

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151

УДК 616.98:579.842.23

С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Е.Л. Ракитина, Д.Г. Пономаренко, М.В. Костюченко,
Л.С. Катунина, О.В. Логвиненко, Г.Ф. Иванова, А.А. Курилова

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ЧУМНОЙ ВАКЦИНЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРЕДЫ ВЫРАЩИВАНИЯ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Цель исследования – сравнительный анализ иммуногенной активности вакцины чумной живой, полученной на различных питательных средах. **Материалы и методы.** Объект исследования – кровь аутбредных белых мышей, иммунизированных сериями вакцины чумной живой на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, изготовленной с использованием экспериментальной и регламентированной питательных сред. Исследована иммуногенная активность вакцин методом проточной цитометрии. Интенсивность антигенреактивности лимфоцитов определяли в клеточных тестах *in vitro*, анализируя маркер ранней активации CD25⁺. Для специфической активации лимфоцитов использовался комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба. Для выявления связи наличия протективного противочумного иммунитета с уровнем интенсивности экспрессии маркера ED₅₀ исследуемых серий определяли традиционным методом. **Результаты и обсуждение.** Проведен сравнительный анализ иммуногенной активности вакцины чумной живой, полученной на экспериментальной питательной среде с вакциной, выращенной на агаре Хоттингера. При иммунизации животных дозами 4·10³, 2·10⁴ и 1·10⁵ живых микробных клеток (регламентированные дозы) наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера CD25 достигал максимальной отметки на 14-е сутки с последующим снижением на 21-е сутки после вакцинации. При определении иммуногенности традиционным методом установлена высокая степень прямой связи количества выживших животных с увеличением уровня лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации. При сравнении выявлены общие закономерности: при введении наименьшей иммунизирующей дозы (8·10²) не наблюдалась активация маркеров раннего иммунитета. При иммунизации большими дозами на 7, 14 и 21-е сутки в крови у биомоделей отмечалось пропорциональное повышение количества CD25-позитивных лимфоцитов после стимуляции специфическим антигеном в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: иммуногенность, вакцина чумная живая, противочумный иммунитет, проточная цитофлуориметрия, маркер активации лимфоцитов, гидролизат кукурузного экстракта сгущенного.

Корреспондирующий автор: Гостищева Светлана Евгеньевна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В., Катунина Л.С., Логвиненко О.В., Иванова Г.Ф., Курилова А.А. Сравнительный анализ иммуногенной активности чумной вакцины в зависимости от среды выращивания. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:148–151. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151

Поступила 12.02.2020. Отправлена на доработку 12.03.2020. Принята к публ. 25.06.2020.

S.E. Gostishcheva, N.V. Abzaeva, E.L. Rakitina, D.G. Ponomarenko, M.V. Kostyuchenko,
L.S. Katunina, O.V. Logvinenko, G.F. Ivanova, A.A. Kurilova

Comparative Analysis of the Immunogenic Activity of the Plague Vaccine Depending on the Growing Medium

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The aim was to carry out a comparative analysis of the immunogenic activity of the live plague vaccine obtained on various nutrient media. **Materials and methods.** The subject of the study was the blood of outbred white mice immunized with a series of live plague vaccine based on *Yersinia pestis* EV NIEG strain, produced using experimental and regulated nutrient media. The immunogenic activity of vaccines was studied through flow cytometry. The intensity of antigen-reactivity of lymphocytes was determined in cell tests *in vitro*, analyzing the early activation marker CD25⁺. For the specific activation of lymphocytes, a complex of water-soluble antigens of the plague microbe was used. To identify the interdependence between the presence of protective anti-plague immunity and the level of CD 25⁺ expression intensity, the ED₅₀ of the series under study was determined by the standard method. **Results and discussion.** A comparative analysis of the immunogenic activity of the live plague vaccine obtained on the experimental nutrient medium with the vaccine produced on Hottinger's agar has been performed. When animals were immunized with doses of 4·10³, 2·10⁴ and 1·10⁵ live microbial cells (regulated doses), the highest level of expression of CD25 marker by lymphocytes was on the day 14, with a subsequent decrease on the day 21 after vaccination. When determining immunogenicity using the conventional method, a high degree of direct correlation between the number of surviving animals and an increase in the level of lymphocytes expressing markers of early activation has been established. Comparison has revealed the general pattern: when the lowest immunizing dose (8·10²) was administered, activation of early immunity markers was not observed. In case of immunization with higher doses on days 7, 14 and 21, a proportional increase in the number of CD25-positive lymphocytes after stimulation with a specific antigen under *in vitro* conditions is detected in the blood of biomodels.

Key words: immunogenicity, live plague vaccine, anti-plague immunity, flow cytometry, lymphocyte activation marker, hydrolysate of condensed corn extract.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Svetlana E. Gostishcheva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostyuchenko M.V., Katunina L.S., Logvinenko O.V., Ivanova G.F., Kurilova A.A. Comparative Analysis of the Immunogenic Activity of the Plague Vaccine Depending on the Growing Medium. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 2:148–151. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-148-151

Received 12.02.2020. Revised 12.03.2020. Accepted 25.06.2020.

Rakitina E.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6073-6544>

Ponomarenko D.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0422-6755>

Kostyuchenko M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6068-6655>

Logvinenko O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1054-8937>

Зарегистрированный в Российской Федерации препарат вакцины чумной живой в форме лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций является лицензированным профилактическим средством против чумной инфекции. Введение вакцины в организм иммунизируемого одним из регламентированных способов обеспечивает достаточный по напряженности иммунитет длительностью до одного года [1].

В биотехнологии получения препарата вакцины чумной живой в качестве накопительной среды для получения биомассы используется агар Хоттингера. В то же время изучена и включена в Промышленный регламент производства питательная среда на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного (ГКЭС). При культивировании в промышленном ферментере (АКМ-Ш) вакцинного штамма чумного микроба количество получаемой с 1 мл среды ГКЭС биомассы составляет в среднем 4,5 млрд, в то время как на агаре Хоттингера прирост не превышает 3,5 млрд с 1 мл. Препарат вакцины, полученный на среде из гидролизата кукурузного экстракта сгущенного, отличается высоким показателем жизнеспособности – до 68,2 %, вследствие чего количество доз в ампуле приближено к максимальному [2].

В процессе производства, внутрилабораторного и выпускающего контроля качества обязательно определяется иммуногенная активность как производственного вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, так и каждой пятой серии препарата [3]. Определение проводится на биопробных животных (морские свинки и аутбредные белые мыши) и проходит в два этапа: иммунизация и последующее заражение. Результат оценивается по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (1962 г.) и выражается показателем ED₅₀ [4].

Известно, что ведущая роль в формировании адаптивного противочумного иммунитета отводится клеточным факторам иммунологической защиты [5–7]. Ранее для определения иммуногенной активности вакцины чумной живой авторами разработан методический подход, основанный на антигенспецифических клеточных тестах *in vitro* и технологии проточной цитофлуориметрии [8].

Данный подход имеет ряд преимуществ: не требует проведения исследований с заражением животных высоковирулентным штаммом *Yersinia pestis*

231, может быть выполнен в сжатые сроки и позволяет количественно оценить активность специфического клеточного иммунитета против чумы.

Контроль препарата вакцины чумной живой подразумевает испытание на иммуногенную активность традиционным методом, изложенным в нормативной документации. Существование альтернативной методики с применением антиген-специфического клеточного теста *in vitro* дает возможность дополнительной оценки формирования противочумного иммунитета. Исследования по определению иммуногенности препарата вакцины чумной живой, полученного на питательной среде ГКЭС, и сопоставление полученных данных с имеющимися результатами подобных исследований для вакцины, выращенной на агаре Хоттингера, позволят дополнительно подтвердить целесообразность использования среды ГКЭС в промышленном производстве вакцины чумной живой.

Исходя из этого, **цель** исследования заключается в проведении сравнительного анализа иммуногенной активности вакцины чумной живой, полученной на различных питательных средах.

Материалы и методы

Иммуногенную активность определяли у препарата вакцины чумной живой, выращенной на питательной среде ГКЭС, в сравнении с препаратом, полученным на агаре Хоттингера.

В качестве биомодели использовали аутбредных белых мышей: четыре группы по 30 особей, иммунизированных подкожно регламентированными дозами чумной вакцины – $8 \cdot 10^2$, $4 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^5$ живых микробных клеток (ж.м.к.).

На 21-е сутки иммунизированным животным из всех групп (по шесть из каждой) вводили подкожно 200 Dcl вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Через 21 сутки после заражения рассчитывали ED₅₀.

Для дополнительной оценки сроков формирования противочумного иммунитета с применением антиген-специфического клеточного теста *in vitro* методом проточной цитометрии в группах определяли уровень интенсивности экспрессии лимфоцитами маркера CD25.

Взятие крови (из сердца в объеме 1,0–1,5 мл) осуществляли до вакцинации, на 7, 14 и 21-е сутки после иммунизации (у шести животных из каж-

дой группы). Биоматериал брали с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕС), а также одобренных Комитетом по биомедицинской этике НИИ физиологии СО РАМН.

Постановку реакции для выявления маркеров активации лимфоцитов проводили в течение 24 ч после взятия материала. Учет количества лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD25⁺, проводили в клеточных тестах *in vitro* с использованием конъюгированных с флуорохромами моноклональных антител (Beckman Coulter, США) [9]. Для специфической активации использовали комплекс водорастворимых антигенов чумного микроба (BrAg), приготовленный по методике Е.Н. Афанасьева [10]. С целью выявления отсутствия спонтанной активации лимфоцитов в контрольной пробе клетки обрабатывали стерильным 0,9 % изотоническим раствором натрия хлорида. В качестве контроля специфичности реакции определяли количество лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации CD25 у интактных животных однократно.

Учет результатов производили с помощью точного цитометра FACSCalibur с программным обеспечением CellQuestPro (Becton Dickinson, США).

Сравнительный анализ иммуногенной активности серий, полученных с использованием различных питательных сред (агар Хоттингера и среда ГКЭС), проводили ретроспективно.

Статистический анализ проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Достоверность уровня различий сравниваемых величин оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При проведении сравнительного анализа иммуногенной активности вакцины чумной живой, полученной на агаре Хоттингера, с вакциной, полученной на среде ГКЭС, выявлены общие закономерности.

Определение иммуногенности по традиционной схеме, изложенной в нормативной документации, позволило рассчитать показатель ED₅₀ в сравнении с нормами спецификации. Сравнимый параметр для обоих вариантов препарата не превышал допустимое значение: для вакцины, выращенной на среде ГКЭС, он составил 4053 (ED₅₀ min), 10647 (ED₅₀) и 32850 (ED₅₀ max), для вакцины, выращенной на агаре Хоттингера, – 6431, 13420, 41400 соответственно.

Падеж биопробных животных после заражения проходил по традиционной схеме – количество павших особей обратно пропорционально иммунизирующей дозе.

Альтернативный метод определения иммуногенной активности позволил сравнить зависимость количества активированных лимфоцитов от введен-

ной дозы для вакцинного препарата, полученного с использованием различных питательных сред.

Так, оба препарата при введении наименьшей иммунизирующей дозы $8 \cdot 10^2$ ж.м.к. не вызывали активацию маркера раннего иммунитета. У животных данной группы во все сроки исследования количество лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25, после стимуляции специфическим антигеном BrAg оставалось на одном уровне, сопоставимом с контрольными значениями – в среднем $(5,02 \pm 1,01) \%$ (контроль $3,80 \pm 0,76 \%$).

На 7-е сутки после вакцинации во всех группах наблюдали увеличение количества CD25-позитивных клеток в популяции лимфоцитов, при этом для максимальной дозы произошло двукратное увеличение в сравнении с контролем – $(21,48 \pm 4,21) \%$ (контроль $10,79 \pm 1,64 \%$) у вакцины, выращенной на среде ГКЭС ($p \leq 0,05$).

Статистически значимое увеличение CD25-позитивных лимфоцитов у экспериментальных животных, иммунизированных вакциной, выращенной на агаре Хоттингера, отмечалось на 14-е сутки – $(39,28 \pm 6,01) \%$ для дозы $2 \cdot 10^4$ ж.м.к. и $(56,81 \pm 5,33) \%$ для дозы $1 \cdot 10^5$ ж.м.к.

При вакцинации препаратом, выращенным на среде ГКЭС, количество CD25-активированных лимфоцитов (в крови белых мышей) достигало $(42,77 \pm 3,03) \%$ для дозы $2 \cdot 10^4$ ж.м.к. и $(46,04 \pm 3,17) \%$ для дозы $1 \cdot 10^5$ ж.м.к.

На 21-е сутки регистрировалось снижение количества лимфоцитов, экспрессирующих CD25 в 2,4 раза для дозы $2 \cdot 10^4$ ж.м.к. – при введении препарата, выращенного на агаре Хоттингера, и в 2,2 раза – при иммунизации вакциной, выращенной на среде ГКЭС. Для максимальной иммунизирующей дозы ($1 \cdot 10^5$ ж.м.к.) наблюдалось снижение активированных лимфоцитов в 2,3 и 1,8 раза соответственно.

Исходя из вышеизложенного, следует отметить, что у животных, иммунизированных дозами $4 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^5$ ж.м.к., наивысший уровень экспрессии лимфоцитами маркера CD25 достигал максимальной отметки на 14-е сутки с последующим снижением на 21-е сутки после вакцинации, а интенсивность антигенреактивности лимфоцитов четко коррелирует с иммунизирующей дозой. При увеличении концентрации ж.м.к. *Y. pestis* EV во вводимой животным вакцине в крови у биомоделей отмечается пропорциональное повышение количества CD25-позитивных лимфоцитов после стимуляции BrAg в условиях *in vitro* вне зависимости от среды выращивания вакцинного препарата.

Несмотря на некоторые различия в начальных сроках формирования иммунного ответа (7-е сутки у вакцины на среде ГКЭС и 14-е сутки у вакцины на агаре Хоттингера), что может объясняться индивидуальной реактивностью биомоделей, к 21-м суткам показатели интенсивности экспрессии лимфоцитов свидетельствовали о напряженности иммунитета во всех группах сравнения.

Для выявления связи наличия протективного противочумного иммунитета, определенного традиционным методом, с уровнем интенсивности экспрессии маркеров CD25, количество выживших в опыте животных сравнивали с повышением уровня лимфоцитов, экспрессирующих антигенспецифические рецепторы CD25, рассчитывая коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Установлена высокая степень прямой связи (коэффициент корреляции $r=1,000$) количества выживших животных с увеличением уровня лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации. Полученные данные по количеству выживших животных в каждой группе вакцинированных коррелируют с изменением количества CD25-лимфоцитов.

Таким образом, сравнительное изучение иммуногенной активности вакцины чумной живой, полученной на разных питательных средах, показало высокую степень иммуногенной активности препарата вне зависимости от среды его выращивания. При этом исследование традиционной методикой подтверждено данными, полученными с помощью метода проточной цитометрии.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Микшис Н.И., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы разработки вакцин для специфической профилактики чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63.
2. Гостищева С.Е., Катунина Л.С., Курилова А.А., Абзаева Н.В., Ковтун Ю.С., Жаринова Н.В., Коняева О.А., Жилченко Е.Б., Куличенко А.Н. Применение плотной питательной среды на основе гидролизата кукурузного экстракта сгущенного в производстве вакцины чумной живой и для хранения штаммов чумного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 1:75–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-75-78.
3. Фармакопейная статья предприятия ФСП 2-8654-07 ЛСР-005759/08-220708 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций». Ставрополь; 2007. 7 с.
4. Апарин Г.П., Вершинина Т.И. Методические рекомендации по определению степени иммуногенности авирулентных штаммов чумного микроба для белых мышей. Иркутск; 1984. 8 с.
5. Рыжикова С.Л., Дружинина Ю.Г., Рябичева Т.Г., Рукавишников М.Ю., Вараксин Н.А. Продукция цитокинов клетками крови как показатель напряженности поствакцинального клеточного иммунитета. *Цитокины и воспаление*. 2009; 8(1):57–61.
6. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(2):228–34. DOI: 10.1128/CVI.05559-11.
7. Amedei A., Niccolai E., Marino L., D'Elia M.M. Role of immune response in *Yersinia pestis* infection. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5(9):628–39. DOI: 10.3855/jidc.1999.
8. Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Куличенко А.Н. Перспективный подход к оценке качества вакцины чумной живой по показателю иммуногенности. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(1):50–4. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-1-50-54.
9. Aghaeepour N., Finak G., FlowCAP Consortium, DREAM Consortium, Hoos H., Mosmann T.R., Brinkman R., Gottardo R., Scheuermann R.H. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat. Methods.* 2013; 10(3):228–38. DOI: 10.1038/nmeth.2365.
10. Афанасьев Е.Н., Таран И.Ф., Тюменцева И.С. Антигенная структура бруцелл. Сообщение I. Сравнительная оценка методов выделения водорастворимых антигенов бруцелл. Ставрополь; 1986. 16 с.

References

1. Mikshis N.I., Kutyrev V.V. [Current state of the problem of vaccine development for specific prophylaxis of plague]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (1):50–63. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-50-63
2. Gostishcheva S.E., Katunina L.S., Kurilova A.A., Abzaeva N.V., Kovtun Yu.S., Zharinova N.V., Konyayeva O.A., Zhilchenko E.B., Kulichenko A.N. [Usage of solid medium on the basis of corn-steep extract hydrolysate in manufacturing of live plague vaccine and for plague agent strain preservation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; (1):75–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-75-78.
3. [Pharmacopoeial monograph of the enterprise PME 42-8654-07 LSR-005759/08-220708 “Live plague vaccine, lyophilizate for the preparation of suspension for injections, cutaneous scarification and inhalation”]. Stavropol; 2007. 7 p.
4. Aparin G.P., Vershinina T.I. [Methodological recommendations for determining the degree of immunogenicity for white mice of avirulent strains of plague microbe]. Irkutsk; 1984. 8 p.
5. Ryzhikova S.L., Druzhinina Yu.G., Ryabicheva T.G., Rukavishnikov M.Yu., Varaksin N.A. [Production of cytokines by blood cells as an indicator of the intensity of post-vaccinal cellular immunity]. *Tsitokiny i Vospalenie [Cytokines and Inflammation]*. 2009; 8(1): 57–61.
6. Li B., Du C., Zhou L., Bi Y., Wang X., Wen L., Guo Z., Song Z., Yang R. Humoral and cellular immune responses to *Yersinia pestis* infection in long-term recovered plague patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(2):228–34. DOI: 10.1128/CVI.05559-11.
7. Amedei A., Niccolai E., Marino L., D'Elia M.M. Role of immune response in *Yersinia pestis* infection. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5(9):628–39. DOI: 10.3855/jidc.1999.
8. Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostuchenko M.V., Logvinenko O.V., Kulichenko A.N. [Promising approach to the assessment of the quality of the live plague vaccine in terms of immunogenicity. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*]. [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2019; 18(1):50–4. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-1-50-54
9. Aghaeepour N., Finak G., FlowCAP Consortium, DREAM Consortium, Hoos H., Mosmann T.R., Brinkman R., Gottardo R., Scheuermann R.H. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat. Methods.* 2013; 10(3):228–38. DOI: 10.1038/nmeth.2365.
10. Afanas'ev E.N., Taran I.F., Tyumentseva I.S. [Antigenic structure of Brucella. Communication I. Comparative assessment of methods for the isolation of water-soluble antigens of Brucella]. Stavropol. 1986. 16 p.

Authors:

Gostishcheva S.E., Abzaeva N.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Kostuchenko M.V., Katunina L.S., Logvinenko O.V., Ivanova G.F., Kurilova A.A. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В., Катунина Л.С., Логвиненко О.В., Иванова Г.Ф., Курилова А.А. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.