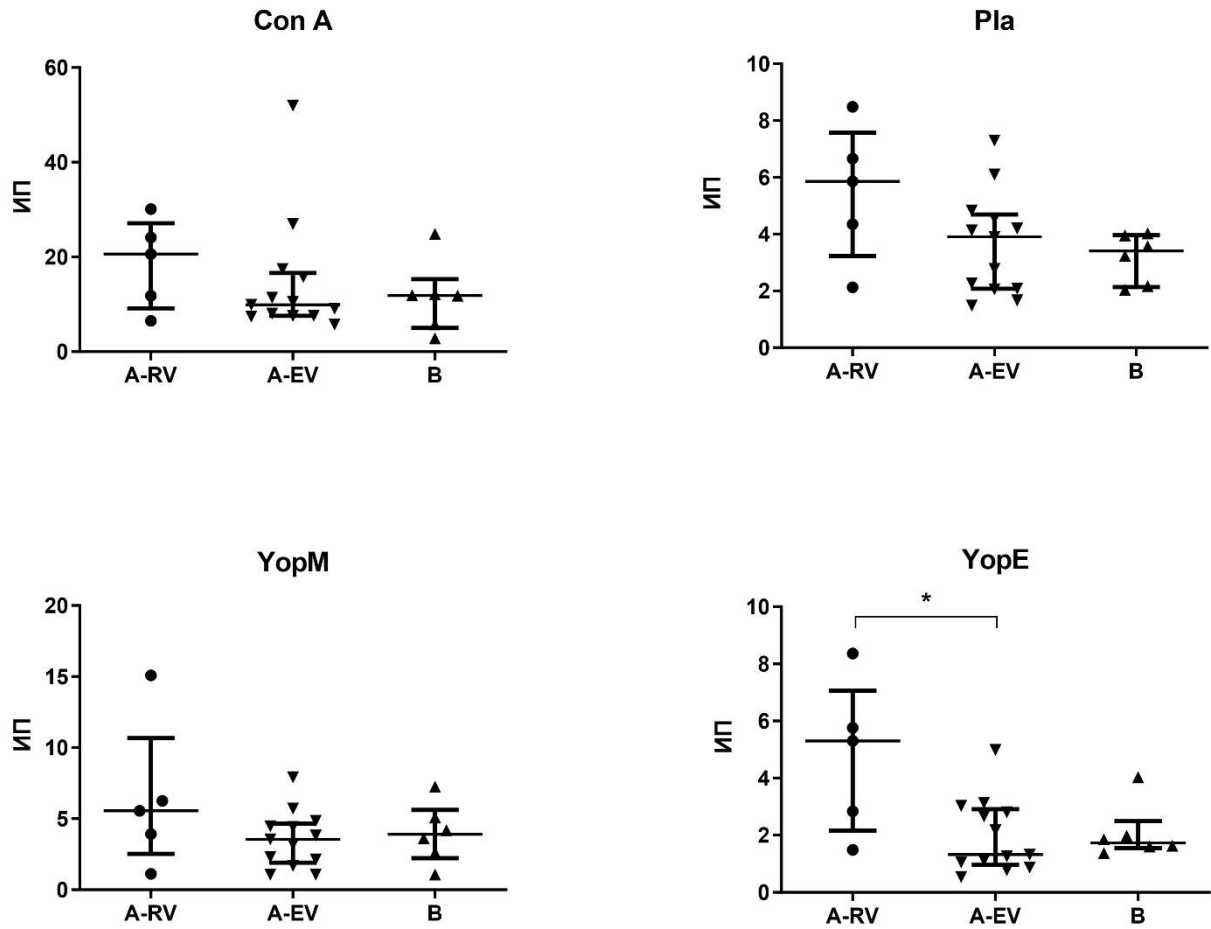
Группы доноров	Индексы пролиферации лимфоцитов Me (25%; 75%) при стимуляции:								
	ConA	Yp26	Yp37	F1	LcrV	YopE	YopM	Pla	YscF
A-Total	10,99 (7,61; 21,48)	4,60 (3,22; 6,36)	10,10 (6,94; 15,30)	1,86 (1,06; 3,27)	1,16 (0,78; 1,64)	2,42 (1,10; 3,60)	3,87 (2,03; 5,60)	4,17 (2,12; 5,92)	1,79 (0,92; 2,29)
A-RV	20,61 (9,16; 27,11)	4,67 (3,07; 10,67)	12,87 (8,85; 20,46)	3,68 (1,26; 6,98)	1,25 (0,95; 3,14)	5,30 (2,17; 7,06)	5,56 (2,53; 10,68)	5,86 (3,24; 7,58)	1,30 (0,76; 2,12)
A-EV	9,91 (7,590; 16,62)	4,53 (3,35; 5,59)	7,71 (6,73; 14,97)	1,79 (1,015; 3,02)	1,13 (0,71; 1,55)	1,32 (0,96; 2,91)	3,56 (1,91; 4,66)	3,9 (2,07; 4,69)	1,82 (0,99; 2,97)
B	11,89 (5,05; 15,31)	4,19 (2,83; 6,02)	7,53 (4,34; 14,47)	2,45 (1,36; 3,10)	1,16 (1,06; 1,21)	1,74 (1,54; 2,49)	3,91 (2,23; 5,63)	3,41 (2,14; 3,97)	1,26 (0,91; 2,73)

*Примечание:* A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля; Me – медиана, 25%; 75% – первый и третий квартили.

По результатам анализа, достоверных различий в уровне бластной трансформации лимфоцитов, индуцированной митогеном, препаратами ЖЧВ Yp26, Yp37 или рекомбинантными белками рабочей панели, между группами вакцинированных ЖЧВ и невакцинированных доноров выявлено не было ( $p > 0,05$ ). Тем не менее, нами были зафиксированы определенные тренды в клеточных реакциях пролиферации, стимулированных исследуемыми препаратами:

– более высокие индексы пролиферации были получены в группе недавно вакцинированных доноров (A-RV) при стимуляции как положительными контролями (ConA, Yp26, Yp37), так и рекомбинантными белками, за исключением YscF (таблица 9). Так, медианное значение ConA- и F1-индуцированных ИП в группе A-RV превышало таковое в группе A-EV в 2 раза ( $p > 0,05$ ), Pla- и YopM-индуцированных – в 1,5 раза ( $p > 0,05$ ), YopE-индуцированных – в 4 раза ( $p < 0,05$ )

(рисунок 4). При этом, YopE-стимулированные ИП в группе A-RV в 3 раза превышали таковые в группе контроля (таблица 9);



**Рисунок 4 – Тенденция к интенсификации процессов пролиферации лимфоцитов в ответ на стимуляцию *in vitro* ConA, Pla, YopM и YopE в группе недавно вакцинированных живой чумной вакциной доноров (A-RV) по сравнению с группой A-EV и контрольной группой B**

*Примечание:* Критерий Манна-Уитни, \* $p < 0,05$ .

– при культивировании с положительными контролями Yp26 и Yp37 более высокие ИП были выявлены в ответ на стимуляцию Yp37 (ИП Yp37 > ИП Yp26), что предполагает доминантную роль термоиндуцибельных белков чумного микроба в индукции клеточных реакций иммунитета (таблица 9);

– умеренная пролиферативная активность была зафиксирована при стимуляции капсульным антигеном F1: медианное значение антиген-индуцированных ИП, зарегистрированное в группе A-RV, составило 3,68 (1,26;

6,98), в группе А-EV – 1,79 (1,02; 3,02), в контрольной группе В – 2,45 (1,36; 3,10) (таблица 9);

– *in vitro* стимуляция МНК вакцинированных и контрольных доноров рекомбинантными белками LcrV и YscF не приводила к индукции детектируемой бластной трансформации лимфоцитов: максимальное медианное значение ИП при культивировании с LcrV было получено в группе А-RV и составило 1,25 (0,95; 3,14), при культивировании с YscF – в группе А-EV (1,82 (0,99; 2,97)) (таблица 9);

– напротив, высокий уровень пролиферативного ответа был зарегистрирован при стимуляции Pla, YopM и YopE: средние значения ИП лимфоцитов, культивируемых с указанными белками, в группе А-RV составляли более 5,0 и превышали таковые, полученные в ответ на стимуляцию одним из положительных контролей – Yp26 (таблица 9).

Таким образом, необходимо отметить, что, хотя нам не удалось четко выявить митоген- или антиген-индуцированного пролиферативного ответа, специфичного для вакцинации ЖЧВ, повышение ИП в группе недавно вакцинированных доноров (А-RV) позволяет предположить интенсификацию процессов бластной трансформации в течение года после введения вакцины. Данная тенденция была наиболее выраженной в ответ на стимуляцию рекомбинантными белками YopE, Pla, YopM и F1, а также митогеном ConA. Слабый пролиферативный ответ был выявлен во всех группах доноров при стимуляции YscF и LcrV.

### 3.2.2 – Оценка цитокинового ответа мононуклеаров периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной доноров на *in vitro* стимуляцию рекомбинантными белками

Задачей данного раздела работы было установление уровня основных цитокинов, продуцируемых МНК вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров, при культивировании с белками рабочей панели, и определение поляризации гомологичного Т-хелперного иммунного ответа. Определение уровней IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A, TNF- $\alpha$  и IL-10 проводили в культуральной жидкости, отобранной на 5-е сутки культивирования МНК.

#### 3.2.2.1 – Спонтанная продукция цитокинов

Первоначально исследовали спонтанную продукцию указанных цитокинов в группах наивных и вакцинированных ЖЧВ доноров (*таблица 10*).

**Таблица 10 – Спонтанная продукция цитокинов мононуклеарами периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной и контрольных доноров**

Группы доноров	Уровни спонтанной продукции цитокинов, Me (25%;75%)				
	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-17A	TNF- $\alpha$	IL-10
A-Total	0,00 (0,00; 0,19)	<b>0,29</b> <b>(0,00; 0,46)</b>	0,00 (0,00; 7,89)	2,59 (0,00; 7,49)	3,78 (0,94; 5,31)
A-RV	0,00 (0,00; 2,02)	<b>0,23</b> <b>(0,00; 0,43)</b>	0,00 (0,00; 40,12)	0,00 (0,00; 2,33)	3,78 (0,00; 4,00)
A-EV	0,00 (0,00; 0,00)	<b>0,31</b> <b>(0,04; 0,51)</b>	0,00 (0,00; 15,79)	5,26 (0,00; 8,221)	3,78 (1,05; 7,14)
B	0,00 (0,00; 1,73)	1,65 (1,01; 2,41)	1,58 (0,00; 70,57)	2,89 (0,00; 13,22)	1,27 (0,51; 6,42)

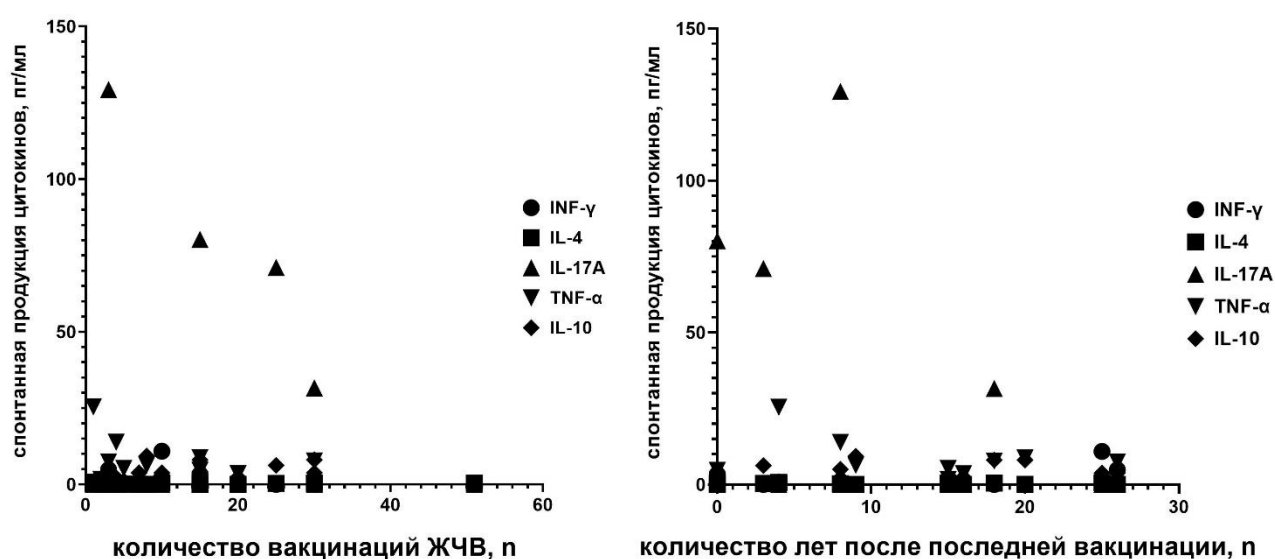
*Примечание:* A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля. Жирным шрифтом отмечены показатели, достоверно отличные от результатов в контрольной группе B ( $p < 0,05$ ), критерий Манна-Уитни.

Как видно из *таблицы 10*, в отсутствие антигенной стимуляции продукция IFN- $\gamma$  была минимальной и не различалась между исследуемыми группами. Уровни IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-10, спонтанно продуцируемые МНК, колебались в достаточно широких диапазонах, однако разница между группами не была статистически значимой. В то же



время спонтанная продукция IL-4 во всех группах вакцинированных ЖЧВ была достоверно ниже, чем в группе контрольных наивных доноров ( $p < 0,05$ ).

Поскольку в некоторых случаях продукция цитокинов варьировала внутри и между группами вакцинированных доноров (TNF- $\alpha$ , IL-17A), нами были исследованы возможные взаимосвязи между спонтанной секреторной активностью МНК и количеством вакцинаций (рисунки 5.A) или периодом времени после последней вакцинации ЖЧВ (рисунки 5.B).



**Рисунок 5 – Оценка корреляционных связей между спонтанной продукцией IFN- $\gamma$ , IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4 мононуклеарами периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной доноров и (А) количеством вакцинаций, (В) количеством лет, прошедших после последней вакцинации**

Результаты статистического анализа продемонстрировали отсутствие взаимосвязи между изучаемыми признаками для всех исследуемых цитокинов ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, исследование спонтанной секреторной активности МНК, выделенных от вакцинированных ЖЧВ и невакцинированных доноров, показало статистически значимое снижение продукции IL-4 ( $p < 0,05$ ) в группах вакцинированных ЖЧВ доноров по сравнению с контролем, а также отсутствие достоверных различий в продукции IFN- $\gamma$ , IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-10. Уровень

спонтанной секреции исследуемых цитокинов не зависел от количества вакцинаций ЖЧВ или количества лет после последней иммунизации.

### **3.2.2.2 – Продукция Th1/Th2/Th17-цитокинов в ответ на *in vitro* стимуляцию ConA и цельноклеточными препаратами живой чумной вакцины**

На следующем этапе работы проводили оценку цитокинового ответа вакцинированных и контрольных доноров на стимуляцию *in vitro* митогеном и цельноклеточными препаратами ЖЧВ.

При этом антиген-стимулированную продукцию IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-10 сравнивали со спонтанной секрецией, статистическую значимость изменений оценивали с использованием критерия Вилкоксона для связанных выборок. Ответ считали специфичным в случае достоверного изменения уровня продукции цитокина ( $p < 0,05$ ) у вакцинированных ЖЧВ доноров, но не в контрольной группе. Если уровень антиген-индуцированной секреции цитокина достоверно менялся и у невакцинированных доноров, для оценки специфичности ответа применяли критерий Манна-Уитни для несвязанных выборок. Сравнение уровня продукции цитокинов в ответ на стимуляцию различными сенситинами проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса и апостериорного теста Данна в случае 3 и более показателей, либо критерия Манна-Уитни – в случае 2 показателей.

Изменение продукции Th1/Th2/Th17-цитокинов в ответ на активацию контрольными антигенами представлено на *рисунке 6*, данные по антиген-индуцированным концентрациям цитокинов суммированы в *таблице 11*.

**Таблица 11 – Концентрации IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A, TNF- $\alpha$  и IL-10, определяемые в культуральных жидкостях, полученных от мононуклеаров периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной и контрольных доноров при стимуляции ConA, Yp26 и Yp37**

Иммунологический параметр	Группы доноров	Уровень цитокина при <i>in vitro</i> стимуляции контрольными антигенами, Me (25%; 75%), пг/мл:			
		<i>medium</i>	ConA	Yp26	Yp37
1	2	3	4	5	6
IFN- $\gamma$	A-Total	0,00 (0,00; 0,19)	<b>24,81</b> (5,218; 120,3)	<b>118,6</b> (39,30; 219,8)	<b>159,4</b> (52,54; 308,4)
	A-RV	0,00 (0,00; 2,02)	<b>24,81</b> (16,23; 135,3)	<b>45,48</b> (27,88; 281,7)	<b>79,45</b> (33,40; 981,4)
	A-EV	0,00 (0,00; 0,00)	<b>19,13</b> (0,00; 120,3)	<b>118,6</b> (41,86; 213,9)	<b>159,4</b> (52,54; 236,7)
	B	0,00 (0,00; 1,73)	0,00 (0,00; 26,14)		96,02 (37,97; 633,9)
IL-4	A-Total	0,29 (0,00; 0,46)	<b>0,75</b> (0,49; 1,58)	0,31 (0,00; 0,61)	0,20 (0,00; 0,33)
	A-RV	0,23 (0,00; 0,43)	<b>0,79</b> (0,37; 2,36)	0,51 (0,16; 0,72)	0,28 (0,13; 0,51)
	A-EV	0,31 (0,04; 0,51)	<b>0,72</b> (0,5; 1,36)	0,08 (0,00; 0,56)	0,00 (0,00; 0,28)
	B	1,65 (1,01; 2,41)	1,29 (0,39; 2,307)	0,45 (0,00; 1,22)	1,49 (0,07; 2,79)
IL-17A	A-Total	0,00 (0,00; 7,89)	0,00 (0,00; 5,53)	<b>47,37</b> (0,00; 155,1)	<b>105,8</b> (11,84; 234,4)
	A-RV	0,00 (0,00; 40,12)	0,00 (0,00; 0,00)	216,5 (49,38; 496,9)	202,8 (81,82; 1219)
	A-EV	0,00 (0,00; 15,79)	0,00 (0,00; 22,89)	<b>31,58</b> (0,00; 93,59)	<b>75,71</b> (7,89; 191,2)
	B	1,58 (0,00; 70,57)	0,00 (0,00; 1,18)	0,00 (0,00; 5,53)	13,42 (0,00; 71,84)
TNF- $\alpha$	A-Total	2,59 (0,00; 7,49)	<b>43,12</b> (25,18; 101,2)	<b>160,7</b> (123,7; 238,7)	<b>113,7</b> (90,88; 198,7)
	A-RV	0,00 (0,00; 2,33)	<b>104,8</b> (12,42; 121,1)	<b>208,1</b> (138,5; 306,2)	<b>117,7</b> (98,05; 235,3)
	A-EV	5,26 (0,00; 8,22)	<b>38,97</b> (28,80; 80,99)	<b>160,6</b> (87,32; 241,0)	<b>109,8</b> (81,71; 180,8)
	B	2,89 (0,00; 13,22)	<b>33,49</b> (10,54; 95,01)	<b>149,6</b> (132,8; 265,7)	<b>146,7</b> (111,9; 213,6)

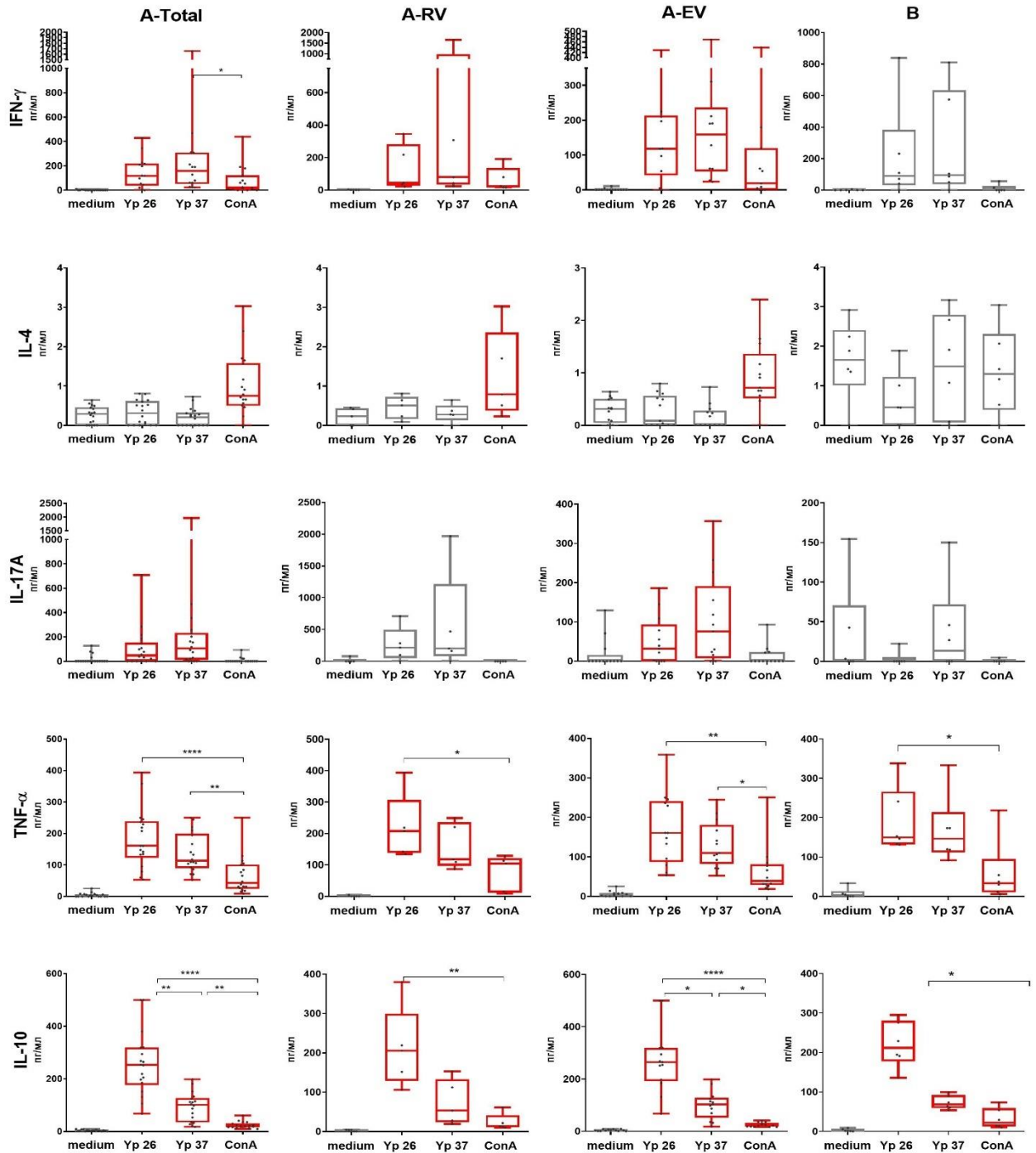
1	2	3	4	5	6
IL-10	A-Total	3,78 (0,94; 5,31)	<b>21,21</b> <b>(16,59; 30,80)</b>	<b>252,8</b> <b>(176,5; 318,9)</b>	<b>100,7</b> <b>(34,95;126,0)</b>
	A-RV	3,78 (0,00; 4,00)	<b>13,20</b> <b>(10,98; 41,15)</b>	<b>205,3</b> <b>(128,8; 299,5)</b>	<b>53,21</b> <b>(23,60; 132,3)</b>
	A-EV	3,78 (1,05; 7,14)	<b>21,71</b> <b>(18,03; 32,39)</b>	<b>264,9</b> <b>(191,2; 319,1)</b>	<b>102,9</b> <b>(52,48; 128,3)</b>
	B	1,27 (0,51; 6,42)	<b>21,70</b> <b>(12,44; 58,94)</b>	<b>211,7</b> <b>(177,4; 280,7)</b>	<b>68,54</b> <b>(58,93; 92,07)</b>

*Примечание:* A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля. Жирным шрифтом выделены уровни цитокинов, достоверно превышающих спонтанную продукцию ( $p<0,05$ ), критерий Вилкоксона. Medium – контроль без стимуляции.

Анализ показал, что ответ МНК вакцинированных ЖЧВ доноров, индуцированный неспецифическим митогеном ConA, свидетельствовал об активации Th1- и Th2-клеток и готовности к продукции, соответственно, IFN- $\gamma$  и IL-4. В то же время, секреция IFN- $\gamma$  и IL-17A в ответ на стимуляцию Yp26 и Yp37 свидетельствовала о наличии пула лимфоцитов памяти, способных к продукции Th1- и Th17-цитокинов и специфичных к антигенам ЖЧВ у людей, иммунизированных ЖЧВ. Выявленные изменения были характерны как для недавно вакцинированных, так и для доноров с длительностью поствакцинального периода более 1 года.

Так, уровни IFN- $\gamma$  в группе A-Total возрастали от нулевых значений до 118,6 (39,30; 219,8) пг/мл, 159,4 (52,54; 308,4) пг/мл и 24,81 (5,218; 120,3) пг/мл при активации Yp26, Yp37 и ConA, соответственно; при этом эти же показатели в группе A-RV достигали значений 45,48 (27,88; 281,7) пг/мл, 79,45 (33,40; 981,4) пг/мл и 24,81 (16,23; 135,3) пг/мл, а в группе A-EV 118,6 (41,86; 213,9) пг/мл, 159,4 (52,54; 236,7) пг/мл и 19,13 (0,0; 120,3) пг/мл. Способность к активации IFN- $\gamma$ -секреторной функции клеток у Yp26 и Yp37 была выше таковой, зарегистрированной с ConA, достигая значимого превышения в группе A-Total ( $p<0,05$ ).

ConA-индуцированная секреция IL-4 достоверно возрастала по сравнению со спонтанной: в группе A-Total – в 2,6 раз, в группе A-RV – в 3,4 раза и в группе A-EV – в 2,29 раз.



**Рисунок 6 – Антиген-индуцированная продукция IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-10, и IL-17A мононуклеарами периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной и контрольных доноров в ответ на стимуляцию коммерческим митогеном ConA и инактивированными препаратами Yp26 и Yp37**

*Примечание.* Результаты представлены в виде диаграммы размаха: указаны Min и Max значения выборки, первый и третий квартили (границы бокса), медиана (горизонтальная линия внутри бокса). Красным цветом выделены показатели, достоверно отличающиеся от уровня цитокина, спонтанно продуцируемого не стимулированными клетками (medium) ( $p < 0,05$ ), критерий Вилкоксона. Сравнение уровней продукции, индуцируемой разными иммуногенами в пределах одной группы доноров, проводили тестом Манна-Уитни (2 белка) или тестом Краскела-Уоллиса с критерием Данна (3 и более белка), \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$

Продукция IL-17A в ответ на стимуляцию Yp26 и Yp37 увеличивалась от нулевых значений до 47,37 (0,0; 155,1) пг/мл и 105,8 (11,84; 234,4) пг/мл в группе A-Total, достигая 216,5 (49,38; 496,9) пг/мл при инкубации с Yp26 и 202,8 (81,82; 1219,0) пг/мл при инкубации с Yp37 в группе недавно вакцинированных; те же показатели в группе A-EV составили 31,58 (0,0; 93,59) пг/мл и 75,71 (7,895; 191,2) пг/мл. Отсутствие статистически значимого изменения антиген-индуцированной концентрации IL-17A по сравнению с не стимулированным контролем, наблюдаемое в группе A-RV, мы связываем с небольшим размером выборки, однако описанный выше тренд к возрастанию цитокин-секреторной функции активированных цельноклеточными препаратами ЖЧВ МНК отчетливо проиллюстрирован на рисунке (рисунк 6).

Стимуляция МНК ConA, Yp26 и Yp37 приводила к выраженной, но неспецифической продукции TNF- $\alpha$  и IL-10: статистически значимое по сравнению с не стимулированным контролем возрастание антиген-индуцированных уровней цитокинов наблюдалось как в группе вакцинированных ЖЧВ, так и невакцинированных доноров. При этом достоверных различий в индуцированных концентрациях TNF- $\alpha$  и IL-10 между разными группами доноров выявлено не было ( $p > 0,05$ , кр. Манна-Уитни). Способность к индукции обоих цитокинов нарастала в ряду: ConA < Yp37 < Yp26.

Таким образом, можно заключить, что специфическим иммунологическим маркером для вакцинированных ЖЧВ доноров была продукция IFN- $\gamma$  и IL-4 в ответ на стимуляцию ConA, а также IFN- $\gamma$  и IL-17A при стимуляции инактивированными препаратами ЖЧВ Yp26 и Yp37, поскольку достоверное изменение уровня цитокинов по сравнению со спонтанной секрецией наблюдалось в супернатантах от стимулированных МНК вакцинированных ЖЧВ, но не контрольных доноров. Значимо, что указанные клеточные реакции сохранялись у доноров группы A-EV длительный период (в среднем, 15 лет) после последнего введения вакцины.

### 3.2.2.3 – Продукция Th1/Th2/Th17-цитокинов в ответ на *in vitro* стимуляцию рекомбинантными белками

Антиген-индуцированную продукцию IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-10 в ответ на стимуляцию рекомбинантными белками F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF у вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров исследовали по схеме, описанной на предыдущем этапе. Данные по антиген-индуцированным концентрациям суммированы в *таблице 12*, результаты анализа – в *рисунках 7 и 8*.

**Таблица 12 – Концентрации IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A, TNF- $\alpha$  и IL-10, определяемые в культуральных жидкостях, полученных от мононуклеаров периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной и контрольных доноров при стимуляции F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF**

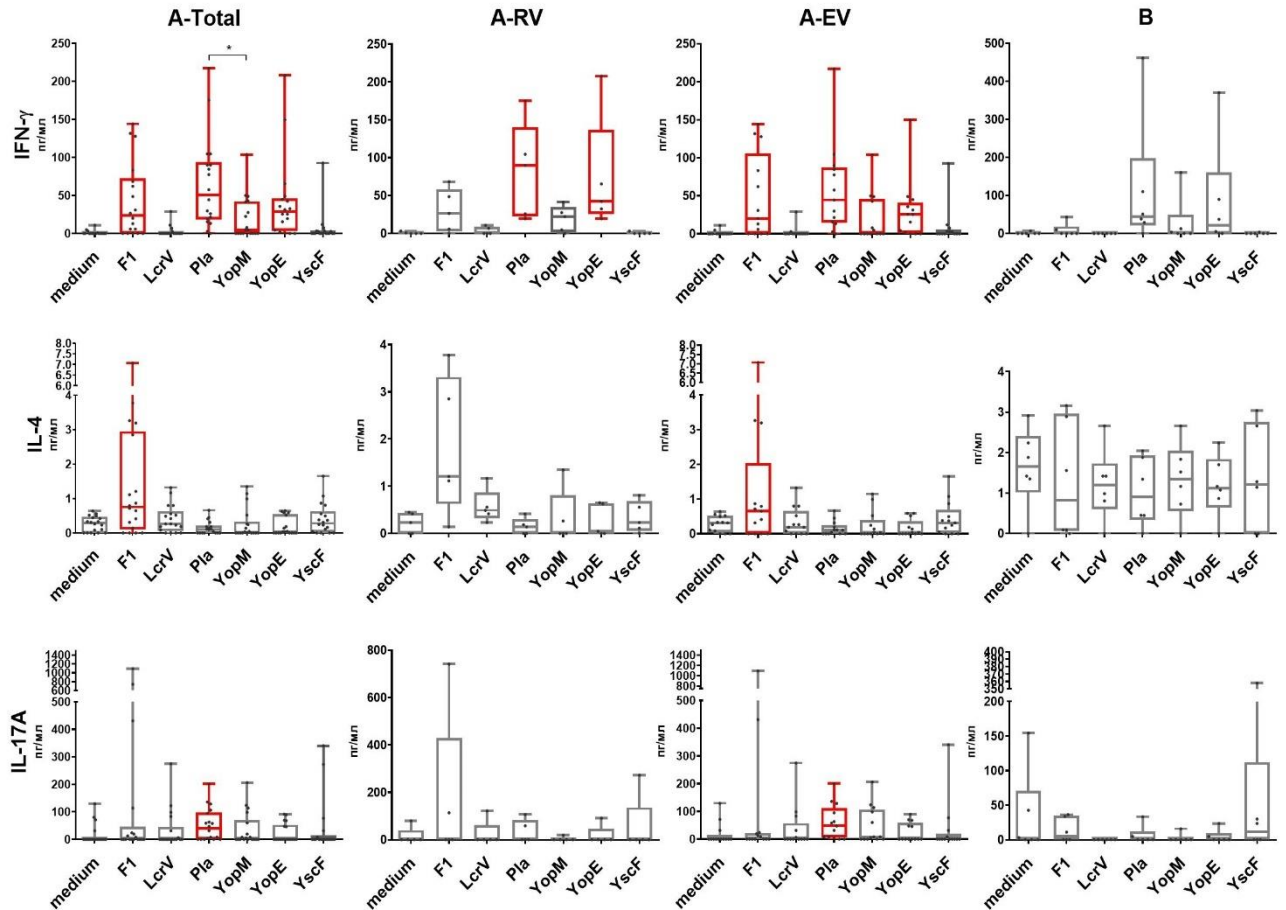
Иммуно-логический параметр	Группа доноров	Уровень цитокина при <i>in vitro</i> стимуляции иммуногенами, Ме (25%; 75%), пг/мл:						
		<i>medium</i>	<i>F1</i>	<i>LcrV</i>	<i>Pla</i>	<i>YopM</i>	<i>YopE</i>	<i>YscF</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
IFN- $\gamma$	A-Total	0,00 (0,00; 0,19)	<b>23,29</b> <b>(0,00;</b> <b>72,15)</b>	0,00 (0,00; 0,69)	<b>50,92</b> <b>(18,48;</b> <b>93,55)</b>	<b>4,68</b> <b>(0,00;</b> <b>41,79)</b>	<b>28,35</b> <b>(3,68;</b> <b>45,92)</b>	0,00 (0,00; 3,29)
	A-RV	0,00 (0,00; 2,02)	26,58 (2,91; 58,56)	0,00 (0,00; 8,86)	<b>89,85</b> <b>(22,76;1</b> <b>39,9)</b>	22,44 (2,41; 34,52)	<b>42,37</b> <b>(26,05;1</b> <b>36,5)</b>	0,00 (0,00; 1,65)
	A-EV	0,00 (0,00; 0,00)	<b>20,00</b> <b>(0,00;</b> <b>105,5)</b>	0,00 (0,00; 0,00)	<b>44,31</b> <b>(14,39;</b> <b>87,16)</b>	<b>0,00</b> <b>(0,00;</b> <b>45,80)</b>	<b>25,37</b> <b>(0,83;</b> <b>40,25)</b>	0,00 (0,00; 5,32)
	B	0,00 (0,00; 1,73)	0,00 (0,00; 18,23)	0,00 (0,00; 0,00)	44,70 (21,74; 197,9)	1,837 (0,00; 49,57)	21,18 (0,00; 160,1)	0,00 (0,00; 0,92)
IL-4	A-Total	0,29 (0,00; 0,46)	<b>0,75</b> <b>(0,10;</b> <b>2,94)</b>	0,26 (0,06; 0,62)	0,11 (0,00; 0,22)	0,02 (0,00; 0,33)	0,04 (0,00; 0,54)	0,28 (0,03; 0,62)
	A-RV	0,23 (0,00; 0,43)	1,21 (0,63; 3,31)	0,49 (0,32; 0,86)	0,14 (0,00; 0,30)	0,00 (0,00; 0,8045)	0,05 (0,00; 0,64)	0,23 (0,06; 0,68)
	A-EV	0,31 (0,04; 0,51)	<b>0,65</b> <b>(0,00;</b> <b>2,030)</b>	0,19 (0,00; 0,66)	0,10 (0,00; 0,25)	0,0380 (0,00; 0,3815)	0,04 (0,00; 0,35)	0,31 (0,02; 0,68)
	B	1,65 (1,01; 2,41)	0,82 (0,7; 2,96)	1,20 (0,60; 1,73)	0,89 (0,34; 1,92)	1,345 (0,5460; 2,044)	1,12 (0,65; 1,84)	1,214 (0,00; 2,75)

1	2	3	4	5	6	7	8	9
IL-17A	A-Total	0,00 (0,00; 7,89)	0,00 (0,00; 46,20)	0,00 (0,00; 44,51)	<b>39,47</b> <b>(0,00;</b> <b>97,59)</b>	2,42 (0,00; 69,57)	0,00 (0,00; 52,5)	0,00 (0,00; 13,82)
	A-RV	0,00 (0,00; 40,12)	0,00 (0,00; 427,8)	0,00 (0,00; 61,05)	0,00 (0,00; 82,59)	0,00 (0,00; 9,678)	0,00 (0,00; 45,63)	0,00 (0,00; 136,4)
	A-EV	0,00 (0,00;15, 79)	0,00 (0,00; 21,52)	0,00 (0,00; 57,44)	<b>47,37</b> <b>(6,32;</b> <b>111,7)</b>	7,895 (0,00; 106,0)	0,00 (0,00; 57,63)	0,00 (0,00; 19,74)
	B	1,58 (0,00; 70,57)	5,53 (0,00; 34,48)	0,00 (0,00; 0,00)	0,00 (0,00; 11,84)	0,00 (0,00; 3,95)	0,00 (0,00; 9,47)	11,84 (0,00; 112,0)
TNF- $\alpha$	A-Total	2,59 (0,00; 7,49)	<b>20,62</b> <b>(7,01;</b> <b>37,12)</b>	4,61 (0,59; 9,29)	<b>85,5</b> <b>(46,46;</b> <b>123,1)</b>	<b>22,69</b> <b>(17,67;</b> <b>37,74)</b>	<b>69,31</b> <b>(51,47;</b> <b>114,7)</b>	<b>5,84</b> <b>(1,25;</b> <b>12,20)</b>
	A-RV	0,00 (0,00; 2,33)	<b>18,89</b> <b>(8,14;</b> <b>31,19)</b>	0,79 (0,00; 10,01)	<b>110,5</b> <b>(63,84;</b> <b>151,7)</b>	<b>19,77</b> <b>(13,18;</b> <b>29,01)</b>	65,12 (23,90; 129,7)	3,571 (0,00; 4,55)
	A-EV	5,26 (0,00; 8,22)	<b>21,75</b> <b>(4,32;</b> <b>44,04)</b>	5,34 (1,05; 10,20)	<b>75,39</b> <b>(46,39;</b> <b>119,1)</b>	<b>26,08</b> <b>(18,75;</b> <b>47,70)</b>	<b>73,51</b> <b>(55,19;</b> <b>115,3)</b>	<b>9,407</b> <b>(2,47;</b> <b>16,24)</b>
	B	2,89 (0,00; 13,22)	20,21 (11,71; 28,86)	2,22 (0,00; 7,07)	<b>84,96</b> <b>(69,12;</b> <b>150,5)</b>	<b>32,65</b> <b>(23,76;</b> <b>53,03)</b>	<b>85,88</b> <b>(64,68;</b> <b>152,9)</b>	5,617 (0,00; 17,75)
IL-10	A-Total	3,78 (0,94; 5,31)	<b>19,68</b> <b>(8,21;</b> <b>45,62)</b>	<b>4,83</b> <b>(2,03;</b> <b>7,41)</b>	<b>65,10</b> <b>(50,03;</b> <b>105,3)</b>	<b>16,31</b> <b>(10,76;</b> <b>29,47)</b>	<b>165,7</b> <b>(113,5;</b> <b>208,9)</b>	<b>7,33</b> <b>(3,68;</b> <b>13,75)</b>
	A-RV	3,78 (0,00; 4,00)	<b>11,80</b> <b>(7,96;</b> <b>21,76)</b>	4,44 (0,79; 5,09)	<b>50,64</b> <b>(27,14;</b> <b>75,37)</b>	<b>8,663</b> <b>(5,49;</b> <b>21,92)</b>	<b>120,4</b> <b>(91,67;</b> <b>154,8)</b>	3,556 (0,11; 5,22)
	A-EV	3,78 (1,05; 7,14)	<b>26,18</b> <b>(7,24;</b> <b>60,96)</b>	<b>6,84</b> <b>(2,53;</b> <b>8,47)</b>	<b>67,04</b> <b>(53,49;</b> <b>129,2)</b>	<b>19,69</b> <b>(14,19;</b> <b>31,59)</b>	<b>179,6</b> <b>(124,0;</b> <b>223,6)</b>	<b>11,12</b> <b>(6,06;</b> <b>15,14)</b>
	B	1,27 (0,51; 6,42)	<b>22,41</b> <b>(7,21;</b> <b>25,27)</b>	3,92 (1,19; 5,88)	<b>60,85</b> <b>(49,86;</b> <b>66,94)</b>	<b>17,20</b> <b>(10,07;</b> <b>27,46)</b>	<b>159,5</b> <b>(79,44;</b> <b>207,4)</b>	3,750 (1,82; 14,15)

Примечание: A-Total – опытная группа; A-RV – недавно вакцинированные; A-EV- ранее вакцинированные; B – группа контроля. Жирным шрифтом выделены уровни цитокинов, достоверно превышающих спонтанную продукцию ( $p < 0,05$ ), критерий Вилкоксона. Medium – контроль без стимуляции.



Результаты анализа показали, что специфичным для вакцинированных ЖЧВ было усиление синтеза IFN- $\gamma$ , IL-4 и IL-17A: ни один из исследуемых белков не вызывал значимого изменения продукции данных цитокинов у контрольных доноров при достоверном ее увеличении у иммунизированных ЖЧВ. При этом, различные иммуногены чумного микроба в разной степени были вовлечены в индукцию секреции Th1/Th2/Th17 цитокинов (рисунк 7).



**Рисунок 7 – Антиген-индуцированная продукция IFN- $\gamma$ , IL-4 и IL-17A мононуклеарами периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной (A-Total, A-RV, A-EV) и контрольных (B) доноров в ответ на стимуляцию рекомбинантными белками F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF**

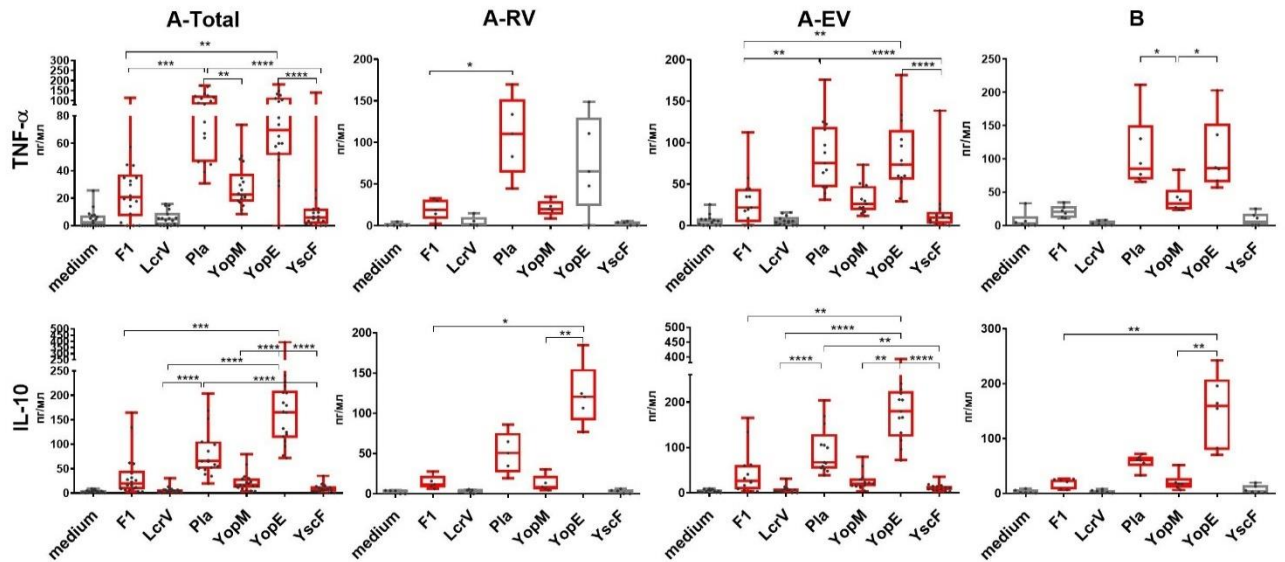
*Примечание:* Результаты представлены в виде диаграммы размаха: указаны Min и Max значения выборки, первый и третий квартили (границы бокса), медиана (горизонтальная линия внутри бокса). Красным цветом выделены показатели, достоверно отличающиеся от уровня цитокина, спонтанно продуцируемого не стимулированными клетками (medium) ( $p < 0,05$ ), критерий Вилкоксона. Сравнение уровней продукции, индуцируемой разными антигенами в пределах одной группы доноров, проводили тестом Манна-Уитни (2 белка) или тестом Краскела-Уоллиса с критерием Данна (3 и более белка), \* –  $p < 0,05$ .

Так, продукция IFN- $\gamma$  в группе A-Total достоверно возрастала в ответ на стимуляцию сразу несколькими белками рабочей панели, а именно F1 ( $p=0,0007$ ), Pla ( $p<0,0001$ ), YopM ( $p=0,0020$ ) и YopE ( $p<0,0001$ ). При этом в группе A-RV все 4 рекомбинантных белка вызывали выраженное нарастание уровня цитокина, однако статистической значимости разница между спонтанной и индуцированной продукцией достигала только при стимуляции Pla и YopE ( $p=0,0431$ ). В группе A-EV значимые изменения секреции IFN- $\gamma$  вызывали все перечисленные иммуногены (F1 ( $p=0,0078$ ), Pla ( $p=0,0005$ ), YopM ( $p=0,0313$ ), YopE ( $p=0,0020$ )). Культивирование МНК с LcrV и YscF не влияло на продукцию IFN- $\gamma$  ни в одной из групп доноров.

Секреция IL-4 достоверно возрастала у вакцинированных ЖЧВ доноров при стимуляции только одним белком – рекомбинантным F1. В среднем, у привитых доноров (A-Total) F1-индуцированный уровень IL-4 увеличивался в 2,6 раз по сравнению с medium ( $p=0,0018$ ), при этом в группе A-RV отмечалось его возрастание в 5,6 раз ( $p>0,05$ ), а в группе A-EV – в 2,1 раза ( $p = 0,0337$ ).

Продукция IL-17A у вакцинированных ЖЧВ доноров достоверно увеличивалась в ответ на стимуляцию Pla группе A-Total ( $p = 0,0245$ ) и в группе A-EV ( $p = 0,0186$ ), хотя в группе недавно вакцинированных доноров Pla-индуцированная секреция IL-17A изменялась незначительно ( $p>0,05$ ).

Культивирование МНК с панелью рекомбинантных белков выявило выраженные изменения секреции TNF- $\alpha$  и IL-10 у вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров, однако не все из них носили специфический характер (*рисунок 8*).



**Рисунок 8 – Антиген-индуцированная продукция TNF- $\alpha$  и IL-10 мононуклеарами периферической крови вакцинированных живой чумной вакциной (A-Total, A-RV, A-EV) и контрольных (B) доноров в ответ на стимуляцию рекомбинантными белками F1, LcrV, Pla, YopM, YopE и YscF**

*Примечание.* Результаты представлены в виде диаграммы размаха: указаны Min и Max значения выборки, первый и третий квартили (границы ящика), медиана (горизонтальная линия внутри ящика). Красным цветом выделены показатели, достоверно отличающиеся от уровня цитокина, спонтанно продуцируемого не стимулированными клетками (medium) ( $p < 0,05$ ), критерий Вилкоксона. Сравнение уровней продукции, индуцируемой разными антигенами в пределах одной группы доноров, проводили тестом Манна-Уитни (2 белка) или тестом Краскела-Уоллиса с критерием Данна (3 и более белка), \* –  $p < 0,05$ .

Секреция TNF- $\alpha$  специфически возрастала у вакцинированных ЖЧВ доноров при стимуляции МНК белками F1 и YscF. Так, в среднем (A-Total), F1- и YscF-индуцированный уровень цитокина увеличивался по сравнению со спонтанной продукцией в 7,9 ( $p = 0,0003$ ) и 4,1 раза ( $p = 0,0076$ ), соответственно. При этом значимое увеличение F1-стимулированной продукции TNF- $\alpha$  наблюдалось в группе A-RV ( $p = 0,0431$ ) и A-EV ( $p = 0,0049$ ), YscF-стимулированной – в группе A-EV ( $p = 0,0171$ ). Напротив, культивирование МНК с рекомбинантными Pla, YopM и YopE индуцировало достоверное увеличение секреции TNF- $\alpha$  как у привитых, так и у контрольных доноров (критерий Вилкоксона,  $p < 0,05$ ), при этом значимых различий в антиген-индуцированных уровнях цитокина между вакцинированными ЖЧВ и наивными донорами выявлено не было (критерий Манна-Уитни,  $p > 0,05$ ). Способность к индукции синтеза цитокина была в большей степени выражена у Pla и YopE, в меньшей – у YopM, F1 и YscF (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ ). Стимуляция МНК доноров LcrV не изменяла продукции TNF- $\alpha$ .

Продукция IL-10 специфически увеличивалась у вакцинированных ЖЧВ доноров при стимуляции LcrV и YscF. Так, в группе A-Total LcrV- и YscF-индуцированный уровень цитокина увеличивался по сравнению со спонтанной продукцией в 1,3 ( $p=0,0181$ ) и 1,8 раза ( $p=0,0002$ ), соответственно, в группе A-EV – в 1,8 ( $p=0,0425$ ) и 2,9 раз ( $p=0,0005$ ). Однако в группе недавно вакцинированных изменения антиген-индуцированных уровней были незначительными ( $p>0,05$ ). Культивирование с остальными белками из панели приводило к статистически значимому (критерий Вилкоксона,  $p<0,05$ ), но неспецифическому усилению продукции IL-10, поскольку достоверных различий в антиген-индуцированных уровнях цитокина между вакцинированными ЖЧВ и наивными донорами выявлено не было (критерий Манна-Уитни,  $p>0,05$ ). Способность к индукции синтеза IL-10 была более выражена у YopE и Pla, менее – у F1, YopM, YscF и LcrV (критерий Краскела-Уоллиса,  $p<0,05$ ).

Таким образом, исследование антиген-индуцированной продукции цитокинов МНК вакцинированных и контрольных наивных доноров позволило определить Т-хелперную направленность и антигенную специфичность клеточных реакций иммунного ответа у вакцинированных ЖЧВ доноров. Показано, что у привитых ЖЧВ иммунный ответ поляризован по смешанному, Th1/Th2/Th17-типу. Специфическими маркерами поствакцинального ответа у вакцинированных ЖЧВ является усиление продукции: i) Th1-цитокинов при стимуляции МНК белками F1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Pla, YopM, YopE (IFN- $\gamma$ ) и YscF (TNF- $\alpha$ ), ii) Th2-цитокинов в ответ на стимуляцию белками F1 (IL-4), LcrV и YscF (IL-10), iii) Th-17-цитокинов в ответ на стимуляцию МНК антигеном Pla (IL-17A). Указанные реакции носят долговременный характер и выявляются даже у доноров группы A-EV, в среднем, через 15 лет после последней вакцинации ЖЧВ.

## РЕЗЮМЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования определены особенности гуморального ответа у привитых ЖЧВ: образование антител к капсульному антигену F1, регистрируемых в крови привитых доноров в течение года после последней вакцинации методом ТИФА и на протяжении, в среднем, 15 лет после иммунизации – методом иммуноблоттинга; образование антител к белку-эффектору T3SS YopE, детектируемых у трети привитых методом иммуноблоттинга в течение года после последней вакцинации, и к структурной единице инъектосомы T3SS YscF, детектируемых в иммуноблоте как у недавно, так и у давно вакцинированных доноров; меньшие титры и превалентность анти-Pla-антител по сравнению с контрольными наивными донорами, выявляемые как в ТИФА, так и в иммуноблоте. Установлено, что характерным для привитых ЖЧВ также является взаимодействие сывороточных антител с 4 белками используемой панели одновременно. В то же время среди вакцинированных ЖЧВ встречаются и нон-респондеры, выявленные в нашем исследовании в группе А-EV.

Определена диагностическая информативность разработанных экспериментальных иммунотестов на основе рекомбинантных белков чумного микроба для оценки поствакцинального иммунитета, индуцированного ЖЧВ в течение года после последней иммунизации. Показано, что экспериментальный ТИФА-иммунотест на основе F1 выявляет привитых ЖЧВ с высокой специфичностью (100%), но низкой чувствительностью (42,86%). Детекция антител к F1 в экспериментальном иммунотесте на основе иммуноблоттинга позволяет дифференцировать привитых ЖЧВ от наивных доноров со специфичностью 70,59 % и чувствительностью 92,86 %, к YscF – с показателями специфичности и чувствительности, равными 100 % и 100 %, соответственно.

При изучении клеточных реакций иммунитета определены особенности клеточного ответа у привитых ЖЧВ доноров. Установлено, что иммунизация ЖЧВ приводит к интенсификации процессов бластной трансформации лимфоцитов в ответ на стимуляцию рекомбинантными белками YopE, Pla, YopM, F1, а также ConA в течение года после введения вакцины. В то же время при анализе

спонтанной продукции цитокинов выявлено статистически значимое снижение уровня IL-4 в группах привитых ЖЧВ доноров по сравнению с контролем. Показано, что характерным иммунологическим маркером для вакцинированных ЖЧВ доноров является продукция IFN- $\gamma$  и IL-4 в ответ на стимуляцию ConA, IFN- $\gamma$  и IL-17A при стимуляции инактивированными препаратами ЖЧВ, выращенными при температурах 26°C и 37°C.

При исследовании антиген-индуцированной продукции цитокинов установлено, что у привитых ЖЧВ иммунный ответ поляризован по смешанному, Th1/Th2/Th17-типу. Определена антигенная специфичность выявленных реакций: маркерами поствакцинального ответа у вакцинированных ЖЧВ является усиление продукции Th1-цитокинов при стимуляции МНК белками F1, Pla, YopM, YopE и YscF, продукции Th2-цитокинов в ответ на стимуляцию белками F1, LcrV и YscF, и продукции Th-17-цитокинов в ответ на стимуляцию МНК антигеном Pla. Выявленные клеточные реакции иммунитета носят долговременный характер и сохраняются у привитых ЖЧВ на протяжении, в среднем, 15 лет после последней вакцинации.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 3**

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и/или индексируемых в международных базах данных WoS и Scopus:*

1. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen in humans immunized with live plague vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, T.E. Arseneva, A.L. Trukhachev, S.A. Lebedeva, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // PLoS Negl Trop Dis. – 2018. – Vol. 12 (6). – P. e0006511.

2. New Promising Targets for Synthetic Omptin-Based Peptide Vaccine against Gram-Negative Pathogens / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, S.S. Zaitsev, M.A. Khizhnyakova, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // Vaccines (Basel). – 2019. – Vol. 7 (2). – P. 36.

3. *Yersinia pestis* Antigen F1 but Not LcrV Induced Humoral and Cellular Immune Responses in Humans Immunized with Live Plague Vaccine - Comparison of

Immunoinformatic and Immunological Approaches / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, Y.V. Saltykov, V.L. Motin // *Vaccines (Basel)*. – 2020. – Vol. 8 (4). – P. 698.

*Публикации в других изданиях:*

4. **Ляпина, А.М.** Перспектива использования рекомбинантных белков в фундаментальной науке и вакцинологии / А.М. Ляпина // Молодые ученые – здравоохранению региона: материалы 70 научно-практической конференции студентов и молодых ученых Саратовского государственного медицинского университета. – Саратов, 2009. – С. 438–439.

5. Гуморальный ответ к антигенам чумного микроба у доноров, вакцинированных живой чумной вакциной EV НИИЭГ / **А.М. Ляпина**, В.А. Федорова, М.В. Телепнев, О.В. Ульянова, Ю.Ю. Елисеев, В.Л. Мотин // *Инфекции, обусловленные иерсиниями: материалы III научно-практической конференции с международным участием*. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 80–81.

6. Перспективы применения мультиплексного теста на основе панели рекомбинантных иерсиниозных антигенов - биомаркеров персонифицированной оценки специфического гуморального ответа / **А.М. Ляпина**, В.А. Федорова, М.А. Хижнякова, М.В. Телепнев, О.В. Ульянова, В.Л. Мотин // *Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: материалы III международной научно-практической конференции (22–24 ноября 2012)*. – Казань, 2012. – С. 371–372.

7. Рекомбинантные полипептиды как биомаркеры оценки иммунологической эффективности вакцинации живой чумной вакциной у людей / **А.М. Ляпина**, В.А. Федорова, М.А. Хижнякова, М.В. Телепнев, В.Л. Мотин // *Медицинский академический журнал*. – 2012. – Т.12, № 3. – С. 85–87.

8. High Potency of Novel Polymeric Adjuvant in Eliciting of the Immune Response in Mice to Major Antigens of Chlamydia and Yersinia / V.A. Feodorova, A.M. Lyapina, O.V. Ulianova T.I. Polyanina, Yu.Yu. Eliseev, V.L. Motin // *Procedia in Vaccinology*. – 2012. – Vol. 6. – P. 93–97.

9. Serologic Markers for Long-Term Immunity in Humans Vaccinated with Live *Yersinia pestis* EV НИИЭГ / V.A. Feodorova, A.M. Lyapina, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, L.V. Sayapina, M.N. Lyapin, A.A. Shcherbakov, M.V. Telepnev, V.L. Motin // *Procedia in Vaccinology*. – 2012. – Vol. 6. – P. 10–13.

10. Antibody response in humans immunized with live plague vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, M.V. Telepnev, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, V.L. Motin // *Yersinia 11: the 11th international symposium on Yersinia, 24–28 June 2013*. – Suzhou, China, 2013. – P. 31.

11. Evaluating human response to live plague vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, M.A. Khizhnyakova, M.V. Telepnev, E.P. Lyapina, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, T.I. Polyanina, V.L. Motin // FEMS 2013: Proceeding Book 5th Congress of European Microbiologists, 21–25 July, 2013. – Leipzig, Germany, 2013. – P. 296.

12. YscF is a Highly Specific Marker for Evaluation of Antibody Response to Live Plague Vaccine in Humans / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.V. Telepnev, M.A. Khizhnyakova, S.S. Konnova, E.P. Lyapina, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, T.I. Polyanina, V.L. Motin // *Procedia in Vaccinology*. – 2013. – Vol. 7. – P. 44–48.

13. Selectivity in IgG Subclass Response to Live Plague Vaccine in Humans / V.A. Feodorova, M.A. Khizhnyakova, **A.M. Lyapina**, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, V.L. Motin // *Procedia in Vaccinology*. – 2014. – Vol. 8. – P. 34–37.

14. **Ляпина, А.М.** Характеристика клеточного иммунного ответа к F1 и LcrV доноров, привитых живой чумной вакциной / **А.М. Ляпина**, В.А. Федорова, В.Л. Мотин // *Российский иммунологический журнал*. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 524–526.

15. Cellular Immune Response to Pla in Humans Vaccinated with Live Plague Vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, M.V. Telepnev, E.P. Lyapina, L.V. Sayapina, T.E. Arseneva, I.V. Morozova, A.L. Trukhachev, S.A. Lebedeva, V.L. Motin // 12th International Symposium on Yersinia, 25–28 October, 2016. – Tbilisi, Georgia, 2016. – P. 46.

16. Characterization of humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen in humans immunized with live plague vaccine (LPV) / V. Feodorova, M. Khizhnyakova, **A. Lyapina**, S. Zaitsev, M. Telepnev, L. Sayapina, O. Ulianova, S. Ulyanov, T. Arseneva, I. Morozova, A. Trukhachev, S. Lebedeva, E. Lyapina, V. Motin // FEMS 2017: 7th Congress of European Microbiologists, 9–13 July, 2017. – Valencia, Spain, 2017. – P. FEMS7–2706.

17. T3SS components as the biomarkers of humoral immune response elicited by Live Plague Vaccine in humans / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // ECI 2018: 5th European Congress of Immunology, 2–5 September, 2018. – Amsterdam, the Netherlands, 2018. – P. 47.

18. Cellular immune response to T3SS proteins in humans vaccinated with Live Plague Vaccine / **A.M. Lyapina**, V.A. Feodorova, S.S. Zaitsev, M.A. Khizhnyakova, L.V. Sayapina, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // ECI 2018: 5th European Congress of Immunology, 2–5 September, 2018. – Amsterdam, the Netherlands, 2018. – P.147.



19. Role of Type 3 Secretion System (T3SS) proteins in the induction of short- and long-term immune responses in humans vaccinated with live whole-cell vaccine / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, M.V. Telepnev, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // 12th Vaccine Congress, 16–19 September, 2018. – Budapest, Hungary, 2018. – P. O3.5.

20. Immune response to LcrV and F1 in vaccinees immunized with the Live Plague Vaccine / **A.M. Lyapina**, V.A. Feodorova, M.A. Khizhnyakova, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // 13th International Symposium on Yersinia, 16–19 September, 2019. – Antananarivo, Madagascar, 2019. – P. 92.

21. The role of T3SS effectors in immune response elicited by the Live Plague Vaccine in vaccinees / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, L.V. Sayapina, O.V. Ulianova, E.P. Lyapina, S.S. Ulyanov, V.L. Motin // 13th International Symposium on Yersinia, 16–19 September, 2019. – Antananarivo, Madagascar, 2019. – P. 93.

22. The role of T3SS effector YopE in adaptive immune response / **A. Lyapina**, V. Feodorova, M. Khizhnyakova, S. Zaitsev, L. Sayapina, M. Telepnev, O. Ulianova, E. Lyapina, S. Ulyanov, V. Motin // FEMS 2019: 8th Congress of European Microbiologists, 7–11 July 2019. – Glasgow, Scotland, 2019. – P. 652.

23. B-cell epitope mapping of YscF, a T3SS needle protein of *Yersinia spp.*, with the panel of immune sera from vaccinated models / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev E.P. Lyapina, V.L. Motin // FEMS Online Conference on Microbiology, 28–31 October 2020. – P. 97.

24. The role of YscF, a T3SS needle protein of *Yersinia spp.*, in vaccine-induced immune response / V.A. Feodorova, **A.M. Lyapina**, M.A. Khizhnyakova, S.S. Zaitsev, E.P. Lyapina, V.L. Motin // FEMS Online Conference on Microbiology, 28–31 October 2020. – P. 121.

25. **Ляпина, А.М.** Маркерные комбинации антигенов чумного микроба для оценки поствакцинального гуморального иммунитета у привитых живой чумной вакциной доноров / **А.М. Ляпина**, Ю.Ю. Елисеев, В.А. Федорова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2024. – Т. 13, № 1: Приложение. – С. 230–233.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка качества поствакцинального иммунитета является важным элементом вакцинопрофилактики, позволяющим установить иммунологическую эффективность вакцинации и принять стратегические решения по дальнейшей иммунизации населения или индивидуума. Особенную актуальность данное направление исследований имеет в отношении вакцинации против особо опасных инфекций, для которых, в современных условиях, характерна спорадическая заболеваемость на территории Российской Федерации, что определяет невозможность анализа эпидемиологической эффективности вакцинации против них [178, 179].

Специфическая профилактика чумы в нашей стране уже более 80 лет проводится путем иммунизации ЖЧВ на основе штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ – деривата штамма EV76, аттенуированного французскими учеными Girard G. и Robic J. Ежегодно вакцинации ЖЧВ подвергаются тысячи людей, проживающих на территории природных очагов заболевания, а также сотни сотрудников противочумной системы, работающих с возбудителем чумы. На биомоделях ЖЧВ индуцирует относительно кратковременную защиту от экспериментального заражения бубонной и легочной формой заболевания [39, 164, 165, 166], однако ее эффективность у людей в полевых условиях никогда не подвергалась систематизированной и стандартизированной оценке даже в период активных вспышек [75, 202, 345]. Таким образом, единственным способом объективной оценки иммунитета, сформированного в результате вакцинации ЖЧВ, в настоящее время является иммунологический мониторинг, разработка подходов к которому требует глубокого понимания механизмов вакциноиндуцированного протективного противочумного иммунитета и определения достоверных иммунологических маркеров – специфических реакций иммунной системы в ответ

на вакцинацию, позволяющих судить о развитии, типе и уровне иммунного ответа у вакцинируемого [75].

Известно, что адаптивный иммунитет к чуме характеризуется развитием реакций гуморального и клеточного звеньев иммунной системы, при этом как специфические антитела, так и Т-клетки могут обеспечивать определенный уровень защиты от различных форм экспериментальной инфекции обособленно или синергически [184, 100, 347, 261, 288, 340]. Эти данные значительно осложняют поиск коррелятов протекции против чумы. Субъединичные противочумные вакцины на основе доминантных иммуногенов чумного микроба F1 и LcrV и их комбинаций стимулируют, преимущественно, Th2-поляризованный иммунный ответ, и индуцированные ими высокие титры гомологичных антител коррелируют с уровнем защиты на мышинной модели [97, 172, 299]. Однако все больше исследований свидетельствует о том, что при натуральной инфекции или иммунизации цельноклеточными аттенуированными живыми вакцинами F1 и LcrV могут не играть ведущую роль в формировании противочумного, особенно клеточного, иммунитета [101, 183, 189, 190, 219, 261, 272, 371]. При этом идентифицирован ряд других антигенов чумного микроба, индуцирующих образование значимых титров специфических антител или продукцию провоспалительных цитокинов как при экспериментальном, так и естественном заражении или иммунизации биомоделей, человека и других чувствительных млекопитающих [101, 162, 183, 190, 193, 221, 248, 291], часть из которых обладает протективными свойствами [155, 162, 226, 290, 303, 333, 353]. В частности, при исследовании молекулярных механизмов постинфекционного иммунитета на мышинной модели помимо F1 и LcrV была показана иммунодоминантная роль таких белков как Pla, YopM и других Yops [162, 193]. Кроме того, наличие иммунных антител к Pla, YopM, а также к YopE и YscF было продемонстрировано у реконвалесцентов после перенесенной бубонной и легочной чумы [101, 148, 248]. Наконец, при характеристике адаптивного ответа на ЖЧВ или ее родительский штамм – EV76, было показано образование специфических иммунных антител и вовлечение в провоспалительный иммунный ответ таких белков чумного микроба

как LcrV, YopM, YscF и YopE [46, 81, 137, 183, 291]. Вместе с тем роль указанных белков в формировании поствакцинального иммунитета, индуцированного ЖЧВ у людей, до начала наших исследований не была определена.

Эти данные демонстрируют потенциал для дальнейшего поиска иммунологических маркеров поствакцинального ответа у привитых живыми чумными вакцинами.

За последние годы были установлены важные особенности иммунитета, генерируемого ЖЧВ у человека. Так, было показано, что иммунизация ЖЧВ не приводит к 100 % сероконверсии к капсульному антигену, однако серопревалентность к F1 возрастает у повторно и многократно привитых. Титры антикапсульных антител не коррелируют с показателями специфического клеточного иммунитета и не зависят от количества ревакцинаций [77, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 188]. Установлено, что вакциноиндуцированный иммунный ответ к ЖЧВ характеризуется преимущественным развитием Th1- и Th17-опосредованных клеточных реакций, тогда как Th2-реакции менее выражены [30, 35, 39, 81]. Выявлены взаимосвязи между вакциноиндуцированной продукцией различных цитокинов у привитых ЖЧВ, а также сложная динамика их уровней в течение года после вакцинации/ревакцинации [35, 36, 52, 53, 55, 56, 57]. Предложены как серологические тесты для оценки сероковерсии у вакцинированных [63, 64], так и подходы к анализу клеточных реакций иммунного ответа – на основе определения маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов, а также продукции Th1/Th2/Th17-цитокинов [1, 29, 33, 52, 53, 54, 56, 57]. В то же время абсолютное большинство исследователей для характеристики гуморального иммунитета, индуцированного ЖЧВ, использует в качестве сенситина капсульный антиген F1, а для клеточных иммунотестов, как правило, цельноклеточные антигены, что значительно затрудняет стандартизацию основанных на их применении методов оценки поствакцинального иммунитета. Таким образом, для дальнейшего совершенствования методов оценки качества поствакцинального иммунитета у привитых ЖЧВ актуальным является детальное изучение и анализ антигенной специфичности и продолжительности индуцируемых вакцинацией показателей

состояния реактивности гуморальной и клеточной защиты с использованием широкой панели высокоочищенных иммуногенных белков чумного микроба.

С учетом вышеизложенного, нами было проведено комплексное исследование специфичности и длительности гуморального и клеточного поствакцинального иммунитета у доноров, вакцинированных ЖЧВ, с использованием панели рекомбинантных белков F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF с целью определения иммунологических маркеров, перспективных для оценки качества поствакцинального иммунного ответа.

Для реализации поставленных задач были сформированы группы доноров, сдавших образцы крови для исследования на добровольных началах. В опытную группу (A-Total) вошли 34 донора, вакцинированных ЖЧВ по рабочим показаниям с разным числом ежегодных вакцинаций (от 1 до 51, Me=11). С целью оценки продолжительности циркуляции специфических антител и длительности клеточных реакций иммунитета внутри этой группы были выделены две подгруппы в соответствии со сроками последней иммунизации: группу A-RV (n=14) составили доноры с длительностью поствакцинального периода до 1 года, группу A-EV (n=20) – доноры с длительностью поствакцинального периода от 2 до 30 лет. Такое разделение было обусловлено устоявшимися представлениями о примерной продолжительности напряженного иммунитета, индуцированного ЖЧВ, который составляет от 6 до 12 месяцев. Таким образом, выделение группы A-EV позволило бы оценить потенциал ЖЧВ в индукции долговременных иммунологических маркеров. В контрольную группу (B) вошли 17 добровольцев, не имевших противочумных вакцинаций и контакта с возбудителем чумы или его антигенами.

С учетом задач исследования нами были разработаны экспериментальные иммунотесты на основе панели рекомбинантных сенситинов F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF для определения маркерных реакций вакциноиндуцированного иммунитета. Панель высокоочищенных (уровень содержания ЛПС <0,1 EU/мл по данным LAL-теста) рекомбинантных белков чумного микроба была получена согласно протоколам, описанным ранее [137]. Основные вариации конечных

протоколов разработанных иммунотестов касались серологических методов, а именно – ТИФА, и затрагивали, главным образом, выбор сорбционной поверхности (обработанный аминокетонами пластик или пластик с повышенной сорбционной емкостью) и способ сорбции белка-сенситина на пластике.

На первом этапе нашей работы были изучены особенности вакциноиндуцированного гуморального иммунного ответа у привитых ЖЧВ методом ТИФА, широко применяемым для серодиагностики чумы в природных очагах заболевания [105, 169, 321], а также оценки поствакцинального противочумного иммунитета у привитых [50, 54, 64, 187, 190].

Результаты этого блока исследований позволили установить, что у привитых ЖЧВ доноров (A-Total) регистрировались, с различной частотой, иммунные антитела ко всем 6 сенситинам из рабочей панели. Доминантный по частоте встречаемости (35,3–50,0 % вакцинированных) иммунный ответ был направлен к четырем белкам, YscF, F1, YopM и Pla. В то же время антитела к этим же 4 антигенам были выявлены в контрольной группе. Антитела к LcrV и YopE выявлялись исключительно у привитых ЖЧВ, но только у единичных доноров (3,2 и 6,3 % привитых).

Следует отметить, что в нашем исследовании доля серопозитивных ответов к капсульному антигену, определяемых методом ТИФА, в группе A-Total составила всего 48,5 %, а в группе A-RV – 64,3 %, что, в целом, было несколько меньше ожидаемой серопревалентности к F1 [35, 57].

Сравнительный анализ частоты встречаемости иммунных антител, гомологичным к отдельным белкам рабочей панели в опытных и контрольной группах показал, что достоверные различия касались только выявления иммуноглобулинов к поверхностной протеазе Pla ( $p < 0,05$ ), но не к другим используемым сенситинам. Специфичным для всех групп привитых ЖЧВ было более редкое, чем у невакцинированных доноров, обнаружение антител к Pla (A-Total vs B:  $p < 0,0001$ , A-RV vs B:  $p < 0,05$ , A-EV vs B:  $p < 0,0001$ ).

Оценка титров специфических антител между исследуемыми группами показала достоверное повышение уровня антител к F1 в группе недавно

вакцинированных доноров (A-RV vs B:  $p < 0,01$ ). При этом в целом зарегистрированные в течение года после последней вакцинации ЖЧВ значения СГТ антикапсульных антител были невысокими ( $Me = 100,0$  (45,62–219,2)). Эти данные согласуются с наблюдениями других исследователей [53, 54, 56] и выводом, что вакцинация против чумы вызывает образование относительно низких титров специфических иммуноглобулинов к F1 по сравнению с натуральной инфекцией [190]. В группе доноров со сроком поствакцинального периода более года титры анти-F1-антител снижались до уровней, зарегистрированных в контрольной группе (A-EV vs B:  $p > 0,05$ ). Такая динамика совпадает с описанным в литературе резким снижением титров антикапсульных антител через 4–8 месяцев после вакцинации ЖЧВ [57, 188]. Таким образом, повышение титров антител к F1 в течение одного года после последней вакцинации, наблюдаемое в нашем исследовании, было специфичным для привитых ЖЧВ.

Аналогично частоте встречаемости, мы обнаружили, что титры антител к Pla в группах A-Total, A-RV и A-EV были достоверно ниже, чем в группе контроля ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,001$ ). При этом уровень анти-Pla-антител у привитых ЖЧВ в течение года после последней иммунизации превышал таковой, установленный у доноров с длительностью поствакцинального более года ( $p < 0,001$ ).

Достоверных различий между привитыми ЖЧВ и контрольными невакцинированными донорами в титрах антител, специфичных к YscF, YopM, LcrV и YopE, выявлено не было.

Обнаружение относительно низкой серопревалентности вакцинированных доноров к F1 (65,0 % в группе A-RV) и, тем более, к LcrV (6,3 % в группе A-Total) в ТИФА позволило нам использовать иммуноблоттинг как дополнительный метод оценки гуморального иммунного ответа для последующей оценки качества поствакцинального иммунитета у привитых ЖЧВ. Принципиальным отличием иммуноблоттинга является использование в качестве сенситива предварительно фракционированного в ПААГ-SDS белкового препарата, в отличие от «нативного» белка в ТИФА. Процесс подготовки образца для электрофореза, включающий обработку SDS и высокой температурой, приводит к потере многих

конформационных эпитопов, сохраняющихся в ТИФА. Тем не менее, возможности применения данного метода для оценки вакциноиндуцированного иммунного ответа у привитых против чумы были убедительно продемонстрированы в ряде исследований, в том числе, в качестве подтверждающего полуколичественного теста [312, 77].

Результаты нашего исследования показывают, что применение иммуноблоттинга было более эффективным для выявления маркеров гуморального иммунного ответа у привитых ЖЧВ.

Как и методом ТИФА, при использовании иммуноблоттинга в группе привитых ЖЧВ нами были обнаружены антитела ко всем белкам рабочей панели, тогда как в группе контроля – только к 4 из них: Pla, YopM, F1 и LcrV. Однако применение иммуноблоттинга позволило значительно (в 1,5–5,5 раз) увеличить выявление серопозитивных доноров как среди вакцинированных ЖЧВ, так и среди контрольных волонтеров. Так, частота встречаемости антител к F1 в группе A-Total составила 76,5 %, к Pla и YscF – 73,5 %, к YopM – 44,1 %. Антитела к LcrV и YopE регистрировались у 20,6 % и 17,6 % вакцинированных доноров, соответственно. Наиболее выраженное увеличение серопозитивных ответов наблюдалось в группе недавно вакцинированных доноров, где 100 % привитых ЖЧВ были серопозитивны к YscF, 92,9 % – к F1 и 71,4 % – к Pla, 28,6 % – к YopE и 14,3 % – к LcrV.

Результаты сравнения частоты встречаемости антител к рекомбинантным белкам рабочей панели между группами вакцинированных ЖЧВ и контрольных доноров методом иммуноблоттинга позволили выявить маркерные особенности гуморального ответа у привитых ЖЧВ: более частое выявление антител к YscF (A-Total vs B:  $p < 0,0001$ , A-RV vs B:  $p < 0,0001$ ) и F1 (A-Total vs B:  $p < 0,01$ , A-RV:  $p < 0,01$ ), и YopE (A-RV vs B:  $p < 0,05$ ) и более редкое, по сравнению с контрольной группой, – к Pla ( $p < 0,05$ ). При этом мы наблюдали длительную циркуляцию антител к YscF и F1, выявляемых в иммуноблоте у вакцинированных ЖЧВ: доля серопозитивных ответов к этим антигенам оставалась достоверно высокой у доноров группы A-EV с длительностью поствакцинального периода, составляющей, в среднем, 15 лет.



Повышение частоты встречаемости антител к YopE, наоборот, было кратковременным, и превалентность анти-YopE-антител в группе A-EV снижалась до уровня, неразличимого с контролем ( $p > 0,05$ ).

Стоит отметить, что данные по превалентности антител к YopE и YscF в сыворотках привитых ЖЧВ доноров получены нами впервые.

Суммируя результаты, полученные нами в ходе анализа особенностей гуморального ответа у вакцинированных ЖЧВ доноров в ТИФА и иммуноблоте, нужно сделать несколько замечаний.

Несмотря на использование в серологических тестах в качестве сенситинов высокоочищенных рекомбинантных белков, нами была выявлена серопревалентность к большинству из них в группе контрольных доноров, не имевших контактов с антигенами чумного микроба. Так, абсолютно у всех доноров контрольной группы (100 %) были зафиксированы антитела к активатору плазминогена Pla, обладающего высокой гомологией с другими представителями широко распространенного среди грамотрицательных бактерий семейства OmpTn [206], а также с высокой частотой – антитела к YopM, белку-эффектору T3SS чумного микроба, кодируемой общей для патогенных иерсиний родовой плазмидой кальцийзависимости [258]. Чрезвычайно важным является обнаружение в нашей работе у четверти наивных доноров анти-F1-антител – наиболее активно используемого маркера эффективной вакцинации ЖЧВ. Это наблюдение согласуется с результатами исследований Басовой Н.Н. [4] и Фирстовой В.В. [54] о детекции антител к капсульному антигену у 10–30 % наивных доноров. В целом, указанные данные свидетельствуют о циркуляции в крови наивных доноров пула антител кросс-реагирующих с белками чумного микроба, что значительно затрудняет оценку специфического поствакцинального ответа у привитых и повышает требования к подбору метода детекции специфических иммуноглобулинов.

Достоверно более низкая частота встречаемости анти-Pla-антител в группе привитых ЖЧВ доноров требует оценки особенностей индукции антител к данному антигену при вакцинации ЖЧВ. Одним из вероятных механизмов подавления

образования иммуноглобулинов, специфичных к активатору плазминогена, может быть экранирование его другими поверхностными структурами чумного микроба, такими как ЛПС и капсульный антиген [63].

Наконец, одним из значимых заключений этого раздела наших исследований является вывод об отсутствии специфического гуморального ответа к LcrV у привитых ЖЧВ доноров. Схожие результаты были получены Фирстовой В.В. [81], по данным которой иммунизация ЖЧВ плохо стимулировала индукцию антител к LcrV у биомоделей и привитых доноров, однако анти-LcrV-антитела обнаруживались в аналогичных опытной группе титрах у четверти невакцинированных волонтеров. LcrV считается доминантным иммуногеном и протективным белком *Y. pestis*. Иммунизация очищенным антигеном индуцирует выработку высоких титров гомологичных антител не только у биомоделей, но и у человека [91, 97, 170, 187, 195, 268, 299], и ряд авторов высказывали предположения, что именно синтез антигена вирулентности LcrV в условиях размножения бактерий в макроорганизме может обеспечивать развитие более выраженного иммунного ответа, результирующего большую протективную эффективность живой противочумной вакцины по сравнению с инактивированным препаратом [137, 299]. Однако роль LcrV в иммунном ответе, индуцированном введением живых чумных цельноклеточных вакцин, по-видимому, далеко не очевидна. Минимальный или недектируемый уровень антител к LcrV был отмечен при иммунизации биомоделей живыми *pgm*<sup>-</sup>-штаммами – KIM D27 [371] и EV76 [86, 219, 87] или аттенуированным инкапсулированным штаммом *Y. pseudotuberculosis* [189]; низкая серопревалентность к нему была отмечена при характеристике гуморального иммунного ответа у людей в острой фазе и реконвалесцентов после бубонной чумы в Китае [101]. Прояснение данного феномена требует дальнейших исследований вне рамок представленной работы. Полученные же нами результаты позволяют сделать вывод, что антительный ответ к LcrV не может быть использован в качестве иммунологического маркера вакцинации у привитых ЖЧВ.

Важной характеристикой гуморального ответа вакцинированных ЖЧВ доноров в нашем исследовании было большее количество белков, вовлеченных в специфическое взаимодействие с индивидуальными сыворотками, чем в контрольной группе. В этом блоке работы использовали результаты иммуноблоттинга. Нами показано, что антительный ответ привитых ЖЧВ характеризовался значительно большим разнообразием по сравнению с контрольной группой. Это выражалось как в выявлении нон-респондеров – доноров, в сыворотках крови которых мы не детектировали антител ни к одному из белков рабочей панели, так и в достоверно более частом взаимодействии индивидуальных сывороток с четырьмя белками из панели одновременно ( $p < 0,05$ ). В группе контроля достоверно чаще регистрировалась серопревалентность лишь к одному из исследуемых белков ( $p < 0,001$ ). Были определены комбинации сенситинов, антитела к которым достоверно чаще регистрировались у вакцинированных ЖЧВ доноров: F1+YscF, Pla+YscF и F1+Pla+YscF в группе A-Total; F1+YscF, Pla+YscF, F1+Pla+YscF, F1+YopM, YopM+YscF, F1+YopM+YscF, Pla+YopM+YscF, F1+Pla+YopM+YscF, F1+YopE и YopE+YscF в группе A-RV; F1+YscF, Pla+YscF и F1+Pla+YscF в группе A-EV. Выявленные маркерные комбинации антигенов могут быть использованы при разработке мультиплексных тестов для оценки качества поствакцинального иммунитета, индуцируемого ЖЧВ.

Необходимость разграничить специфический и неспецифический ответ определяет требования к серологическому методу, используемому для детекции антител. Для количественной характеристики нами были определены показатели диагностической информативности разработанных экспериментальных иммунотестов на основе рекомбинантных белков чумного микробов для оценки поствакцинального иммунитета у привитых ЖЧВ. Анализ проводился в рамках выборки группы A-RV vs B для тех сенситинов и вариантов теста, для которых на предыдущих этапах исследования была установлена достоверная разница в частоте или уровне выявления антител к рекомбинантным белкам панели между группами A-RV и B. Специфичность и чувствительность определения антикапсульных антител в экспериментальном ТИФА-иммунотесте составила 100 % и 42,86 %,

соответственно, при пороговом значении обратных титров специфических антител, равным 150,0. Экспериментальные иммунотесты на основе иммуноблоттинга выявляли иммунологические маркеры вакцинации ЖЧВ со следующими показателями специфичности и чувствительности: анти-YopE-антитела – 100 % и 28,57 %, анти-F1-антитела – 70,59 % и 92,86 %, анти-YscF-антитела – 100 % и 100 %, соответственно. Таким образом, оптимальными показателями диагностической информативности в нашем исследовании обладало определение антител к структурной субъединице инъектосомы T3SS YscF в иммуноблоте.

Клеточные реакции имеют критическое значение в формировании защиты, индуцированной ЖЧВ [75]. В последнее десятилетие были прояснены особенности клеточного иммунного ответа на вакцинацию ЖЧВ у человека. Особое значение имеют данные об установлении преимущественной поляризации Т-хелперного ответа по Th1/Th17-типу в ответ на ре-стимуляцию инактивированными взвесями вакцинного штамма или неспецифическим митогеном ConA [28, 33, 35, 52, 53, 56, 57]. Эти данные определяют актуальность разработки и оптимизации клеточных иммунотестов для оценки качества поствакцинального иммунитета у привитых ЖЧВ. Однако вопрос о требуемой антигенной специфичности таких тестов остается открытым. Среди доступных нам исследований подобного плана единичные работы анализировали специфичность клеточных реакций при вакцинации ЖЧВ у человека на небольших выборках с использованием ограниченного числа антигенов: F1 [81, 137], LcrV и Pla [81] и выделенных электроэлюцией из геля белков Yops (YopH-M, YopB, YopD-N, YopE) [46].

В нашей работе с целью установления типа, специфичности и длительности клеточных реакций иммунного ответа у привитых ЖЧВ мы определяли пролиферативную и цитокин-продуцирующую активность лимфоцитов (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-10), полученных от вакцинированных и невакцинированных доноров. Для этого МНК периферической крови *in vitro* стимулировали рекомбинантными белками F1, LcrV, Pla, YopM, YopE, YscF. В качестве положительных контролей использовали инактивированные взвеси бактерий,

выращенных при температуре 26°C (Yp26) и 37°C (Yp37), а также коммерческий митоген ConA.

При оценке пролиферативной функции лимфоцитов нам не удалось выявить достоверных различий в митоген- или антиген-индуцированном пролиферативном ответе между контрольными и вакцинированными донорами. Однако нами была обнаружена тенденция к повышению ИП в группе недавно вакцинированных доноров (A-RV), наиболее выраженная в ответ на стимуляцию инактивированными взвесями Yp37, Yp26, рекомбинатными белками YopE, Pla, YopM и F1, а также митогеном ConA. Наоборот, слабый пролиферативный ответ был выявлен во всех группах доноров при стимуляции МНК антигенами YscF и LcrV. Отсутствие достоверной дифференциации специфического и неспецифического ответа в нашем исследовании связана, по-видимому, как с низким содержанием антиген-специфических клеток памяти в периферической крови, так и наличием неспецифических эпитопов у стимулирующих белков, обуславливающих определенный процент кросс-реакций. Тем не менее, данные по пролиферативному ответу предполагали более выраженное участие YopE, Pla, YopM и F1 в вакциноиндуцированных клеточных реакциях иммунитета у привитых ЖЧВ доноров, что было подтверждено нами в дальнейшем при исследовании продукции цитокинов антиген-стимулированными МНК.

Спонтанная продукция цитокинов отражает функциональное состояние клеток иммунной системы в ответ на текущие стимулы, получаемые *in vivo*. При оценке спонтанной цитокин-продуцирующей функции МНК нами было отмечено достоверно более низкое содержание IL-4 в супернатантах от вакцинированных ЖЧВ доноров независимо от длительности поствакцинального периода ( $p < 0,05$ ). Продукция других цитокинов не отличалась от контроля. При этом уровни базальной секреции всех исследуемых цитокинов не коррелировали с количеством вакцинаций или лет, прошедших с последнего введения вакцины ( $p > 0,05$ ). Механизмы, индуцирующие выявленный феномен, не ясны. Интересно, что детализированная динамика уровней IL-4 МНК привитых ЖЧВ доноров в течение года после вакцинации ЖЧВ, представленная в ряде недавних работ, наглядно

показывает периодичность этапов достоверного снижения и повышения спонтанной продукции данного цитокина, что отражает, по мнению авторов, регуляторные реципрокные взаимосвязи с продукцией Th1-цитокинов [36, 52, 55, 57]. Тем не менее, в нашем исследовании показано стойкое снижение базальной секреции IL-4 даже в группе доноров со средней длительностью поствакцинального периода в 15 лет. Данное наблюдение требует дальнейших исследований, поскольку может отражать потенциально стойкое угнетение функции Th2-клеток, индуцированное выраженной антигенной нагрузкой в виде многократного введения ЖЧВ.

При исследовании антиген-индуцированной продукции цитокинов на первом этапе мы проводили стимуляцию МНК инактивированными взвесями вакцинного штамма Yp26 и Yp37 и коммерческим митогеном ConA. Результаты исследований позволили установить, что специфичной ( $p < 0,05$ ) для вакцинированных ЖЧВ доноров была продукция IFN- $\gamma$  и IL-4 в ответ на стимуляцию ConA, а также IFN- $\gamma$  и IL-17A при стимуляции Yp26 и Yp37. Выявленные изменения были характерны как для недавно вакцинированных, так и для доноров с длительностью поствакцинального периода более 1 года.

Представленные нами данные хорошо согласуются с результатами других авторов, показавших повышение секреции Th-1 и Th-2 цитокинов МНК привитых ЖЧВ при культивировании с неспецифическим митогеном в разные сроки после вакцинации/ревакцинации [28, 35, 52, 55, 56, 57]. Интересно, что, в отличие от ряда исследователей [33, 35, 55], мы не выявили продукции IL-17A МНК вакцинированных ЖЧВ доноров в ответ на стимуляцию ConA, что, вероятно, связано с различиями в дизайне и протоколах исследования. Тем не менее, нами была показана продукция IL-17A при стимуляции инактивированными взвесями вакцинного штамма Yp26 и Yp37, что доказывает специфический характер его индукции. Ключевая роль IL-17 в клеточно-опосредованном протективном иммунном ответе была продемонстрирована на легочной модели чумы в экспериментах на мышах [216]. Таким образом, выявленный Th-17-поляризованный ответ может быть вовлечен в механизм защиты, индуцируемой

ЖЧВ против легочной формы болезни. Выявленное нами повышение уровня IFN- $\gamma$  МНК привитых ЖЧВ доноров в ответ на стимуляцию Yp26 согласуется с полученными ранее данными [28].

На заключительном этапе нашей работы мы анализировали антигенную специфичность и длительность выявленных у вакцинированных ЖЧВ доноров клеточных реакций непосредственно с использованием панели рекомбинантных белков. Нами показано, что наиболее специфичными маркерными цитокинами поствакцинального ответа на ЖЧВ были IFN- $\gamma$ , IL-4 и IL-17A, ввиду отсутствия значимого изменения продукции данных цитокинов у контрольных доноров в ответ на ре-стимуляцию *in vitro* антигенами из рабочей панели при достоверном ее увеличении в опытной группе, что подтверждает полученные на предыдущем этапе данные. Напротив, индукция TNF- $\alpha$  и IL-10 наблюдалась и в контрольной группе при культивировании с отдельными белками.

Результаты проведенной работы продемонстрировали, что различные антигены чумного микроба в разной степени были вовлечены в индукцию секреции Th1/Th2/Th17 цитокинов у привитых ЖЧВ.

Нами впервые установлено, что специфичным для вакцинированных ЖЧВ доноров было повышение продукции Th1-цитокинов при стимуляции МНК антигенами F1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Pla, YopM, YopE (IFN- $\gamma$ ) и YscF (TNF- $\alpha$ ), повышение продукции Th2-цитокинов в ответ на стимуляцию белками F1 (IL-4), LcrV и YscF (IL-10) и усиление синтеза Th-17-цитокинов в ответ на стимуляцию МНК антигеном Pla (IL-17A). Описанные антиген-специфические клеточные реакции можно рассматривать как иммунологические маркеры клеточного поствакцинального иммунного ответа у вакцинированных ЖЧВ.

Наконец, важно отметить, что проводимые ранее исследования оценивали динамику продукции маркерных цитокинов у вакцинированных ЖЧВ в ограниченные сроки после иммунизации (максимум до 1 года после последней вакцинации). В связи с этим, приоритетными являются полученные нами данные о сохранении описанных специфичных клеточных реакций на протяжении в среднем 15 лет после последнего введения ЖЧВ. Это особенно важно для понимания общих

механизмов формирования противочумного иммунитета, поскольку считается, что как поствакцинальный, так и постинфекционный иммунитет носит кратковременный характер. Данные о формировании долгоживущей клеточной памяти в ответ на вакцинацию ЖЧВ открывают перспективы для создания живых противочумных вакцин нового поколения, индуцирующих продолжительный иммунитет.

Таким образом, в настоящей работе впервые было проведено комплексное исследование гуморального и клеточного иммунного ответа, индуцируемого у привитых ЖЧВ людей, с использованием панели высокоочищенных рекомбинантных белков чумного микроба. В результате были детально охарактеризованы антигенная специфичность и длительность реакций гуморального и клеточного иммунитета, что позволило выявить перспективные иммунологические маркеры для оценки поствакцинального иммунного ответа на вакцинацию ЖЧВ. В рамках проведенной работы была установлена диагностическая информативность экспериментальных серологических иммунотестов, разработанных на основе использования рекомбинантных белков чумного микроба в качестве сенситинов.



## ВЫВОДЫ

1. При исследовании иммунореактивности сывороток крови как вакцинированных привитых живой чумной вакциной, так и контрольных наивных доноров обнаруживаются положительные реакции сывороточных антител с большинством исследуемых рекомбинантных белков, однако для привитых характерно большее разнообразие антительного ответа, выраженное в более частом (в 5,9–8,5 раз) выявлении антител к комбинациям 4 различных сенситинов в индивидуальной сыворотке, а также в наличии нон-респондеров.

2. Маркерами гуморального ответа у привитых живой чумной вакциной доноров, выявляемыми с применением твердофазного иммуноферментного анализа, являются: повышение титров антител к F1 в группе недавно вакцинированных доноров и снижение частоты встречаемости и титров антител к Pla у привитых живой чумной вакциной независимо от срока последней иммунизации, в иммуноблоте – высокая серопревалентность к YscF (55,0–100,0%), к YopE (28,6 %) у недавно вакцинированных доноров и низкая – к Pla, независимо от длительности поствакцинального периода; длительное (в среднем, 15 лет после последней иммунизации) сохранение специфических антител к F1 и YscF.

3. У привитых живой чумной вакциной доноров клеточный иммунный ответ развивается по смешанному, Th1/Th2/Th17-типу, при этом маркерами клеточных реакций поствакцинального иммунного ответа является усиление продукции мононуклеарными клетками периферической крови Th1-цитокинов при стимуляции белками F1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Pla, YopM, YopE (IFN- $\gamma$ ) и YscF (TNF- $\alpha$ ), продукции Th2-цитокинов в ответ на стимуляцию белками F1 (IL-4), LcrV и YscF (IL-10) и синтеза Th-17-цитокинов (IL-17A) в ответ на стимуляцию белком Pla.

4. Выявленные клеточные реакции иммунитета носят долговременный характер, сохраняются спустя, в среднем, 15 лет (2–30 лет) после последней вакцинации и могут быть использованы для разработки и совершенствования

методов оценки качества поствакцинального иммунитета, индуцированного живой чумной вакциной.

5. Экспериментальные иммунотесты на основе рекомбинантных белков пригодны для оценки качества иммунного ответа, индуцированного живой чумной вакциной.

6. Диагностическая информативность экспериментальных иммунотестов на основе иммуноблотинга с использованием в качестве сенситинов рекомбинантных F1 и YscF, выраженная в специфичности и чувствительности теста, составила 70,59 % и 92,86 % и 100 % и 100 %, соответственно; на основе твердофазного иммуноферментного анализа и рекомбинантного F1 – 100 % и 42,86 %.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведение серологического мониторинга вакциноиндуцированного иммунного ответа у привитых живой чумной вакциной рекомендуется осуществлять с использованием расширенной панели рекомбинантных сенситинов, включающей такие иммуногены, как капсульный антиген F1, структурный компонент инъектосомы YscF, белок-эффектор системы секреции III типа YopE и активатор плазминогена Pla.

2. В качестве серологических тестов предпочтительно использовать метод иммуноблоттинга, позволяющий увеличить выявление серопозитивных доноров в 1,5–5,5 раз.

3. При исследовании реакций клеточного иммунитета у привитых живой чумной вакциной оценку продукции Th1-цитокинов целесообразно проводить путем *in vitro* стимуляции мононуклеаров периферической крови такими белками, как F1, Pla, YopM, YopE и YscF, продукции Th2-цитокинов – F1, LcrV и YscF, Th17-цитокинов – Pla.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ГЧЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
- ЖЧВ – живая чумная вакцина, штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ
- ИП – индекс пролиферации
- ЛПС – липополисахарид
- МНК – мононуклеарные клетки периферической крови
- НЦМ – нитроцеллюлозная мембрана
- ООИ – особо опасные инфекции
- ОСА – основной соматический антиген
- РПГА – реакция пассивной гемагглютинации
- РСК – реакция связывания комплемента
- СГТ – средние геометрические титры
- ТИФА – твердофазный иммуноферментный анализ
- ConA – concanavalin A from *Canavalia ensiformis*, митоген
- ELISA – enzyme linked immunosorbent analysis, твердофазный иммуноферментный анализ
- FBS – fetal bovine serum, фетальная сыворотка коров
- IFN- $\gamma$  – интерферон гамма
- IL-10 – интерлейкин 10
- IL-17A – интерлейкин 17A
- IL-4 – интерлейкин 4
- МНС I, II – major histocompatibility complex I, II, главный комплекс гистосовместимости I и II класса
- NCS – newborn calf serum, сыворотка новорожденного теленка
- PBS – phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер
- PBST – фосфатно-солевой буфер, дополненный Tween 20
- T3SS – Type Three Secretion System, система секреции третьего типа
- TMB – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
- TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа
- Ур26 – бактерии вакцинного штамма ЖЧВ, выращенные на НІВ-агаре при температуре 26°C в течение 48 часов
- Ур37 – бактерии вакцинного штамма ЖЧВ, выращенные на НІВ-агаре при температуре 26°C в течение 24 часов с последующей инкубацией посевов при 37°C на протяжении 18–24 часов

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Активация *in vitro* Т-хелперов под влиянием антигенов *Yersinia pestis* у людей, вакцинированных против чумы / В. А. Кожевников, А. Л. Кравцов, О. М. Кудрявцева и др. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2022. – Т. 21, № 5. – С. 58–63.
2. Анализ полногеномной последовательности штаммов *Yersinia pestis* на основе ступенчатого 680-SNP алгоритма / Г. Н. Одинокоев, Г. А. Ерошенко, Я. М. Краснов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 49–54.
3. Ассоциация показателей функциональной активности маркеров Th1 и Th2 иммунитета с полиморфизмом генов HLA у лиц, вакцинированных против чумы / О. М. Кудрявцева, С. А. Бугоркова, Т. Н. Щуковская [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 315–324.
4. Басова, Н. Н. Помесячная динамика антитоксического иммунитета против дифтерии и столбняка и нормальных антител к фракции 1 чумного микроба у взрослых / Н. Н. Басова, Ф. Б. Кравцов, Л. С. Наумович // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. – 1982. – № 3. – С. 82–86.
5. Бахрах, Е. Э. Изучение химического состава аллергена пестина ПП. Сообщение 1. Очистка пестина фильтрацией через гель сефадекса / Е. Э. Бахрах, Т. М. Тараненко // Проблемы особо опасных инфекций. – 1968. – № 2. – С. 146–153.
6. Белобородов, Р. А. Иммунодепрессивные эффекты антилимфоцитарной сыворотки при иммунитете к чуме / Р. А. Белобородов, М. В. Зубова, И. В. Исупов // Проблемы особо опасных инфекций. – 1978. – Т. 4, № 62. – С. 35–38.
7. Брико, Н. И. Критерии оценки эффективности вакцинации / Н. И. Брико // Лечащий Врач. – 2001. – № 3. – С. 64–70. – Режим доступа: <https://www.lvrach.ru/2001/03/4528644>.
8. Брико, Н. И. Оценка качества и эффективности иммунопрофилактики / Н. И. Брико // Лечащий врач. – 2012. – С. 10–12. – Режим доступа: <http://www.lvrach.ru/2012/10/15435557>.

9. Вакцина чумная молекулярная микроинкапсулированная (ВЧММ) // Бактериология. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 74–75.

10. Вариабельность возбудителя чумы и проблемы его диагностики: сборник научных трудов / ред. Ю. М. Ломов. – Ростов-на-Дону : Антей, 2009. – 533 с.

11. Васильева, Г. И. Фагоцитарная активность макрофагов морских свинок, иммунизированных антигенами FIA, FIB, водно-солевым экстрактом и живой чумной вакциной EB / Г. И. Васильева, В. Л. Пустовалов // Проблемы особо опасных инфекций. – 1977. – Т. 5, №58. – С. 34–36.

12. Влияние противочумной вакцинации на фагоцитарную активность гранулоцитов крови человека / А. Л. Кравцов, С. Н. Ключева, В. А. Кожевников [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2021. – Т. 24, № 1. – С. 123–132.

13. Внутрикожная аллергическая реакция на пестин у людей, вакцинированных и невакцинированных живой противочумной вакциной / Л. П. Павлова, В. П. Чудесова, Л. В. Филимонова, В. К. Волобуева // Специфическая профилактика особо опасных инфекций. Сборник научных работ противочумных учреждений. – М.: «Медицина», 1964. – С. 93–98.

14. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина 1, антигена фракция 1 и экзотоксина «мышинного» токсина / О. А. Проценко, П. И. Анисимов, О. Т. Можаров [и др.] // Генетика. – 1983. – № 19. – С. 1081–1090.

15. Выявление иммунной памяти на первом этапе антигенспецифического клеточного ответа при повторном введении живой чумной вакцины / Б. В. Каральник, П. Н. Дерябин, Т. Г. Денисова [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18, № 6. – С. 26–33.

16. Генетические маркеры иммунного ответа на антигены *Yersinia pestis* F1 и V микрокапсулированной чумной вакцины / Е. Л. Назарова, И. А. Дятлов, Н. М. Поздеев [и др.] // Russian Biomedical Research (Российские биомедицинские исследования). – 2017 (опубл. 2020). – Т. 2, № 2. – С. 19–28. – URL: <https://ojs3.gpmu.org/index.php/biomedical-research/article/view/541>

17. Девдариани, З. Л. Реактивность, серологические и аллергические показатели иммунитета у людей, привитых подкожно различными дозами чумой сухой живой вакцины : автореф. дис. ... канд. мед. наук. / Девдариани Зураб Леванович. – Саратов, 1977. – 16. с.

18. Дентовская, С. В. Молекулярные основы вакцинопрофилактики чумы / С. В. Дентовская, П. Х. Копылов, С. А. Иванов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – №3. – С. 3–12.

19. Динамика антительного ответа морских свинок к белкам *Yersinia pestis* при чуме / Т. В. Гапельченкова, Р. З. Шайхутдинова, А. С. Трунякова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 4. – С. 50–56.

20. Домарадский, И. В. Чума / И. В. Домарадский. – Москва : Медицина, 1998. – 176 с.

21. Дубровина, В. И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности организма к возбудителям чумы, псевдотуберкулеза и туляремии (экспериментальное исследование) : дис. ... д-ра биол. наук : 14.00.16 / Дубровина Валентина Ивановна. – Иркутск, 2004. – 261 с.

22. Емельянова, Н. В. Влияние антигенов и штаммов чумного микроба с экспрессией различных детерминант иммуногенности и вирулентности на уровень бласттрансформации лимфоцитов и активность интерлейкинов (1 и 2) при формировании иммунитета к чуме : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 14.00.36 / Емельянова Наталья Вячеславовна. – Саратов, 1992. – 20 с.

23. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы / В. В. Кутырев, А. Ю. Попова, Е. Б. Ежлова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – № 4. – С. 9–16.

24. Зависимость между уровнем сероперестройки вакцинированных животных и напряженностью иммунитета к экспериментальной чуме / А. А.

Бывалов, М. Ю. Дубровин, Г. Д. Елагин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 7. – С. 48–51.

25. Изучение активности ЕК и К-клеток у людей, вакцинированных и ревакцинированных против чумы / С. Ю. Пчелинцев, Е. В. Солохин, С. В. Юров [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1994. – № 2. – С. 99–102.

26. Изучение влияния различных антигенов *Yersinia pestis* на клеточное звено иммунитета / И.В. Исупов, Л.С. Назарова, Л.П. Павлова [и др.] // Журнал микробиологии. – 1990. – № 9. – С. 85–89.

27. Иммунохимическая характеристика первого компонента пестина / Е. Э. Бахрах, Т. М. Тараненко, В. И. Вейнблат [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 1971. – Т 2, № 18. – С. 45–51.

28. Индуцированная продукция IFN- $\gamma$  и IL-4 как показатель функциональной активности Th1- и Th2-клеток у вакцинированных против чумы людей / Т. Н. Щуковская, Е. А. Смолькова, Т. П. Шмелькова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – Т. 6, № 61. – С. 78–83.

29. Использование антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета / А. Н. Куличенко, Н. В. Абзаева, С. Е. Гостищева [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 203–208.

30. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 3. Ревакцинирующие свойства живой чумной вакцины и препаратов чумных химических вакцин для павианов гамадрилов / С. М. Дальвадянц, М. Ю. Дубровин, А. А. Бывалов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2005. – № 1. – С. 62–67.

31. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы / С. А. Бугоркова, З. Л. Девдариани, Т. Н. Щуковская, В. В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 63–69.



32. Капсульный антиген чумного микроба / Л. А. Кадникова, П. Х. Копылов, С. В. Дентовская, А. П. Анисимов // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5, № 3. – С. 201–218.

33. Ключева, С. Н. Выявление коррелятов протекции от *Yersinia pestis* на мышинной модели и оценка возможности применения их в качестве маркеров эффективности вакцинации у людей / С. Н. Ключева, С. А. Бугоркова, Т. Н. Каштанова // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12, № 2. – С. 253–262.

34. Книрель, Ю. А. Липополисахарид чумного микроба *Yersinia pestis*: структура, генетика, биологические свойства / Ю. А. Книрель, А. П. Анисимов // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2012. – № 3. – С. 49–61.

35. Комплексное иммунологическое исследование вакцинированных живой чумной вакциной лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного очага чумы в Республике Калмыкия / Т. Н. Щуковская, С. А. Бугоркова, Н. И. Микшис [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 38–50.

36. Комплексный анализ корреляционных взаимосвязей между показателями гуморального и клеточного иммунитета у лиц, вакцинированных против чумы / С. Н. Ключева, С. А. Бугоркова, А. Ю. Гончарова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, №1. – С. 135–146.

37. Константинова, Н. С. Фагоцитоз бактерий чумы в культуре лимфоидной ткани / Н. С. Константинова, И. В. Исупов // Проблемы особо опасных инфекций. – 1972. – Т. 1, №23. – С. 52–55.

38. Коробков, Г. Г. Некоторые аспекты иммунологии чумы / Г. Г. Коробков, Г. И. Борсук, Л. Л. Лясоцкий // Проблемы особо опасных инфекций. – 1973. – Т.1, № 29. – С. 59–63.

39. Коробкова, Е. И. Живая противочумная вакцина / Е.И. Коробкова. – Москва: Медгиз, 1956. – 206 с.

40. Коробкова, Е. И. Внутрикожная аллергическая реакция как показатель иммунитета против чумы / Е. И. Коробкова, Л. П. Павлова, Е. Э. Бахрах // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1961. – № 9. –С. 37–41.

41. Коссе, Л. В. Проблемы специфической диагностики чумного микроба при использовании капсульного антигена и антител к нему / Л. В. Коссе, С. А. Лебедева // Инфекционные болезни: новое в диагностике и терапии: тез. докл. науч. конф. III Съезд Итало-Рос. Общ-ва по инф. бол. – Санкт-Петербург, 1998. – С. 46.

42. Кравцов, А. Л. Повышение экспрессии тирозиновой протеинфосфатазы (CD45) на поверхности гранулоцитов крови человека под влиянием вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ *ex vivo* и *in vivo* / А. Л. Кравцов, С. Н. Ключева, В. А. Кожевников, С. А. Бугоркова // Медицинская иммунология. – 2024. – Т. 26, № 1. – С. 135–142.

43. Кудрявцева, О. М. Комплексный подход к оценке и прогнозированию иммунного ответа на вакцинацию у привитых против чумы людей / О. М. Кудрявцева, А. Ю. Гончарова, В. А. Кожевников, С. А. Бугоркова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024 – №3 – С. 118–125.

44. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В. В. Кутырева. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – Изд. 2-е, перераб. и доп. — 560 с.

45. Медуницын, Н. В. Проблемы коррекции иммунитета при вакцинации / Н. В. Медуницын // Иммунология. – 2017. – Т. 38, № 3. – С. 148–154.

46. Микеров, А. Н. Секретируемые белки (Yop), кодируемые плазмидой кальцийзависимости возбудителя чумы: выделение и изучение иммунобиологических свойств : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00,07 / Микеров Анатолий Николаевич. – Саратов, 1999. – 22 с.

47. Микшис, Н. И. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы / Н. И. Микшис, В. В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 1. – С. 50–63.

48. Модифицированные фосфатом кальция F1-и LcrV-антигены *Yersinia pestis*, иммобилизованные на плоских микрокристаллах глутамина, проявляют повышенную иммуногенность для мышей и морских свинок / Е. А. Красильникова,

М. Е. Платонов, П. Х. Копылов [и др.] // В книге: Материалы VIII Национального конгресса бактериологов. – Москва, 2023. – С. 69–70.

49. Наумов, А. В. Иммунология чумы : руководство / А. В. Наумов, М. Ю. Ледванов, И. Г. Дроздов. – Саратов : [б. и.], 1992. – 172 с.

50. Научно-методическое обеспечение мероприятий по проведению иммунологического мониторинга вакцинированных против чумы лиц, проживающих на территориях природных очагов инфекции / С. А. Бугоркова, Т. Н. Щуковская, Н. И. Микшис [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 2. – С. 6–13.

51. Николаев, Н. И. Чума: клиника, диагностика, лечение и профилактика / Н. И. Николаев. – М.: Медицина, 1968. – 240 с.

52. Оценка иммунологической эффективности вакцинации населения против чумы в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге / К. М. Корытов, В. В. Войткова, В. И. Дубровина [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17, № 6. – С. 87–97.

53. Оценка иммунологической эффективности вакцинации против чумы в активном природном очаге. Сообщение 1. Цитокиновый и иммуноглобулиновый статус / К. М. Корытов, В. В. Войткова, В. И. Дубровина [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 16, № 2. – С. 45–48.

54. Оценка специфического гуморального и клеточного иммунитета у людей, периодически вакцинирующихся против чумы / В. В. Фирстова, В. В. Калмантаева, А. А. Горбатов [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2015. – № 3. – С. 62–68.

55. Оценка уровня гуморального и клеточного иммунитета после ревакцинации против чумы лиц, проживающих на территории прикаспийского песчаного природного очага / С. Н. Ключева, С. А. Бугоркова, Т. Н. Щуковская [и др.] // Медицинская иммунология. – 2018. – Т. 20, № 2. – С. 241–250.

56. Оценка эффективности вакцинации населения против чумы в Тувинском природном очаге / К. М. Корытов, В. В. Войткова, В. И. Дубровина [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. – 2019. – Т. 4, № 5. – 31–37.

57. Оценка эффективности вакцинации населения против чумы в тувинском природном очаге. Сообщение 2: динамика показателей иммунного статуса после ревакцинации / К. М. Корытов, В. В. Войткова, В. И. Дубровина [и др.] // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2021. – Т. 6, № 5. – С. 44–56.

58. Оценка эффективности вакцинации: основные подходы и спорные вопросы / Н. И. Брико, Ю. В. Лобзин, А. А. Баранов [и др.] // *Педиатрическая фармакология*. – 2014. – Т. 11, № 4. – С. 8–15.

59. Оценка эффективности чумных живых вакцин по протективной активности их кроличьих антисывороток / А. Ф. Филиппов, Н. Г. Пономарев, Н. Н. Огарев [и др.] // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 1973. – Т. 5, № 33. – С. 20–26.

60. Палагин, А. Ю. Фибринолизин чумного микроба: биохимические и иммунохимические аспекты : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00,07 / Палагин Александр Юрьевич. – Саратов, 1993. – 23 с.

61. Протективные свойства фракции I чумного микроба в эксперименте / В. Н. Паутов, В. Ю. Чичерин, В. И. Евстигнеев [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. – 1979. – № 10. – С. 37–41.

62. Прямая детекция антител к *Yersinia pestis* с использованием стеклянных микроструктурных волноводов как экспресс-метод оценки сероконверсии у привитых против чумы лиц / О. М. Кудрявцева, Ю. С. Скибина, В. А. Кожевников [и др.] // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2022. – Т. 21, № 6. – С. 89–96.

63. Разработка биологического микрочипа для выявления антител к антигенам возбудителя чумы / Д. В. Уткин, М. Н. Киреев, Н. П. Гусева [и др.] // *Инфекция и иммунитет*. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 393–398.

64. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-АТ-Ф1) *Yersinia pestis* / З. Л. Девдариани, Н. Е. Терешкина, Т. М. Тараненко [и др.] // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2013. – № 1. – С. 74–77.

65. Роль антигенов *Yersinia pestis* в адгезии к макрофагам J774, оцененная методом оптической ловушки / И. В. Конышев, С. А. Иванов, П. Х. Копылов [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 352–359.

66. Салтыкова, Р. А. Опыт 30-летнего изучения стабильности свойств чумного вакцинного штамма EV в СССР / Р. А. Салтыкова, М. М. Файбич // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1975. – № 6. – С. 3–8.

67. Самойлова, Л. В. Динамика развития иммунитета к чуме после прививки живой вакциной и особенности иммуногенеза при этой вакцинации : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00,07 / Л. В. Самойлова. – Саратов, 1963. – 24 с.

68. Саяпина, Л. В. Пролиферация и популяционный состав иммунокомпетентных клеток в динамике вакцинального и инфекционного процессов при чуме : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.36 / Саяпина Лидия Васильевна. – Саратов, 1991. – 19 с.

69. Свистунов, В. М. Профилактический эффект живой вакцины EV НИИЭГ при массовых прививках населения / В. М. Свистунов // Материалы научно-практической конференции, посвященной 100-летию образования противочумной службы России, в 2-х тт. – Саратов, 1997. – Т. 1. – С. 239.

70. Скрининг показателей специфического иммунитета у вакцинированных против чумы людей в рамках обеспечения эпидемиологического благополучия на территории природных очагов чумы Российской Федерации / О. М. Кудрявцева, В. А. Кожевников, А. Ю. Гончарова [и др.] // В книге: Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы. Сборник трудов XV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского. – Москва, 2023. – С. 115–116.

71. Слогоцкая, Л. В. Сравнительная характеристика иммунологических тестов для выявления туберкулезной инфекции. Возможность массового скрининга / Л. В. Слогоцкая, Е. М. Богородская // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – Т. 94, № 5. – С. 5–16.

72. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические

аспекты / С. В. Балахонов, А. Ю. Попова, А. И. Мищенко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 1. – С. 55–60.

73. Смолькова, Е. А. Влияние бактерий *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* и их антигенов на экспрессию Toll-подобных рецепторов (TLR2, TLR4) клетками врожденного и адаптивного иммунитета : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.02.03, 14.03.09 / Смолькова Елена Анатольевна. – Саратов, 2012. – 22 с.

74. Спектр антител при введении чувствительным животным бактерий *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* / В. И. Дробков, И. В. Маракулин, И. П. Погорельский [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1996. – № 2. – С. 81–85.

75. Специфическая профилактика чумы: состояние и перспективы : коллективная монография / А. Ю. Попова, С. А. Бугоркова, Н. В. Попов [и др.]; под ред. доктора мед. наук, проф. А. Ю. Поповой, академика РАН, доктора мед. наук, проф. В. В. Кутырева. – Саратов : Амирит, 2021. – 302 с.

76. Сравнительная генетическая характеристика вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV и его предполагаемых «вирулентных производных» / В. В. Кутырев, Г. А. Ерошенко, Л. М. Куклева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 3. – С. 50–56.

77. Сравнительная частота обнаружения специфических антител к капсульному антигену и липополисахариду *Yersinia pestis* у привитых живой чумной вакциной / З. Л. Девдариани, В. А. Федорова, О. В. Громова, Т. М. Тараненко // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 4. – С. 39–41.

78. Структурная перестройка органов белых мышей, вакцинированных *Yersinia pestis* EV в сочетании с селенорганическим соединением 974zh / В. И. Дубровина, Т. П. Старовойтова, О. В. Юрьева [и др.] // Acta Biomedica Scientifica. // – 2022. – Т. 7, №3. – С. 110–120.

79. Тихомирова, Е. И. Применение метода пассивного локального гемолиза в геле для изучения на клеточном уровне иммунного ответа к чуме / Е. И. Тихомирова, Л. П. Павлова, А. В. Горькова // Биотехнология, иммунология и биохимия особо опасных инфекций. – Саратов, 1989. – С. 123–128.

80. Филимонова, Ю. А. Цитосерологические показатели иммунитета и их коррелирование у животных, привитых против чумы / Ю. А. Филимонова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1974. – № 8. – С. 37–41.

81. Фирстова, В. В. Экспериментально-иммунологическое обоснование выбора стратегии оценки поствакцинального иммунитета против чумы и туляремии : автореф. дис ... д-ра. мед. наук : 14.03.09 / Фирстова Виктория Валерьевна. – М., 2015. – 49 с.

82. Щипелева, И. А. Современное состояние и перспективы специфической профилактики чумы / И. А. Щипелева, О. Ф. Кретенчук, В. А. Коршенко, Е. И. Марковская // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2022. – Т. 12, № 1. – С. 101–109.

83. Экспрессный способ прямой детекции иммунных комплексов антиген-антитело / О. М. Кудрявцева, В. А. Кожевников, Т. Н. Щуковская [и др.] // В книге: Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы. Сборник трудов XIV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского. – Москва, 2022. – С. 89.

84. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. / Н. В. Попов, А. Н. Матросов, Т. В. Князева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 1. – С. 5–12.

85. A comparison of Plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model / P. Russell, S. M. Eley, S. E. Hibbs [et al.] // Vaccine. – 1995. – Vol. 13, № 16. – P. 1551–1556.

86. A new improved sub-unit vaccine for plague: the basis of protection / E. D. Williamson, S. M. Eley, K. F. Griffin [et al.] // FEMS Immunology and Medical Microbiology. – 1995. – Vol. 12, № 3–4. – P. 223–230.

87. A novel sORF gene mutant strain of *Yersinia pestis* vaccine EV76 offers enhanced safety and improved protection against plague / X. Guo, Y. Xin, Z. Tong. [et al.] // PLOS Pathogens. – 2024. – Vol. 20, №3. – P. e1012129

88. A safety and immunogenicity study of a novel subunit plague vaccine in cynomolgus macaques / L. Liu, D. Wei, Z. Qu [et al.] // *Journal of Applied Toxicology*. – 2018. – Vol. 38, № 3. – P. 408–417.

89. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination / R. W. Wieten, E. F. Jonker, van E. M. Leeuwen [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11, № 3. – e0149871.

90. A single component two-valent LcrV-F1 vaccine protects non-human primates against pneumonic plague / J. Chichester, K. Musiyshuk, C. Farrance [et al.] // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27, № 25–26. – P. 3471–3474.

91. Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects mice against plague / S. E. Leary, E. D. Williamson, K. F. Griffin [et al.] // *Infect Immun*. – 1995. – Vol. 63, № 8. – P. 2854–2858.

92. Alderson, J. Factors influencing the re-emergence of plague in Madagascar / J. Alderson, M. Quastel, E. Wilson, D. Bellamy // *Emerging Topics in Life Sciences*. – 2020. – Vol. 4, № 4. – P. 411–421.

93. Amanna, I. J. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens / I. J. Amanna, N. E. Carlson, M. K. Slifka // *The New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol. 357, № 19. – P. 1903–1915.

94. Amanna, I. J. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination / I. J. Amanna, M. K. Slifka, S. Crotty // *Immunological Reviews*. – 2006. – Vol. 211. – P. 320–337.

95. Amanna, I. J. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity / I. J. Amanna, M. K. Slifka // *Immunological Reviews*. – 2010. – Vol. 236, № 1. – P. 125–138.

96. Amino acid and structural variability of *Yersinia pestis* LcrV protein / A. P. Anisimov, S. V. Dentovskaya, E. A. Panfertsev [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2010. – № 10. – P. 137–145.



97. An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model / E. D. Williamson, P. M. Vesey, K. J. Gillhespy [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. – 1999. – Vol. 116, № 1. – P. 107–114.
98. Andersen, P. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis / P. Andersen, M. E. Munk, J. M. Pollock, T. M. Doherty // *Lancet*. – 2000. – Vol. 356(9235). – P. 1099–1104.
99. Anisimov, A. P. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics / A. P. Anisimov, K. K. Amoako // *Journal of Medical Microbiology*. – 2006. – Vol. 55(Pt 11). – P. 1461–1475.
100. Antibodies and cytokines independently protect against pneumonic plague / L. W. Kummer, F. M. Szaba, M. A. Parent [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, № 52. – P. 6901–6907.
101. Antibody profiling in plague patients by protein microarray / B. Li, D. Zhou, Z. Wang [et al.] // *Microbes and Infection*. – 2008. – Vol. 10, № 1. – P. 45–51.
102. Antigenic profiling of yersinia pestis infection in the Wyoming coyote (*Canis latrans*) / G. Vernati, W. H. Edwards, T. E. Rocke [et al.] // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2011. – Vol. 47, № 1. – P. 21–29.
103. Antimicrobial Treatment and Prophylaxis of Plague: Recommendations for Naturally Acquired Infections and Bioterrorism Response / C. A. Nelson, D. Meaney-Delman, S. Fleck-Derderian [et al.] // *MMWR Recommendations and Reports*. – 2021. – Vol. 70, № 3. – P. 1–27.
104. Bacterial protein microarrays for identification of new potential diagnostic markers for *Neisseria meningitidis* infections / S. Steller, P. Angenendt, D. J. Cahill [et al.] // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5, № 8. – P. 2048–2055.
105. Bezerra, M. F. Evaluation of a multi-species Protein A-ELISA assay for plague serologic diagnosis in humans and other mammal hosts / M. F. Bezerra, C. C. Xavier, A. M. P. Almeida, C. R. S. Reis // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2022. – Vol. 16, № 5. – e0009805.
106. Bi, Y. Immunology of *Yersinia pestis* Infection / Y. Bi // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2016. – Vol. 918. – P. 273–292.

107. Biomarkers Definitions Working Group; Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2001. – Vol. 69, № 3. – P. 89–95.

108. Biowarfare, bioterrorism and biocrime: a historical overview on microbial harmful applications / M. Oliveira, G. Mason-Buck, D. Ballard [et al.] // *Forensic Science International*. – 2020. – Vol. 314. – P. 110366.

109. Bliska, J. B. Modulation of innate immune responses by *Yersinia* type III secretion system translocators and effectors / J. B. Bliska, X. Wang, G. I. Viboud, I. E. Brodsky // *Cellular Microbiology*. – 2013. – Vol. 15, № 10. – P. 1622–1631.

110. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow / A. Boyum // *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. – 1968. – 21 (Suppl 97):77

111. Brady, C. Pre-clinical models to define correlates of protection for SARS-CoV-2 / C. Brady, T. Tipton, S. Longet, M. W. Carroll // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1166664.

112. Bridging Animal and Human Data in Pursuit of Vaccine Licensure / C. L. Finch, W. E. Dowling, T. H. King [et al.] // *Vaccines (Basel)*. – 2022. – Vol. 10, № 9. – P. 1384.

113. Broad T cell immunity to the LcrV virulence protein is induced by targeted delivery to DEC-205/CD205-positive mouse dendritic cells / Y. Do, C. G. Park, Y. S. Kang [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 38, № 1. – P. 20–29.

114. Brubaker, R. R. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersiniae*: roles of Yops and LcrV (V antigen) / R. R. Brubaker // *Infection and Immunity*. – 2003. – Vol. 71, № 7. – P. 3673–3681.

115. Butler, T. Diagnosis and treatment / T. Butler. – In: Butler, T. ed. *Plague and other Yersinia infections*. New York & London: Plenum Medical Book Company, 1991. – P. 161–177.

116. Butler, T. The serological response to *Yersinia pestis* infection / T. Butler, B. W. Hudson // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1977. – Vol. 55, № 1. – P. 39–42.

117. Carniel, E. The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptake island / E. Carniel // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2001. – Vol. 3. – P. 561–569.
118. Castellino, F. Generating memory with vaccination / F. Castellino, G. Galli, G. Del Giudice, R. Rappuoli // *European Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 39, № 8. – P. 2100–2105.
119. Cavanaugh, D. C. The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague / D. C. Cavanaugh, R. Randall // *The Journal of Immunology*. – 1959. – Vol. 83. – P. 348–363.
120. Cell-mediated protection against pulmonary *Yersinia pestis* infection // *Infect* / Parent M. A., Berggren K. N., Kummer L.W. [et al.] // *Infection and immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 11. – P. 7304–7310.
121. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal laboratory-acquired infection with an attenuated *Yersinia pestis* Strain--Chicago, Illinois, 2009. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. – 2011. – Vol. 60, № 7. – P. 201–205.
122. Characterization of systemic and pneumonic murine models of plague infection using a conditionally virulent strain / G. Mellado-Sanchez, K. Ramirez, C. B. Drachenberg [et al.] // *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 36. – P. 113–128.
123. Chen, T. H. An evaluation of *Pasteurella pestis* fraction-1-specific antibody for the confirmation of plague infections / T. H. Chen, K. F. Meyer // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1966. – Vol. 34, № 6. – P. 911–918.
124. Chen, T. H. Comparison of the immune response to three different *Yersinia pestis* vaccines in guinea pigs and langurs / T. H. Chen, L. E. Foster, K. F. Meyer // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1974. – Vol. 129. – Suppl: S53–61.
125. Chen, T. H. *Yersinia pestis*: correlation of ultrastructures and immunological status / T. H. Chen, S. S. Elberg, J. Boyles, M. A. Velez // *Infection and Immunity*. – 1975. – Vol. 11, № 6. – P. 1382–1390.
126. Child mortality and causes of death // World Health Organization, 2020. – URL: [https://www.who.int/gho/child\\_health/mortality/mortality\\_under\\_five\\_text/en/](https://www.who.int/gho/child_health/mortality/mortality_under_five_text/en/).

127. Chung, L. K. Yersinia versus host immunity: how a pathogen evades or triggers a protective response / L. K. Chung, J. B. Bliska // *Current Opinion in Microbiology*. – 2016. – Vol. 29. – P. 56–62.

128. Circumventing *Y. pestis* Virulence by Early Recruitment of Neutrophils to the Lungs during Pneumonic Plague / Y. Vagina, A. Zauberman, Y. Levy [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2015. – Vol. 11, № 5. – e1004893.

129. Cohen, R. J. Pneumonic plague in an untreated plague-vaccinated individual / R. J. Cohen, J. L. Stockard // *The Journal of the American Medical Association*. – 1967. – Vol. 202. – P. 365–366.

130. Comparative tests for detection of plague antigen and antibody in experimentally infected wild rodents / A. J. Shepherd, D. E. Hummitzsch, P. A. Leman [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1986. – Vol. 24, № 6. – P. 1075–1078.

131. Comparing the clinical efficacy of COVID-19 vaccines: a systematic review and network meta-analysis / V. Rotshild, B. Hirsh-Racah, I. Miskin [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – P. 22777.

132. Comparison of immunological responses of plague vaccines F1+rV270 and EV76 in Chinese-origin rhesus macaque, *Macaca mulatta* / Y. Qiu, Y. Liu, Z. Qi [et al.] // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 72, № 5. – P. 425–433.

133. Comparison of mouse, guinea pig and rabbit models for evaluation of plague subunit vaccine F1+rV270 / Z. Qi, L. Zhou, Q. Zhang [et al.] // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, № 6. – P. 1655–1660.

134. Comparison of passive haemagglutination and enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of plague / J. E. Williams, L. Arntzen, D. M. Robinson [et al.] // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1982. – Vol. 60, № 5. – P. 777–781.

135. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak / K. Ewer, J. Deeks, L. Alvarez [et al.] // *Lancet*. – 2003. – Vol. 361, № 9364. – P. 1168–1173.

136. Cornelis, G. R. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry / G. R. Cornelis // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2002. – Vol. 3, № 10. – P. 742–752.

137. Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine / V. L. Braciale, M. Nash, N. Sinha [et al.] In: Georgiev, V. S., Western, K. A., McGowan, J. J. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Infectious Disease. – Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2008. – P. 473–480.
138. Correlates of vaccine-induced protection: methods and implications. – World Health Organization, 2013. – 55 p. URL: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/84288/WHO\\_IVB\\_13.01\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/84288/WHO_IVB_13.01_eng.pdf?sequence=1)
139. D'Argenio, D. A. Wilson CB A decade of vaccines: Integrating immunology and vaccinology for rational vaccine design / D. A. D'Argenio, C. B. Wilson // *Immunity*. – 2010. – Vol. 33, № 4. – P. 437–440.
140. de Almeida, A. M. Evaluation of three serological tests for the detection of human plague in northeast Brazil / A. M. de Almeida, L. C. Ferreira // *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. – 1992. – Vol. 87, № 1. – P. 87–92.
141. Demeure, C. E. Live vaccines against plague and pseudotuberculosis / C. E. Demeure // *Yersinia: Systems Biology and Control*. – Hinnebusch : Caister Academic Press, 2012. – P.143–168.
142. Dennis, D. T. Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control / D. T. Dennis, K. L. Gage, N. Gratz, E. Tikhomirov // *The Weekly Epidemiological Record*. – 1999. – Vol. 74. – P. 447.
143. Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein sequences / Y. Wang, W. Wu, NN. Negre [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 251.
144. Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of *Yersinia pestis* antibodies in humans and reservoirs / M. Rajerison, S. Dartevelle, L. A. Ralafiarisoa [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2009. – Vol. 3, № 4. – e421.
145. Development of in vitro correlate assays of immunity to infection with *Yersinia pestis* / J. Bashaw, S. Norris, S. Weeks [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2007. – Vol. 14, № 5. – P. 605–616.

146. Discordance in the effects of *Yersinia pestis* on the dendritic cell functions manifested by induction of maturation and paralysis of migration / B. Velan, E. Bar-Haim, A. Zauberman [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2006. – Vol. 74, № 11. – P. 6365–6376.

147. Du, Y. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis / Y. Du, R. Rosqvist, A. Forsberg // *Infection and Immunity*. – 2002. – Vol. 70, № 3. – P. 1453–1460.

148. Easterbrook, T. J. Studies on the immunogenicity of the Pla protein from *Yersinia pestis* / T. J. Easterbrook, K. Reddin, A. Robinson, N. Modi // *Contributions to microbiology and immunology*. – 1995. – Vol. 13. – P. 214–215.

149. Efficacy trials of Plague Vaccines: endpoints, trial design, site selection : WHO Workshop Meeting Report. – INSERM, Paris, France, April 23, 2018. – URL: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/blue-print/plaguevxeval-finalmeetingreport.pdf?sfvrsn=c251bd35\\_2](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/blue-print/plaguevxeval-finalmeetingreport.pdf?sfvrsn=c251bd35_2)

150. Elsner, R. A. Germinal center and extrafollicular B cell responses in vaccination, immunity, and autoimmunity / R. A. Elsner, M. J. Shlomchik // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53, № 6. – P. 1136–1150.

151. Elvin, S. J. Stat 4 but not Stat 6 mediated immune mechanisms are essential in protection against plague / S. J. Elvin, E. D. Williamson // *Microbial Pathogenesis*. – 2004. – Vol. 37, № 4. – P. 177–184.

152. Enhanced Macrophage M1 Polarization and Resistance to Apoptosis Enable Resistance to Plague / E. Pachulec, R. B. Abdelwahed Bagga, L. Chevallier [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 216, № 6. – P. 761–770.

153. Escudero-Pérez, B. Immune correlates of protection for SARS-CoV-2, Ebola and Nipah virus infection / B. Escudero-Pérez, P. Lawrence, J. Castillo-Olivares // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1156758.

154. Evaluation of human antibodies from vaccinated volunteers for protection against *Yersinia pestis* infection / L. Zhang, B. Zheng, J. Lu [et al.] // *Microbiology spectrum*. – 2024. – Vol. 12, №10. – P. e0105424.

155. Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine / T. E. Erova, J. A. Rosenzweig, J. Sha [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2013. – Vol. 20, № 2. – P. 227–238.

156. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli* / V. Kutyrev, R. J. Mehig, V. L. Motin [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1999. – Vol. 67, № 3. – P. 1359–1367.

157. Extensive antibody cross-reactivity among infectious gram-negative bacteria revealed by proteome microarray analysis / S. L. Keasey, K. E. Schmid, M. S. Lee [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2009. – Vol. 8, № 5. – P. 924–935.

158. Falahi, S. Host factors and vaccine efficacy: Implications for COVID-19 vaccines / S. Falahi, A. Kenarkoohi // *Journal of Medical Virology*. – 2022. – Vol. 94, № 4. – P. 1330–1335.

159. Fast and simple detection of *Yersinia pestis* applicable to field investigation of plague foci / S. Simon, C. Demeure, P. Lamourette [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, № 1. – e54947.

160. Fedson, D. S. Measuring protection: efficacy versus effectiveness / D. S. Fedson // *Developments in biological standardization*. – 1998. – Vol. 95. – P. 195–201.

161. Feodorova, V. A. Development, characterisation and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase / V. A. Feodorova, Z. L. Devdariani // *Journal of Medical Microbiology*. – 2000. – Vol. 49, № 3. – P. 261–269.

162. Feodorova, V. A. Immunogeneity and structural organisation of some pLCR-encoded proteins of *Yersinia pestis* / V. A. Feodorova, Z. L. Devdariani // *Journal of Medical Microbiology*. – 2001. – Vol. 50, № 1. – 13–22.

163. Feodorova, V. A. Plague vaccines / V. A. Feodorova, V. L. Motin // In: V. A. Feodorova, V. L. Motin (eds.) *Vaccines against bacterial biothreat pathogens*. – Kerala: Research Signpost, 2011. – P. 176–233.

164. Feodorova, V. A. Plague vaccines: current developments and future perspectives / V. A. Feodorova, V. L. Motin // *Emerging Microbes & Infections*. – 2012. – Vol. 1, № 11. – e36.

165. Feodorova, V. A. Prospects for new plague vaccines / V. A. Feodorova, M. J. Corbel // *Expert Review of Vaccines*. – 2009. – Vol. 8, № 12. – P. 1721–3178.

166. Feodorova, V. A. Russian vaccines against especially dangerous bacterial pathogens / V. A. Feodorova, L. V. Sayapina, M. J. Corbel, V. L. Motin // *Emerging Microbes & Infections*. – 2014. – Vol. 3, № 12. – e86.

167. Feodorova, V.A. Assessment of Live Plague Vaccine Candidates / V. A. Feodorova, L. V. Sayapina, V. L. Motin // *Methods in Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 1403. – P. 487–498.

168. Fetherston, J. D. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element / J. D. Fetherston, P. Schuetze, R. D. Perry // *Molecular Microbiology*. – 1992. – Vol. 6. – P. 2693–2704.

169. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar / B. Rasoamanana, F. Leroy, P. Boisier [et al.] // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 1997. – Vol. 4, № 5. – P. 587–591.

170. Flagellin adjuvanted F1/V subunit plague vaccine induces T cell and functional antibody responses with unique gene signatures / F. Hamzabegovic, J. B. Goll, W. F. Hooper [et al.] // *NPJ Vaccines*. – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 6.

171. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates / S. Mizel, A. Graff, N. Sriranganathan [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2009. – Vol. 16, № 1. – P. 21–28.

172. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge / G. P. Andrews, D. G. Heath, G. W. Jr. Anderson [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1996. – Vol. 64, № 6. – P. 2180–2187.



173. From protein microarrays to diagnostic antigen discovery: a study of the pathogen *Francisella tularensis* / S. Sundaresh, A. Randall, B. Unal [et al.] // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 23, № 13. – i508–18.

174. Gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide synthase 2, key elements of cellular immunity, perform critical protective functions during humoral defense against lethal pulmonary *Yersinia pestis* infection / M. A. Parent, L. B. Wilhelm, L. W. Kummer [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2006. – Vol. 74, № 6. – P. 3381–3386.

175. Ghosh, R. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots / R. Ghosh, J. E. Gilda, A. V. Gomes // *Expert Review of Proteomics*. – 2014. – Vol.11, №5. – P. 549–560.

176. Girard, G. Immunity in plague infection: results of 30 years of work with the *Pasteurella pestis* EV strain (Girard and Robic) / G. Girard // *Biologie medicale (Paris)*. – 1963. – Vol. 52. – P. 631–631.

177. Goldblatt, D. Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease / D. Goldblatt, G. Alter, S. Crotty, S.A. Plotkin // *Immunological Reviews*. – 2022. – Vol. 310, № 1. – P. 6–26.

178. Guideline on clinical evaluation of vaccines. – URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-vaccines-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-vaccines-revision-1_en.pdf)

179. Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations. WHO Technical Report Series 1004, Annex 9, 2017. – URL: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/prequal/vaccines/who-trs-1004-web-annex-9.pdf?sfvrsn=9c8f4704\\_2&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/prequal/vaccines/who-trs-1004-web-annex-9.pdf?sfvrsn=9c8f4704_2&download=true)

180. Hallett, A. F. Pathogenicity and immunogenic efficacy of a live attenuated plaque vaccine in vervet monkeys / A. F. Hallett, M. Isaacson, K. F. Meyer // *Infection and Immunity*. – 1973. – Vol. 8. – P. 876–881.

181. Hartley, L. The efficacy, safety, and immunogenicity of plague vaccines: A systematic literature review / L. Hartley, S. Harold, E. Hawe // *Current Research in Immunology*. – 2023. – Vol. 4. – P. 100072.

182. Hereditary hemochromatosis restores the virulence of plague vaccine strains / L. E. Quenee, T. M. Hermanas, N. Ciletti [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 206, № 7. – P. 1050–1058.

183. High-throughput identification of new protective antigens from a *Yersinia pestis* live vaccine by enzyme-linked immunospot assay / B. Li, L. Zhou, J. Guo [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2009. – Vol. 77, № 10. – P. 4356–4361.

184. Hill, J. Synergistic protection of mice against plague with monoclonal antibodies specific for the F1 and V antigens of *Yersinia pestis* / J. Hill, C. Copse, S. Leary [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2003. – Vol. 71, № 4. – P. 2234–2238.

185. Host Iron Nutritional Immunity Induced by a Live *Yersinia pestis* Vaccine Strain Is Associated with Immediate Protection against Plague / A. Zauberman, Y. Vagima, A. Tidhar [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 277.

186. Host transcriptomic responses to pneumonic plague reveal that *Yersinia pestis* inhibits both the initial adaptive and innate immune responses in mice / H. Yang, T. Wang, G. Tian [et al.] // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2017. – Vol. 307, № 1. – P. 64–74.

187. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens/ E. D. Williamson, H. C. Flick-Smith, C. Lebutt [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 6. – P. 3598–3608.

188. Human response to live plague vaccine EV, Almaty region, Kazakhstan, 2014-2015 / Z. Sagiyeu, A. Berdibekov, T. Bolger [et al.] // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14, № 6. – e0218366.

189. Humoral and cellular immune correlates of protection against bubonic plague by a live *Yersinia pseudotuberculosis* vaccine / C. E. Demeure, A. Derbise, C. Guillas [et al.] // *Vaccine*. – 2019. – Vol. 37, № 1. – P. 123–129.

190. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients / B. Li, C. Du, L. Zhou [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2012. – Vol. 19, № 2. – P. 228–234.

191. Hurtrel, B. Delayed-type hypersensitivity and acquired resistance to plague in mice immunized with killed *Yersinia pestis* and immunoregulators / B. Hurtrel, J. M. Alonso, P. H. Lagrange, M. Hurtrel // *Immunology*. – 1981. – Vol. 44, № 2. – P. 297–304.
192. Identification and characterization of a neutralizing monoclonal antibody that provides complete protection against *Yersinia pestis* / W. Liu, J. Ren, J. Zhang [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 5. – e0177012.
193. Immune Response to *Yersinia* Outer Proteins and Other *Yersinia pestis* Antigens after Experimental Plague Infection in Mice / G. E. Benner, G. P. Andrews, W. R. Byrne [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1999. – Vol. 67, № 4. – P. 1922–1928.
194. Immune responses to plague infection in wild *Rattus rattus*, in Madagascar: a role in foci persistence? / V. Andrianaivoarimanana, S. Telfer, M. Rajerison [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 6. – e38630.
195. Immunization with recombinant V10 protects cynomolgus macaques from lethal pneumonic plague / C. A. Cornelius, L. E. Quenee, K. A. Overheim [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2008. – Vol. 76, № 12. – P. 5588–5597.
196. Immunogenicity and protective immunity against bubonic plague and pneumonic plague by immunization of mice with the recombinant V10 antigen, a variant of LcrV / K. L. DeBord, D. M. Anderson, M. M. Marketon [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2006. – Vol. 74, № 8. – P. 4910–4914.
197. Immunogenicity and safety of subunit plague vaccine: A randomized phase 2a clinical trial / K. Chu, J. Hu, F. Meng [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2016. – Vol. 12, № 9. – P. 2334–2340.
198. Immunogenicity of the rF1+rV vaccine for plague with identification of potential immune correlates / E. D. Williamson, H. C. Flick-Smith, E. Waters [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. – 2007. – Vol. 42, № 1. – P. 11–21.
199. Innate and secondary humoral responses are improved by increasing the time between MVA vaccine immunizations / J. L. Palgen, N. Tchitchek, A. Rodriguez-Pozo [et al.] // *NPJ Vaccines*. – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 24.

200. Jawetz, E. Studies on plague immunity in experimental animals. II. Some factors of the immunity mechanism in bubonic plague / E. Jawetz, K. F. Meyer // *The Journal of Immunology*. – 1944. – Vol. 49. – P. 15–30.

201. Jawetz, E. The Behaviour of Virulent and Avirulent *P. pestis* in Normal and Immune Experimental Animals / E. Jawetz, K. F. Meyer // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1944. – Vol. 74, № 1. – P. 1–13.

202. Jefferson, T. Vaccines for preventing plague / T. Jefferson, V. Demicheli, M. Pratt // *The Cochrane database of systematic reviews*. – 2000; 1998 (2). – CD000976.

203. Kerschen, E. J. The plague virulence protein YopM targets the innate immune response by causing a global depletion of NK cells / E. J. Kerschen, D. A. Cohen, A. M. Kaplan, S. C. Straley // *Infection and Immunity*. – 2004. – Vol. 72, № 8. – P. 4589–4602.

204. Khan, A. A. Identifying B and T cell epitopes and studying humoral, mucosal and cellular immune responses of peptides derived from V antigen of *Yersinia pestis* / A. A. Khan, J. P. Babu, G. Gupta, D. N. Rao // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, № 3. – P. 316–332.

205. Kinetics of memory B cell and plasma cell responses in the mice immunized with plague vaccines / X. Zhang, Q. Wang, Y. Bi [et al.] // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2014. – Vol. 79, № 3. – P. 157–162.

206. Kukkonen, M. The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis* / M. Kukkonen, T. K. Korhonen // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2004. – Vol. 294, № 1. – P. 7–14.

207. Kurien, B. T., Scofield, R. H. Current Trends in Validating Antibody Specificities for ELISpot by Western Blotting / B. T. Kurien, R. H. Scofield // *Methods in Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 2768. P. 15–27.

208. Lack of O-antigen is essential for plasminogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica* / M. Kukkonen, M. Suomalainen, P. Kyllönen [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2004. – Vol. 51. – P. 215–225.

209. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
210. Lanzavecchia, A. Understanding the generation and function of memory T cell subsets / A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Current Opinion in Immunology*. – 2005. – Vol. 17. – P. 326–332.
211. Large scale immune profiling of infected humans and goats reveals differential recognition of *Brucella melitensis* antigens / L. Liang, D. Leng, C. Burk [et al.] // *PLOS Neglected Tropical Diseases*. – 2010. – Vol. 4, № 5. – e673.
212. Lathem, W. W. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague / W. W. Lathem, P. A. Price, V. L. Miller, W. E. Goldman // *Science*. – 2007. – Vol. 315, № 5811. – P. 509–513.
213. Lck dephosphorylation at Tyr-394 and inhibition of T cell antigen receptor signaling by *Yersinia* phosphatase YopH / A. Alonso, N. Bottini, S. Bruckner [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 6. – P. 4922–4928.
214. LcrV plague vaccine with altered immunomodulatory properties / K. A. Overheim, R. W. Depaolo, K. L. Debord [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 8. – P. 5152–5159.
215. Li, B. Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system / B. Li, R. Yang // *Infection and Immunity*. – 2008. – Vol. 76, № 5. – P. 1804–1811.
216. Lin, J. S. IL-17 contributes to cell-mediated defense against pulmonary *Yersinia pestis* infection / J. S. Lin, L. W. Kummer, F. M. Szaba, S. T. Smiley // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186, № 3. – P. 1675–1684.
217. Live, attenuated *Yersinia pestis* Vaccine: Virulent in Nonhuman Primates, Harmless to Guinea Pigs / K. F. Meyer, G. Smith, L. Foster [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1974. – Vol. 129, № 1. – P. S85–S120.
218. Long-lasting T cell responses to biological warfare vaccines in human vaccines / J. S. Allen, A. Skowera, G. J. Rubin [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 43, № 1. – P. 1–7.

219. Long-term observation of subunit vaccine F1-rV270 against *Yersinia pestis* in mice / Z. Wang, L. Zhou, Z. Qi [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2010. – Vol. 17, № 1. – P. 199–201.

220. Lung Resident Memory T Cells Activated by Oral Vaccination Afford Comprehensive Protection against Pneumonic *Yersinia pestis* Infection / A. K. Singh, S. Majumder, X. Wang [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2023, Feb 1. – Vol. 210, № 3. – P. 259–270.

221. Mahesh, S. Molecular detection of *Yersinia pestis* isolates of Indian origin by using Pla specific monoclonal antibodies / S. Mahesh, J. Shukla, U. Tuteja, H. V. Batra // *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 28, № 2. – P. 131–144.

222. Mallory, M. L. Vaccination-induced herd immunity: Successes and challenges / M. L. Mallory, L. C. Lindesmith, R. S. Baric // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2018. – Vol. 142, № 1 Vol. P. 64–66.

223. Mandrekar, J. N. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment / J. N. Mandrekar // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2010. – Vol. 5, № 9. – P. 1315–1316.

224. Marshall, Jr. J. D. Plague Immunization. III. Serologic Response to Multiple Inoculations of Vaccine / Jr. J. D. Marshall, D. C. Cavanaugh, P. J. Bartelloni, K. F. Meyer // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1974. – Vol. 129, № 1. – P. S26–S29.

225. Masopust, D. Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology / D. Masopust, C. P. Sivula, S. C. Jameson // *The Journal of Immunology*. – 2017. – Vol. 199, № 2. – P. 383–388.

226. Matson, J. S. Immunization of mice with YscF provides protection from *Yersinia pestis* infections / J. S. Matson, K. A. Durick, D. S. Bradley, M. L. Nilles // *BMC Microbiology*. – 2005. – Vol. 5. – P.38.

227. Mazza, G. Immune response to plasmid- and chromosome-encoded *Yersinia* antigens / G. Mazza, A. E. Karu, D. T. Kingsbury // *Infection and Immunity*. – 1985. – Vol. 48, № 3. – P. 676–685.

228. Mestas, J. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology / J. Mestas, C. C. W. Hughes // *The Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172. – P. 2731–
229. Meyer, K. F. Effectiveness of live or killed plague vaccines in man / K. F. Meyer // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1970. – Vol. 42, № 5. – P. 653–66.
230. Meyer, K. F. Measurement of protective serum antibodies in human volunteers inoculated with plague prophylactics. Stanford Med / K. F. Meyer, L. E. Foster // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1948. – Vol. 6. – P. 75–79.
231. Meyer, K. F. Plague immunization. I. Past and present trends / K. F. Meyer, D. C. Cavanaugh, P. J. Bartelloni, J. D. Jr. Marshall // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1974. – Vol. 129. – Suppl. S13–S18.
232. Meyer, K. F. Plague immunization. VI. Vaccination with the fraction I antigen of *Yersinia pestis* / K. F. Meyer, J. A. Hightower, F. R. McCrumb // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1974. – Vol. 129. – Suppl. S41–45.
233. Meyer, K. F. Recent studies on the immunity response to administration of different plague vaccines / K. F. Meyer // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1953. – Vol. 9, № 5. – P. 619–636.
234. Michel, P. The plague: disease and vaccine? / P. Michel, B. Rasoamanana, N. Rasolofonirina, J. Roux // *Dakar Medical*. – 1992. – Vol. 37, № 2. – P. 183–189.
235. Miller, S. I. LPS, TLR4 and infectious disease diversity / S. I. Miller, R. K. Ernst, M. W. Bader // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – Vol. 3, № 1. – P. 36–46.
236. Modeling the Impact of Vaccination for the Immunization Agenda 2030: Deaths Averted Due to Vaccination Against 14 Pathogens in 194 Countries from 2021–2030 / A. Carter, W. Msemburi, S. Y. Sim [et al.] // *Vaccine*. – 2023. – S0264-410X(23)00854-X.
237. Motin, V. L. Passive immunity to yersiniae mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide / V. L. Motin, R. Nakajima, G. B. Smirnov, R. R. Brubaker // *Infection and Immunity*. – 1994. – Vol. 62, № 10. – P. 4192–4201.

238. Motin, V. L. V antigen-polyhistidine fusion peptide: binding to LcrH and active immunity against plague / V. M. Motin, Y. A. Nedialkov, R. R. Brubaker // *Infection and Immunity*. – 1996. – Vol. 64. – P. 4313–4318.

239. Mukaka, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research / M. M. Mukaka // *Malawi Medical Journal*. – 2012. – Vol. 24, № 3. – P. 69–71

240. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid / M. Galimand, A. Guiyoule, G. Gerbaud [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 1997. – Vol. 337. – P. 677–680.

241. Multiple antigen peptide containing B and T cell epitopes of F1 antigen of *Yersinia pestis* showed enhanced Th1 immune response in murine model / R. Ali, R. A. Naqvi, S. Kumar [et al.] // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 77, № 5. – P. 361–371.

242. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk / T. J. Welch, W. F. Fricke, P. F. McDermott [et al.] // *PLoS One*. – 2007. – Vol. 2. – P. 1–6.

243. Multiple diagnostic techniques identify previously vaccinated individuals with protective immunity against monkeypox / E. Hammarlund, M. W. Lewis, S. V. Carter [et al.] // *Nature Medicine*. – 2005. – Vol. 11, № 9. – P. 1005–1011.

244. Nakajima, R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha / R. Nakajima, R. R. Brubaker // *Infection and Immunity*. – 1993. – Vol. 61, № 1. – P. 23–31.

245. Nakajima, R. Suppression of cytokines in mice by protein A-V antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization / R. Nakajima, V. L. Motin, R. R. Brubaker // *Infection and Immunity*. – 1995. – Vol. 63, № 8. – P. 3021–3029.

246. Natesan, M. Protein microarrays and biomarkers of infectious disease / M. Natesan, R. G. Ulrich // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2010. – Vol. 11, № 12. – P. 5165–5183.

247. Nayak, S. Mantoux test and its interpretation. / S. Nayak, B. J. Acharjya // *Indian Dermatology Online Journal*. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 2–6.



248. Nemeth, J. Effect of *Yersinia pestis* YopM on experimental plague / J. Nemeth, S. C. Straley // *Infection and Immunity*. – 1997. – Vol. 65, № 3. – P. 924–930.
249. Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon / S. S. Cunha, L. C. Rodrigues, V. Pedrosa [et al.] // *Leprosy Review*. – 2004. – Vol. 75, № 4. – P. 357–366.
250. Nikiforov, V. V. Plague: Clinics, Diagnosis and Treatment / V. V. Nikiforov, H. Gao, L. Zhou, A. Anisimov // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2016. – Vol. 918. – P. 293–312.
251. Oldstone, M. B. Molecular mimicry and immune-mediated diseases / M. B. Oldstone // *The FASEB Journal*. – 1998. – Vol. 12, № 13. – P. 1255–65.
252. One year immunogenicity and safety of subunit plague vaccine in Chinese healthy adults: an extended open-label study / J. Hu, L. Jiao, Y. Hu [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2018. – Vol. 14, № 11. – P. 2701–2705.
253. Passive immunity to infection with *Yersinia* spp. mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen / A. Roggenkamp, A. M. Geiger, L. Leitritz [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1997. – Vol. 65. – P. 446–451.
254. Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils / R. A. Lukaszewski, D. J. Kenny, R. Taylor [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 11. – P. 7142–7150.
255. Pathology of experimental pneumonic plague produced by fraction 1-positive and fraction 1-negative *Yersinia pestis* in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) / K. J. Davis, D. L. Fritz, M. L. Pitt [et al.] // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 1996. – Vol. 120 № 2. – P. 156–163.
256. Performance assessment of a new indirect rapid diagnostic test for plague detection in humans and other mammalian hosts / M. F. Bezerra, W. J. T. Dos Santos, I. V. Rocha [et al.] // *Acta Trop*. – 2022. – Vol. 231. – P. 106427.
257. Perry, R. D. The role of transition metal transporters for iron, zinc, manganese, and copper in the pathogenesis of *Yersinia pestis* / R. D. Perry, A. G. Bobrov, J. D. Fetherston // *Metallomics*. – 2015. – Vol. 7, № 6. – P. 965–978.

258. Perry, R. D. *Yersinia pestis*-etiologic agent of plague / R. D. Perry, J. D. Fetherston // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1997. – Vol. 10, № 1. – P. 35–66.

259. Persson, C. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions / C. Persson, N. Carballeira, H. Wolf-Watz, M. Fallman // *The EMBO Journal*. – 1997. – Vol. 16. – P. 2307–2318.

260. Phenotypical characterization of Mongolian *Yersinia pestis* strains / D. Kiefer, G. Dalantai, T. Damdindorj [et al.] // *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. – 2012. – Vol. 12. – P. 183–188.

261. Philipovskiy, A. V. Vaccination with live *Yersinia pestis* primes CD4 and CD8 T cells that synergistically protect against lethal pulmonary *Y. pestis* infection / A. V. Philipovskiy, S. T. Smiley // *Infection and Immunity*. – 2007. – Vol. 75. – P. 878–885.

262. Pitt, M. L. Non-human primates as a model for pneumonic plague; *Animals Models and Correlates of Protection for Plague Vaccines Workshop*; Gaithersburg, MD, USA. 13-14 October 2004.

263. Plague as a biological weapon: medical and public health management / T. V. Inglesby, D. T. Dennis, D. A. Henderson [et al.] // *The Journal of the American Medical Association*. – 2000. – Vol. 283. – P. 2281–2290.

264. Plague bacteria target immune cells during infection / M. M. Marketon, R. W. DePaolo, K. L. DeBord [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 309, № 5741. – P. 1739–1741.

265. Plague immunization. II. Relation of adverse clinical reactions to multiple immunizations with killed vaccine / J. D. Jr. Marshall, P. J. Bartelloni, D. C. Cavanaugh [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1974. – Vol. 129. – Suppl. S19–25.

266. Plague immunization. IV. Clinical reactions and serologic response to inoculations of Haffkine and freeze-dried plague vaccine / K. F. Meyer, G. Smith, L. E. Foster [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1974. – Vol. 129. – Suppl. S30–36.

267. Plague immunization. V. Indirect evidence for the efficacy of plague vaccine / D. C. Cavanaugh, B. L. Elisberg, C. H. Llewellyn [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1974. – Vol. 129. – Suppl: S37–40.

268. Plague in Guinea pigs and its prevention by subunit vaccines / L. E. Quenee, N. Ciletti, B. Berube [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2011. – Vol. 178, № 4. – P. 1689–1700.
269. Plague reservoir species throughout the world / A. Mahmoudi, B. Kryštufek, A. Sludsky [et al.] // *Integrative Zoology*. – 2021. – Vol. 16, № 6. – P. 820–833.
270. Plague Vaccine // *MMWR*. – 1982. – Vol. 31, № 22. – P.301–304. – URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00041848.htm>
271. Plano, G. V. The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses / G. V. Plano, K. Schesser // *Immunologic research*. – 2013. – Vol. 57, № 1–3. – P. 237–245.
272. Plant-derived recombinant F1, V, and F1-V fusion antigens of *Yersinia pestis* activate human cells of the innate and adaptive immune system / G. Del Prete, L. Santi, V. Andrianaivoarimanana [et al.] // *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. – 2009. – Vol. 22, № 1. – P. 133–143.
273. Plotkin, S. A. Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination / S. A. Plotkin, P. B. Gilbert // *Clinical Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 54, № 11. – P. 1615–1617.
274. Plotkin, S. A. Recent updates on correlates of vaccine-induced protection / S. A. Plotkin // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 13. – P. 1081107.
275. Plotkin, S. A. Updates on immunologic correlates of vaccine-induced protection / S. A. Plotkin // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38, № 9. – P. 2250–2257.
276. Plotkin, S. A. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity / S. A. Plotkin // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 47, № 3. – P. 401–409.
277. Pneumonic plague outbreak, Northern Madagascar, 2011 / V. Richard, J. M. Riehm, P. Herindrainy [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 21, № 1. – P. 8–15.
278. Pneumonic plague pathogenesis and immunity in brown Norway rats / D. M. Anderson, N. A. Ciletti, H. Lee-Lewis [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2009. – Vol. 174, № 3. – P. 910–921.

279. Politzer, R. Plague / R. Politzer // World Health Organization Monograph Series № 22. – 1954. – 689 p.

280. Pollard, A. J. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments / A. J. Pollard, E. M. Bijker // Nature Reviews Immunology. – 2021. – Vol. 21, № 2. – P. 83–100.

281. Polymorphism in the Yersinia LcrV antigen enables immune escape from the protection conferred by an LcrV-secreting Lactococcus lactis in a pseudotuberculosis mouse model / C. Daniel, A. Dewitte, S. Poiret [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1830.

282. Predictive Markers of Immunogenicity and Efficacy for Human Vaccines / M. Van Tilbeurgh, K. Lemdani, A. S. Beignon [et al.] // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol. 9, № 6. – P. 579.

283. Prevention of pneumonic plague in mice, rats, guinea pigs and non-human primates with clinical grade rV10, rV10-2 or F1-V vaccines / L. E. Quenee, N. A. Ciletti, D. Elli [et al.] // Vaccine. – 2011. – Vol. 29, № 38. – P. 6572–6583.

284. Product Development under the Animal Rule : Guidance for Industry // U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), 2015. – URL: <https://www.fda.gov/media/88625/download>.

285. Progress on the research and development of plague vaccines with a call to action / E.D. Williamson, P.B. Kilgore, E.K. Hendrix [et al.] // NPJ Vaccines. – 2024. – Vol. 9, №1. – P. 162.

286. Protection against experimental bubonic and pneumonic plague by a recombinant capsular F1-V antigen fusion protein vaccine / Heath DG, Anderson GW Jr, Mauro JM [et al.] // Vaccine. – 1998. – Vol. 16, № 11–12. – P. 1131–1137.

287. Protection in mice passively immunized with serum from cynomolgus macaques and humans vaccinated with recombinant plague vaccine (rF1V) / P. Fellows, J. Adamovicz, J. Hartings [et al.] // Vaccine. – 2010. – Vol. 28, № 49. – P. 7748–7756.

288. Protection of mice from fatal bubonic and pneumonic plague by passive immunization with monoclonal antibodies against the F1 protein of Yersinia pestis / G.

W. Jr. Anderson, P. L. Worsham, C. R. Bolt [et al.] // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1997. – Vol. 56, № 4. – P. 471–473.

289. Protective efficacy of a fully recombinant plague vaccine in the guinea pig / S. M. Jones, K. F. Griffin, I. Hodgson [et al.] // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – P. 3912–3918.

290. Protective efficacy of recombinant *Yersinia* outer proteins against bubonic plague caused by encapsulated and nonencapsulated *Yersinia pestis* / G. P. Andrews, S. T. Strachan, G. E. Benner [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1999. – Vol. 67, № 3. – P. 1533–1537.

291. Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine / B. Li, L. Jiang, Q. Song [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 6. – P. 3734–3739.

292. Pujol, C. Replication of *Yersinia pestis* in interferon gamma-activated macrophages requires *ripA*, a gene encoded in the pigmentation locus / C. Pujol, J. P. Grabenstein, R. D. Perry, J. B. Bliska // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102, № 36. – P. 12909–12914.

293. Pujol, C. The ability to replicate in macrophages is conserved between *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* / C. Pujol, J. B. Bliska // *Infection and Immunity*. – 2003. – Vol. 71, № 10. – P. 5892–5899.

294. Pulendran, B. Immunological mechanisms of vaccination / B. Pulendran, R. Ahmed // *Nature Immunology*. – 2011. – Vol. 12, № 6. – P. 509–517.

295. Pulendran, B. Systems vaccinology: probing humanity's diverse immune systems with vaccines / B. Pulendran // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111, № 34. – P. 12300–12306.

296. Quenee, L. E. Plague vaccines and the molecular basis of immunity against *Yersinia pestis* / L. E. Quenee, O. Schneewind // *Human vaccines*. – 2009. – Vol. 5, № 12. – P. 817–823.

297. Rapid Induction of Protective Immunity against Pneumonic Plague by *Yersinia pestis* Polymeric F1 and LcrV Antigens / M. Aftalion, A. Tidhar, Y. Vagima [et al.] // *Vaccines (Basel)*. – 2023. – Vol. 11, №3. – P. 58117.

298. Recombinant (F1+V) vaccine protects cynomolgus macaques against pneumonic plague / E. Williamson, P. Packer, E. Waters [et al.] // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29, № 29–30. – P. 4771–4777.

299. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis* / G. W. Jr. Anderson, S. E. Leary, E. D. Williamson [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1996. – Vol. 64, № 11. – P. 4580–4585.

300. Recombinant YopE and LcrV vaccine candidates protect mice against plague and yersiniosis / A. Gupta, P. Mahajan, S.S. Bhagyawant [et al.] // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10, №10. – P. e31446.

301. Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization / J. Hill, S. E. Leary, K. F. Griffin [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1997. – Vol. 65, № 11. – P. 4476–4482.

302. Relationship between virulence and immunity as revealed in recent studies of the F1 capsule of *Yersinia pestis* / A. M. Friedlander, S. L. Welkos, P. L. Worsham [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 1995. – Vol. 21. – Suppl 2. – S178–181.

303. Relative immunogenicity and protection potential of candidate *Yersinia Pestis* antigens against lethal mucosal plague challenge in Balb/C mice / S. Wang, S. Joshi, I. Mboudjeka [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, № 13. – P. 1664–1674.

304. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague / F. Sebbane, C. O. Jarrett, D. Gardner [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, № 14. – P. 5526–5530.

305. Rosario-Acevedo, R. Plague Prevention and Therapy: Perspectives on Current and Future Strategies / R. Rosario-Acevedo, S. S. Biryukov, J. A. Bozue, C. K. Cote // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9, № 10. – P. 1421.

306. Rosenzweig, J. A. Plague vaccines: new developments in an ongoing search / J. A. Rosenzweig, E. K. Hendrix, A. K. Chopra // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2021, Jun. – Vol. 105, № 12. – P. 4931–4941.

307. Schenkel, J. M. Tissue-resident memory T cells / J. M. Schenkel, D. Masopust // *Immunity*. – 2014. – Vol. 41, № 6. – P. 886–897.
308. Seabaugh, J.A. Pathogenicity and virulence of *Yersinia* / J.A. Seabaugh, D.M. Anderson // *Virulence*. – 2024. – Vol.15, №1. – P. 2316439.
309. Sebbane, F. Antibiotic Therapy of Plague: A Review / F. Sebbane, N. Lemaître // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11, № 5. – P. 724.
310. Sebbane, F. *Yersinia pestis* Plasminogen Activator / F. Sebbane, V. N. Uversky, A. P. Anisimov // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 11. – P. 1554.
311. Seder, R. A. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design / R. A. Seder, P. A. Darrah, M. Roederer // *Nature Reviews Immunology*. – 2008. – Vol. 8, № 4. – P. 247–258.
312. Serodiagnosis of human plague by an anti-F1 capsular antigen specific IgG/IgM ELISA and immunoblot / H. Neubauer, L. Rahalison, T. J. Brooks [et al.] // *Epidemiology and Infection*. – 2000. – Vol. 125, № 3. – P. 593–597.
313. Serologic survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) from two ecologically distinct areas of Utah / W. M. Arjo, E. M. Gese, C. Bromley [et al.] // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2003. – Vol. 39, № 2. – P. 449–455.
314. Serologic survey for viral and bacterial infections in western populations of Canada lynx (*Lynx canadensis*) / R. Biek, R. L. Zarnke, C. Gillin [et al.] // *Journal of Wildlife Diseases*. – 2002. – Vol. 38, № 4. – P. 840–845.
315. Serological assays for differentiating natural COVID-19 infection from vaccine induced immunity / S.M.S. Cheng, J.J. Lau, L.C.H. Tsang [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2024. – Vol. 170. – P. 105621.
316. Serology as a Tool to Assess Infectious Disease Landscapes and Guide Public Health Policy / A. H. Haselbeck, J. Im, K. Prifti [et al.] // *Pathogens*. – 2022. – Vol. 11, № 7. – P. 732.
317. Sheerin, D. Issues in vaccinology: Present challenges and future directions / D. Sheerin, P. J. Openshaw, A. J. Pollard // *European Journal of Immunology*. – 2017. – Vol. 47, № 12. – P. 2017–2025.

318. Shepherd, A. J. A comparison of serological techniques for plague surveillance / A. J. Shepherd, P. A. Leman, D. E. Hummitzsch, R. Swanepoel // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1984. – Vol. 78, № 6. – P. 771–773.

319. Shim, E. Distinguishing vaccine efficacy and effectiveness / E. Shim, A. P. Galvani // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30, № 47. – P. 6700–6705.

320. Short- and long-term efficacy of single-dose subunit vaccines against *Yersinia pestis* in mice / G. W. Jr. Anderson, D. G. Heath, C. R. Bolt [et al.] // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1998. – Vol. 58, № 6. – P. 793–799.

321. Short- and long-term humoral immune response against *Yersinia pestis* in plague patients, Madagascar / V. Andrianaivoarimanana, A. L. Iharisoa, L. Rahalison [et al.] // *BMC Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 822.

322. Siegrist, C-A. Vaccine Immunology. In Plotkin's Vaccines (Seventh Edition) / Editor(s): Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein, Paul A. Offit, Kathryn M. Edwards. – Elsevier, 2018. – Pages 16–34.e7.

323. Simpson, W. J. Recombinant Capsular Antigen (Fraction 1) from *Yersinia Pestis* Induces a Protective Antibody Response in BALB/c Mice / W. J. Simpson, R. E. Thomas, T. G. Schwan // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 1990. – Vol. 43, № 4. – P. 389–396.

324. Single-cell transcriptomics of immune cells in lymph nodes reveals their composition and alterations in functional dynamics during the early stages of bubonic plague / Y. Zhao, T. Wang, Z. Liu [et al.] // *Science China Life Sciences*. – 2023. – Vol. 66, № 1. – P. 110–126.

325. Slifka, M. K. How advances in immunology provide insight into improving vaccine efficacy / M. K. Slifka, I. Amanna // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32, № 25. – P. 2948–2957.

326. Slogotskaya, L. Comparative sensitivity of the test with tuberculosis recombinant allergen, containing ESAT6-CFP10 protein, and Mantoux test with 2 TU PPD-L in newly diagnosed tuberculosis children and adolescents in Moscow / L.



Slogotskaya, E. Bogorodskaya, D. Ivanova, T. Sevostyanova // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, № 12. – e0208705.

327. Smiley, S. T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague / S. T. Smiley // Expert Review of Vaccines. – 2008. – Vol. 7, № 2. – P. 209–221.

328. Smiley, S. T. Immune defense against pneumonic plague / S. T. Smiley // Immunological Reviews. – 2008. – Vol. 225. – P. 256–271.

329. Sodeinde, O. A. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins / O. A. Sodeinde, A. K. Sample, R. R. Brubaker, J. D. Goguen // Infection and Immunity. – 1988. – Vol. 56. – P. 2749–2752.

330. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis* / E. E. Baker, H. Sommer, L. E. Foster [et al.] // The Journal of Immunology. – 1952. – Vol. 68, № 2. – P. 131–145.

331. Studies on the Antibody Patterns in Pneumonic Plague Patients / Jr. F. R. McCrumb, S. Mercier, T. H. Chen [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 1955. – Vol. 96, № 1. – P. 88–94.

332. Sun, W. Plague vaccine: recent progress and prospects / W. Sun, A. K. Singh // NPJ Vaccines. – 2019. – Vol. 4. – P. 11.

333. Swietnicki, W. *Yersinia pestis* Yop secretion protein F: purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague / W. Swietnicki, B. S. Powell, J. Goodin // Protein Expression and Purification. – 2005. – Vol. 42, № 1. – P. 166–172.

334. Systems Vaccinology Approach Reveals Temporal Transcriptomic Changes of Immune Responses to the Yellow Fever 17D Vaccine / J. Hou, S. Wang, M. Jia [et al.] // The Journal of Immunology. – 2017. – Vol. 199, № 4. – P. 1476–1489.

335. Systems Vaccinology Identifies an Early Innate Immune Signature as a Correlate of Antibody Responses to the Ebola Vaccine rVSV-ZEBOV / A. Rechtien, L. Richert, H. Lorenzo [et al.] // Cell Reports. – 2017. – Vol. 20, № 9. – P. 2251–2261.

336. T cells in health and disease / L. Sun, Y. Su, A. Jiao [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8, №1. – P. 235.
337. The efficacy and effectiveness of COVID-19 vaccines around the world: a mini-review and meta-analysis / M. Soheili, S. Khateri, F. Moradpour [et al.] // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2023. – Vol. 22, № 1. – P. 42.
338. The Immune Signatures data resource, a compendium of systems vaccinology datasets / J. Diray-Arce, H. E. R. Miller, E. Henrich [et al.] // *Scientific Data*. – 2022. – Vol. 9, № 1. – P. 635.
339. The *pla* gene, encoding plasminogen activator, is not specific to *Yersinia pestis* / S. Hänsch, E. Cilli, G. Catalano [et al.] // *BMC Research Notes*. – 2015. – Vol. 8, № 535. – P. 1–3.
340. The SCID/Beige mouse as a model to investigate protection against *Yersinia pestis* / M. Green, D. Rogers, P. Russell [et al.] // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 1999. – Vol. 23, № 2. – P. 107–113.
341. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles / C. A. Mueller, P. Broz, S. A. Müller [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 310, № 5748. – P. 674–676.
342. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome / G. R. Cornelis, A. Boland, A. P. Boyd [et al.] // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1998. – Vol. 62, № 4. – P. 1315–1352.
343. The *Yersinia* Type III secretion effector YopM Is an E3 ubiquitin ligase that induced necrotic cell death by targeting NLRP3 / C. Wei, Y. Wang, Z. Du [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2016. – Vol. 7, № 12. – e2519.
344. Thomson, J. J. Ail provides multiple mechanisms of serum resistance to *Yersinia pestis* / J. J. Thomson, S. C. Plecha, E. S. Krukoniš // *Molecular Microbiology*. – 2019. – Vol. 111, № 1. – P. 82–95.
345. Titball, R. W. Vaccination against bubonic and pneumonic plague / R. W. Titball, E. D. Williamson // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19, № 30. – P. 4175–4184.

346. Titball, R. W. *Yersinia pestis* (plague) vaccines / R. W. Titball, E. D. Williamson // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2004. – Vol. 4, № 6. – P. 965–973.
347. TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  contribute to F1/LcrV-targeted immune defense in mouse models of fully virulent pneumonic plague / J.S. Lin, S. Park, J.J. Adamovicz [et al.] // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 29, №2. – P. 357–362.
348. Torruellas, J. The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion / J. Torruellas, M. W. Jackson, J. W. Pennock, G. V. Plano // *Molecular Microbiology*. – 2005. – Vol. 57, № 6. – P. 1719–1733.
349. Tracking of Mammals and Their Fleas for Plague Surveillance in Madagascar, 2018–2019 / S. Rahelinirina, M. Harimalala, J. Rakotoniaina [et al.] // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2022. – Vol. 106, № 6. – P. 1601–1609.
350. Type III secretion needle proteins induce cell signaling and cytokine secretion via Toll-like receptors / D. L. Jessen, P. Osei-Owusu, M. Toosky [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2014. – Vol. 82, № 6. – P. 2300–2309.
351. Unraveling the molecular determinants of the anti-phagocytic protein cloak of plague bacteria / D. T. Peters, A. Reifs, A. Alonso-Caballero [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2022. – Vol. 18, № 3. – e1010447.
352. Vaccination of mice with a Yop translocon complex elicits antibodies that are protective against infection with F1- *Yersinia pestis* / M. I. Ivanov, B. L. Noel, R. Rampersaud [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2008. – Vol. 76, № 11. – P. 5181–5190.
353. Verma, S. K. *Escherichia coli* expressed flagellin C (FliC) of *Salmonella Typhi* improved the protective efficacy of YopE against plague infection / S. K. Verma, A. Gupta, L. Batra, U. Tuteja // *Vaccine*. – 2019. – Vol. 37, № 1. – P. 19–24.
354. Vieira, G. F. Immunodominant viral peptides as determinants of cross-reactivity in the immune system-Can we develop wide spectrum viral vaccines? / G. F. Vieira, J. A. Chies // *Medical Hypotheses*. – 2005. – Vol. 65, № 5. – P. 873–879.
355. Vorontsov, E. D. Association-dissociation processes and supermolecular organisation of the capsule antigen (protein F1) of *Yersinia pestis* / E. D. Vorontsov, A.

G. Dubichev, L. N. Serdobintsev, A. V. Naumov // *Journal of Biomedical Science*. – 1990. – Vol. 1, № 4. – P. 391–396.

356. Wagar, L. E. Advanced model systems and tools for basic and translational human immunology / L. E. Wagar, R. M. DiFazio, M. M. Davis // *Genome Medicine*. – 2018. – Vol. 10, № 1. – P. 73.

357. Wake, A. Double effects of an iron drug in induction of mouse plague caused by an attenuated strain / A. Wake, M. Yamamoto, H. Morita // *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. – 1974. – Vol. 27, № 4. – P. 229–239.

358. Wake, A. Mechanisms of protection against virulent *Yersinia pestis* infection without participation of humoral antibody: H-2 restriction in athymic mouse model / A. Wake, Y. Sutoh // *Current Microbiology*. – 1983. – Vol. 8. – P. 79–84.

359. Wake, A. Mechanisms of long and short term immunity to plague / A. Wake, H. Morita, M. Wake // *Immunology*. – 1978. – Vol. 34, № 6. – P. 1045–1052.

360. Wang, X. Live-attenuated *Yersinia pestis* vaccines / X. Wang, X. Zhang, D. Zhou, R. Yang // *Expert Review of Vaccines*. – 2013. – Vol. 12, № 6. – P. 677–86.

361. Weinberg, G. A. Vaccine epidemiology: efficacy, effectiveness, and the translational research roadmap / G. A. Weinberg, P. G. Szilagyi // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 201, № 11. – P. 1607–1610.

362. WHO guidelines for plague management: revised recommendations for the use of rapid diagnostic tests, fluoroquinolones for case management and personal protective equipment for prevention of post-mortem transmission // Geneva: World Health Organization, 2021. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015579>.

363. Williams, J. E. Measuring the efficacy of vaccination in affording protection against plague / J. E. Williams, D. C. Cavanaugh // *Bulletin of the World Health Organization*. – 1979. – Vol. 57, № 2. – P. 309–313.

364. Williamson, E. D. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine / E. D. Williamson, P. C. Oyston // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2013. – Vol. 172, № 1. – P. 1–8.

365. Williamson, E. D. The role of immune correlates and surrogate markers in the development of vaccines and immunotherapies for plague / E. D. Williamson // *Advances in Preventive Medicine*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 365–980.

366. Wong, J. F. Cellular immune response to *Yersinia pestis* modulated by product(s) from thymus-derived lymphocytes / J. F. Wong, S. S. Elberg // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1977. – Vol. 135, № 1. – P. 67–78.

367. *Yersinia* outer proteins (YOPS) E, K and N are antigenic but nonprotective compared to V antigen, in a murine model of bubonic plague / S. E. C. Leary, K. F. Griffin, E. E. Galyov [et al.] // *Microbial Pathogenesis*. – 1999. – Vol. 26. – P. 159–169.

368. *Yersinia pestis* and plague: an updated view on evolution, virulence determinants, immune subversion, vaccination, and diagnostics / C. E. Demeure, O. Dussurget, G. Mas Fiol [et al.] // *Genes and immunity*. – 2019. – Vol. 20, № 5. – P. 357–370.

369. *Yersinia pestis* and Plague: some knowns and unknowns / R. Yang, S. Atkinson, Z. Chen [et al.] // *Zoonoses (Burlingt)*. – 2023. – Vol. 3, № 1. – P. 5.

370. *Yersinia pestis* Caf1 protein: Effect of sequence polymorphism on intrinsic disorder propensity, serological cross-reactivity and cross-protectivity of isoforms / P. Kopylov, M. E. Platonov, V.G. Ablamunits [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Vol. 11. – P. e0162308:1–e0162308:16.

371. *Yersinia pestis* caf1 variants and the limits of plague vaccine protection / L. E. Quenee, C. A. Cornelius, N. A. Ciletti [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2008. – Vol. 76, № 5. – P. 2025–2036.

372. *Yersinia pestis* IS1541 transposition provides for escape from plague immunity / C. A. Cornelius, L. E. Quenee, D. Elli [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2009. – Vol. 77. – P. 1807–1816.

373. *Yersinia pestis* Pla Protein Thwarts T Cell Defense against Plague / S. T. Smiley, F. M. Szaba, L. W. Kummer [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2019. – Vol. 87, № 5. – P. e00126–19.

374. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague / J. G. Shannon, A. M. Hasenkrug, D. W. Dorward [et al.] // *mBio*. – 2013. – Vol. 4, № 5. – e00170–13.

375. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages / J. L. Spinner, S. Winfree, T. Starr [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2014. – Vol. 95. – P. 389–398.

376. *Yersinia pestis* V protein epitopes recognized by CD4 T cells / M. A. Parent, K. N. Berggren, I. K. Mullarky [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2005. – Vol. 73, № 4. – P. 2197–2204.

377. *Yersinia pestis* YopE contains a dominant CD8 T cell epitope that confers protection in a mouse model of pneumonic plague / J. S. Lin, F. M. Szaba, L. W. Kummer [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 187, № 2. – P. 897–904.

378. *Yersinia pestis*: the Natural History of Plague / R. Barbieri, M. Signoli, D. Chev  [et al.] // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2020. – Vol. 34, № 1. – e00044–19.

379. Zimmermann, P. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination / P. Zimmermann, N. Curtis // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2019, Mar 13. – Vol. 32, № 2. – e00084–18.

380. Zschaler, J. Differences in innate immune response between man and mouse / J. Zschaler, D. Schlorke, J. Arnhold // *Critical Reviews in Immunology*. – 2014. – Vol. 34, № 5. – P. 433–454.