

**APPLICATION OF A BIOFLUORESCENT STRAIN OF *YERSINIA PESTIS*  
AND FLOW CYTOMETRY TO ASSESS THE PHAGOCYTIC ACTIVITY  
OF BLOOD LEUKOCYTES IN AN *IN VITRO* TEST**

Kravtsov A. L. <sup>a</sup>,  
Budanova A. A. <sup>a</sup>,  
Klyueva S. N. <sup>a</sup>,  
Kozhevnikov V. A. <sup>a</sup>,  
Bugorkova S. A. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> FKUN Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov, Russia.

**ПРИМЕНЕНИЕ БИОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В ТЕСТЕ *IN VITRO***

Кравцов А. Л.<sup>1</sup>,  
Буданова А. А.<sup>1</sup>,  
Клюева С. Н.<sup>1</sup>,  
Кожевников В. А.<sup>1</sup>,  
Бугоркова С. А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,  
Саратов, Россия.

## Резюме

Фагоцитарная активность (ФА) лейкоцитов крови по отношению к *Yersinia pestis* отражает состояние клеточного противочумного иммунитета у людей и лабораторных животных. **Целью** настоящей работы явилась оценка стимулирующего эффекта противочумной вакцинации на ФА лейкоцитов периферической крови в тесте *in vitro* с использованием проточной цитометрии и биофлуоресцентного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГрTurboGFP-B (KM2115), экспрессирующего зеленый флуоресцирующий белок GFP. **Материалы и методы.** Исследовали лейкоциты в 100 мкл цельной гепаринизированной крови мышей, морских свинок и людей, привитых и не привитых живой чумной вакциной. Фагоцитарную реакцию моделировали путем добавления живых клеток штамма KM2115 в кровь, разведенную физиологическим раствором, и результат учитывали через 15 мин методом проточной цитометрии, определяя в гейте гранулоцитов долю активных фагоцитов, обладающих интенсивной флуоресценцией в зеленой области спектра. Анализ проводили согласно протоколу, разработанному нами ранее в опытах с убитым чумным микробом, меченым красителем ФИТЦ. **Результаты.** Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности использования биофлуоресцентного штамма *Y. pestis* для быстрого определения ФА гранулоцитов методом проточной цитометрии в микрообъемах цельной крови человека и животных без длительного предварительного окрашивания микроба флуоресцирующим красителем. Для клеток крови привитых против чумы людей и животных зарегистрированы повышенные значения фагоцитарных индексов, что согласуется с данными о стимулирующем эффекте противочумной вакцинации на фагоцитарную функцию лейкоцитов. По данным проточной цитометрии, активные фагоциты крови мышей контрольной группы флуоресцировали в зеленой области спектра после контакта *in vitro* с живыми клетками штамма KM 2115 интенсивнее фагоцитов морских свинок и человека, что могло быть связано с видовой особенностью состава мышинных лейкоцитарных протеаз и, как следствие, с повышенной экспрессией белка GFP в бактериях, поглощенных мышинными фагоцитами. **Заключение.** Применение биофлуоресцентного штамма упрощает процедуру моделирования взаимодействия клеток макроорганизма с чумным микробом и последующую оценку ФА нейтрофилов в образцах цельной периферической крови, что может быть использовано для характеристики напряженности клеточного поствакцинального противочумного иммунитета в тесте *in vitro*.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, лейкоциты крови, фагоцитарная активность, зеленый флуоресцирующий белок, проточная цитометрия, оценка клеточного иммунитета *in vitro*.

### Abstract

Phagocytic activity (PA) of blood leukocytes in relation to *Yersinia pestis* reflects the state of cellular anti-plague immunity in humans and laboratory animals. **The purpose** of this work was to evaluate the stimulating effect of anti-plague vaccination on the PA of peripheral blood leukocytes in an in vitro test using flow cytometry and the biofluorescent strain of *Y. pestis* EV NIIEG pTurboGFP-B (KM2115), expressing the green fluorescent protein GFP. **Materials and methods.** We studied leukocytes in 100 µl of heparinized whole blood of mice, guinea pigs and people vaccinated and not vaccinated with live plague vaccine. Suspensions of living cells of strain KM2115 were mixed with blood diluted with physiological solution. The result of the phagocytic reaction was taken into account after 15 minutes by flow cytometry, determining the proportion of active phagocytes in the granulocyte gate that have intense fluorescence in the green region of the spectrum. The analysis was carried out according to the protocol we had previously developed in experiments with killed plague microbes labeled with FITC dye. **Results.** Experimental data have been obtained indicating the possibility of using a biofluorescent *Y. pestis* strain for the rapid determination of granulocyte PA by flow cytometry in microvolumes of whole blood of humans and animals without lengthy preliminary staining of microbes with a fluorescent dye. Increased values of phagocytic indices were registered for blood cells of people and animals vaccinated against plague, which is consistent with data on the stimulating effect of anti-plague vaccination on the phagocytic function of leukocytes. **Conclusion.** The use of a biofluorescent strain simplified the procedure for modeling the interaction of macroorganism cells with plague microbes and subsequent assessment of neutrophil PA in samples of whole peripheral blood, which can be used to characterize the strength of cellular post-vaccination anti-plague immunity in an in vitro test.

**Keywords:** *Yersinia pestis*, blood leukocytes, phagocytic activity, green fluorescent protein, flow cytometry, assessment of cellular immunity *in vitro*.

## 1 Введение

Фагоцитоз при бактериальных инфекциях является основой клеточного иммунитета, определяющей исход инфекционного процесса, в том числе и при чуме [12,13]. Показатели фагоцитарной реакции при чуме традиционно оцениваются *in vitro* на моделях макрофагов лабораторных животных [7,13], а взаимодействие возбудителя чумы с фагоцитами крови (нейтрофилами) до сих пор остается мало изученным [8,12]. В то же время у людей именно лейкоциты крови являются основным исследуемым объектом при определении активности фагоцитоза как показателя клеточного поствакцинального антибактериального иммунитета [9,10]. У циркулирующих в крови нейтрофильных гранулоцитов (НГ) может быть два четко различимых функциональных состояния: исходное, так называемое «*redox*», с низким уровнем протекания функциональных процессов, и активированное, переход в которое обусловлен стимуляцией, индуцируемой бактериями, микробными антигенами (например, липополисахаридами) или аллергенами. При таком переходе, получившем название прайминга (*priming* – подготовка к работе), на поверхности фагоцитов повышается плотность экспрессии Fc-рецепторов, взаимодействуя с которыми молекулы специфических IgG антител, входящие в состав формируемых в крови иммунных комплексов, стимулируют поглотительную и бактерицидную функцию НГ при киллинге бактерий [11].

Хотя прайминг, индуцируемый противочумной вакцинацией, существенно повышает функциональный потенциал фагоцитов при повторном взаимодействии иммунного организма с чумным микробом и его антигенами [1,12], методы, оценивающие *in vitro* фагоцитарную активность (ФА) лейкоцитов периферической крови, пока не применяются для характеристики состояния поствакцинального клеточного противочумного иммунитета. В единичных публикациях, посвящённых вопросам изучения взаимодействия *Yersinia pestis* с фагоцитами крови человека, используются нейтрофилы, предварительно выделенные из периферической крови с помощью градиентного центрифугирования. Результаты фагоцитарной реакции учитываются с помощью микроскопии, либо микробиологическим методом по интенсивности развивающегося *in vitro* бактерицидного эффекта [8,14]. Однако нельзя утверждать, что регистрируемый микробиологическим методом бактерицидный эффект связан именно с фагоцитозом, поскольку кроме фагоцитоза НГ периферической крови используют для киллинга бактерий другие, не менее эффективные стратегии бактерицидности – нетоз и секреторную дегрануляцию [12]. Микроскопический метод учёта показателей фагоцитарной реакции длителен, трудоёмок, и, главное, не дает объективной количественной информации, что является основной причиной, ограничивающей его практическое применение. Перспективу решения проблемы связывают с более широким внедрением в практику иммунологических исследований проточно-цитометрической технологии,

имеющей при оценке показателей фагоцитоза такие очевидные преимущества как скорость, объективность анализа и простота постановки реакции [9,10].

Ранее нами был разработан метод оценки ФА лейкоцитов крови с использованием проточной цитометрии и убитых нагреванием клеток *Y.pestis*, включающий процедуру предварительной подготовки микробных взвесей, окрашенных по белку флуоресцирующим красителем ФИТЦ. В исследованиях *in vitro* с клетками крови человека и животных с его помощью были получены экспериментальные данные о возможности регистрации и оценки стимулирующего эффекта противочумной вакцинации на поглотительную функцию фагоцитов по отношению к убитым клеткам чумного микроба [2,3]. Анализ литературы свидетельствует, что параметры фагоцитарной реакции можно учитывать в опытах с биофлуоресцентными штаммами *Y.pestis*, экспрессирующими флуоресцентные белки. В качестве модельных такие штаммы применялись в экспериментах *in vitro* с макрофагами [7], нейтрофилами мышей *in vivo* [12] и клетками простейших (почвенные амебы, нематоды) [4]. Однако, в тесте *in vitro* для определения ФА нейтрофилов методом проточной цитометрии, не требующим предварительного выделения фагоцитов из цельной периферической крови человека и животных [3], биофлуоресцентные штаммы ранее не применялись. Такой анализ не использовался для сравнительной оценки ФА лейкоцитов крови привитых и не привитых против чумы лиц.

Целью настоящей работы была оценка возможности определения стимулирующего эффекта противочумной вакцинации на ФА лейкоцитов периферической крови в тесте *in vitro* с использованием биофлуоресцентного штамма и проточной цитометрии.

## 2 Материалы и методы

В работе использовали исходный вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ и полученный из этого штамма рекомбинантный биофлуоресцентный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ pTurboGFP-B (pFra<sup>+</sup> pCad<sup>+</sup> pPst<sup>+</sup> pTurboGFP-B), депонированный под номером КМ 2115 в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Биофлуоресцентный штамм, содержащий векторную плазмиду pTurboGFP-B, кодирующую синтез зелёного флуоресцирующего белка GFP, выращивали, как и исходный его вариант, на агаре LB (pH 7,2) в течение 48 ч при 28 °С, но добавляя в среду 50 мг/мл ампициллина. По стандарту мутности ОСО из двухсуточных агаровых культур готовили в физиологическом растворе (pH7,2) взвеси живых бактерий с концентрацией  $2 \times 10^9$  КОЕ для иммунизации лабораторных животных (штамм EV) и опытов *in vitro* с лейкоцитами периферической крови (штамм КМ 2115).

Экспериментальными моделями служили беспородные морские свинки массой 250-300 г и мыши линии BALB/c массой 18-20 г, полученные из отдела экспериментальных животных с виварием ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Всего в исследованиях было использовано по 12 животных каждого вида, разделенных на две равные

группы – опытную и контрольную. Мышей и морских свинок опытных групп подкожно иммунизировали иммуногенной дозой штамма *Y.pestis* EV НИИЭГ:  $2,5 \times 10^4$  м.к. и  $5 \times 10^3$  м.к. соответственно. Фагоцитарную активность оценивали на 21-е сутки иммуногенеза - в период формирования у биомоделей наиболее напряженного противочумного иммунитета. Иммунологическую перестройку в организме привитых против чумы животных подтверждали определением в крови титров специфических антител к капсульному антигену чумного микроба с помощью иммуноферментной тест-системы «ИФА-АТ-Ф1 *YERSINIA PESTIS*», производства ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора [5]. Для цитометрических исследований от каждого из животных в опытной и контрольной группах собирали в пробирки с антикоагулянтом (гепарином) кровь: у мышей - путем декапитации; у морских свинок - из сердца с помощью шприца на фоне анестезии. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с законодательством Российской Федерации, программа экспериментальных работ была одобрена Комиссией по биоэтике при ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 25.05.2023г.). Кроме того, в опытах с биофлуоресцентным штаммом чумного микроба использовали для оценки и сравнения показателей ФА лейкоцитов гепаринизированную кровь никогда не прививавшихся против чумы людей (группа сравнения,  $n=3$ ) и кровь лиц, неоднократно привитых живой чумной вакциной (группа наблюдения,  $n=5$ ). У всех участников исследования забор крови из локтевой вены в пробирки с гепарином проводили на основании должным образом оформленного добровольного информированного согласия. Полученные образцы крови использовали в течение 2-х часов после забора крови.

Фагоцитарную активность гранулоцитов по отношению к живым клеткам биофлуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2115 определяли в микрообъемах цельной крови человека и лабораторных животных цитофлуориметрическим методом, подробно описанным нами ранее [2,3]. Применяли тот же протокол цитофлуориметрического анализа для идентификации и подсчета в гейте гранулоцитов крови активных фагоцитов, «загруженных» бактериями, флуоресцирующими в зеленой области спектра. Отличие методики заключалось в том, что регистрировали не зеленую флуоресценцию красителя ФИТЦ, адсорбированного убитыми микробными клетками, а зеленую биофлуоресценцию белка GFP, экспрессируемого живыми клетками чумного микроба.

Полученные экспериментальные данные статистически обрабатывали с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Office Excel 2016», «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.»), представляя результаты в виде медианы (Me) и квартильных отклонений (Q25–Q75) с расчетом достоверности различий в исследуемых группах с использованием U-критерия Манна–Уитни. Значение  $p < 0,05$  считали статистически значимым.

### 3 Результаты и обсуждение

В суммарной популяции лейкоцитов каждого исследуемого образца крови гранулоциты автоматически дифференцировали от мононуклеаров по показателям малоуглового и бокового светорассеяния (по размеру и степени внутриклеточной гранулярности соответственно), чтобы в гейте гранулоцитов можно было регистрировать флуоресценцию, приобретаемую активными фагоцитами после поглощения ими *in vitro* микробных клеток, обладающих свечением в зеленой области спектра [2,3]. Результаты такой регистрации наглядно представлены на рисунке (рис. 1) для фагоцитов крови двух используемых в работе биомоделей в виде характерных распределений больших статистических выборок отдельных клеток по интенсивности зелёной флуоресценции. Все активные фагоциты, поглотившие бактерии и обладающие интенсивной флуоресценцией, учитывались по уровню свечения в выделенном на каждой гистограмме регионе R2. Видно, что проточнocyтoметрический анализ позволяет четко дифференцировать не активные мышинные фагоциты крови с очень слабым собственным фоновым свечением (менее 10 условных единиц каналов) от 47,5 % активных клеток, которые у не привитого против чумы животного характеризовались средним уровнем зеленого свечения на клетку (Mean), равным 1577 у.е. Противочумная вакцинация стимулировала ФА гранулоцитов крови мышей, как по фагоцитарному индексу (число активных фагоцитов повышалось в 1,4 раза – до 66,0 %), так и по фагоцитарным числам, определяющим интенсивность клеточной флуоресценции (повышение Mean после прививки до 3986 у.е. – в 2,5 раза). У морских свинок отмечали иной характер стимуляции фагоцитоза под влиянием противочумной вакцинации, проявившийся в существенном повышении фагоцитарного индекса – в 4,4 раза (с 10,6 % до 46,8 %). При этом в опытной группе вакцинированных морских свинок отсутствовали, в отличие от мышей, изменения, связанные с повышением интенсивности зеленой флуоресценции отдельных активных фагоцитов.

Статистически обработанные экспериментальные данные, полученные в опытах с лейкоцитами крови двух видов животных, представлены нами в таблице (табл. 1) вместе с результатами анализа лейкоцитов крови людей, полученными в аналогичных условиях. В группе привитых против чумы доноров, как и у вакцинированных животных, были зарегистрированы более высокие значения фагоцитарных индексов для популяции гранулоцитов периферической крови. Стимулирующий эффект противочумной вакцинации на ФА лейкоцитов крови человека по отношению к чумному микробу имел, по исследуемым показателям, большее сходство с эффектом, характерным для морских свинок, чем для мышей. Кроме того, из сравнения представленных в таблице данных следует, что активные фагоциты крови мышей контрольной группы флуоресцировали в зеленой области спектра после контакта *in vitro* с живыми клетками биофлуоресцентного штамма КМ 2115 в 20 раз интенсивнее фагоцитов крови морских свинок и в 40 раз интенсивнее фагоцитов крови людей.

Причина столь выраженных видовых различий пока не ясна. Необходимы дополнительные исследования, поскольку маловероятно, что мышинные нейтрофилы поглощали при фагоцитозе в 40 раз больше живых бактерий, чем нейтрофилы человека. Вероятно, такие отличия обусловлены у мышей составом и субстратной специфичностью лейкоцитарных протеаз, играющих ведущую роль в обеспечении деструкции бактериальных белков. У мышей самый высокий уровень дефицита в фагоцитах крови лейкоцитарной эластазы (основной протеазы лейкоцитов крови человека) [6], ответственной, как известно, за быструю избирательную деструкцию факторов вирулентности *Yersinia spp.* и других энтеробактерий [15]. Именно набором лейкоцитарных протеаз мыши принципиально отличаются от человека. Возможно, поэтому обнадеживающие результаты тестирования разрабатываемых противочумных вакцин на мышах, не всегда оказываются столь убедительно показательными на других биомоделях и для людей [14]. Все это лишний раз демонстрирует важность адекватного подбора биомодели и метода оценки того или иного показателя для конкретных задач исследования при разработке средств специфической профилактики чумы.

#### 4 Заключение

Таким образом, применение биофлуоресцентного штамма KM2115 и проточной цитофлуориметрии упрощает процедуру моделирования взаимодействия фагоцитов крови с чумным микробом *in vitro* и последующую оценку стимулирующего эффекта противочумной вакцинации на ФА лейкоцитов крови биомодели и человека.

## ТАБЛИЦЫ

**Таблица 1.** Влияние противочумной вакцинации на фагоцитоз штамма *Y.pestis* KM2115 лейкоцитами крови мышей, морских свинок и человека.

**Table 1.** Effect of anti-plague vaccination on phagocytosis of *Y. pestis* strain KM2115 by blood leukocytes of mice, guinea pigs and humans.

| Объект исследования /<br>Object of study      | Фагоцитарные индексы /<br>Phagocytic indices ,% |                     | Фагоцитарные числа в у.е.<br>интенсивности<br>флуоресценции / Phagocytic<br>number in arbitrary units of<br>fluorescence intensity |                     |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                               | Вак/Vac                                         | Не Вак/No Vac       | Вак/Vac                                                                                                                            | Не Вак/No<br>Vac    |
| Кровь мыши/<br>Mice blood                     | 62,3<br>(42,9–73,4)*                            | 37,2<br>(31,9–42,6) | 3750<br>(2992–5682)*                                                                                                               | 2563<br>(1473–3153) |
| Кровь морской<br>свинки / Guinea<br>pig blood | 30,6<br>(19,5–47,9)*                            | 11,3<br>(10,0–16,2) | 105<br>(93–135)                                                                                                                    | 128<br>(83–194)     |
| Кровь<br>человека /<br>human blood            | 73,7<br>(61,2–81,4)*                            | 50,4<br>(40,4–58,6) | 61<br>(5–85)                                                                                                                       | 66<br>(53–91)       |

**Примечание.** Вак – вакцинированные; Не Вак – не вакцинированные; \* – достоверные различия с контролем ( $p<0.05$ )

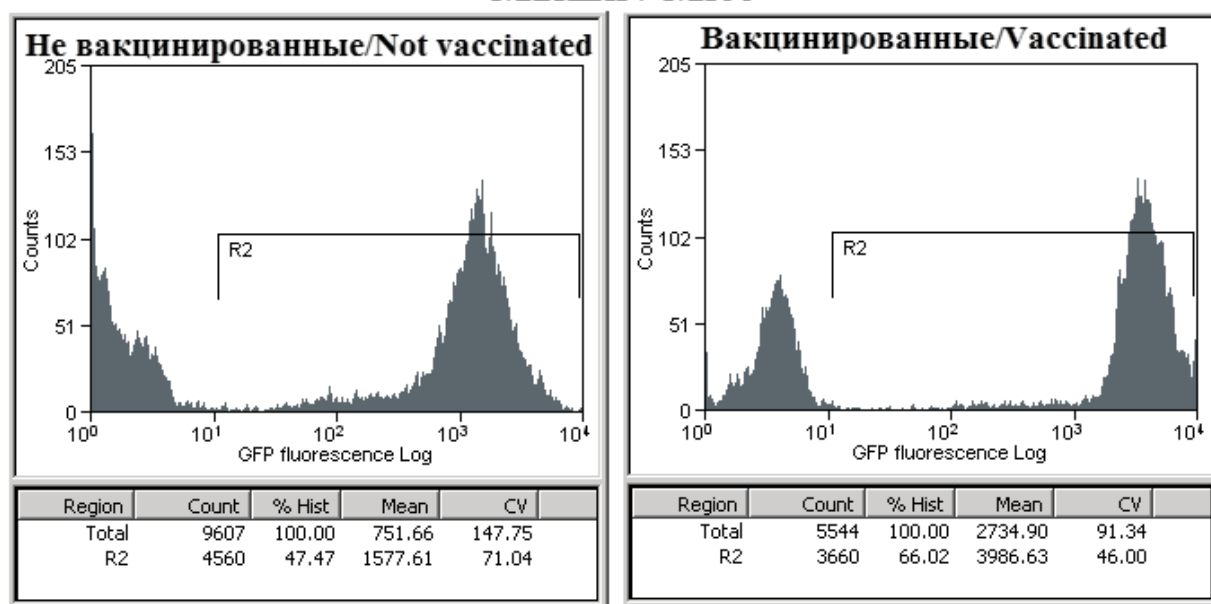
**Note.** Vac– vaccinated; No Vac – not vaccinated; \* – significant differences with control ( $p<0.05$ )

## РИСУНКИ

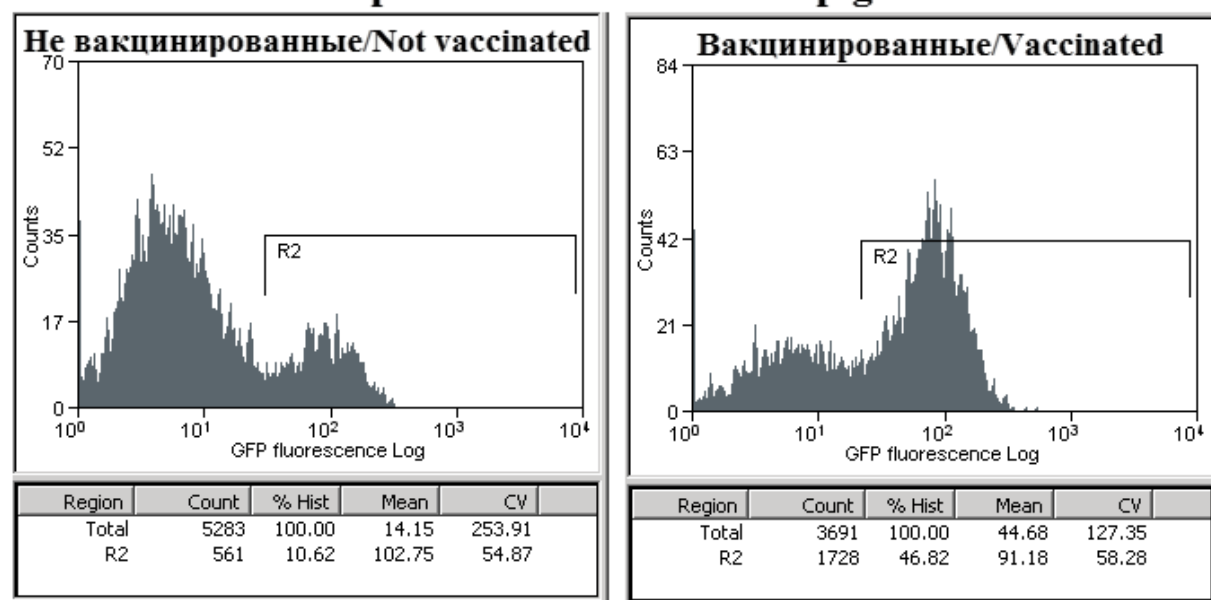
**Рисунок 1.** Гистограммы, отражающие стимулирующее воздействие противочумной вакцинации на фагоцитоз биофлуоресцентного штамма KM2115 чумного микроба гранулоцитами крови лабораторных животных.

**Figure 1.** Histograms reflecting the stimulating effect of anti-plague vaccination on phagocytosis of the biofluorescent strain KM2115 of the plague microbe by blood granulocytes of laboratory animals.

### Мыши / Mice



### Морские свинки / Guinea pigs



**Примечание:** результаты учитывали через 15 мин после добавления флуоресцирующих бактерий к лейкоцитам цельной периферической крови. Регион R2 соответствует активным фагоцитам. Численные значения показателей (% Hist) и (Mean) для региона R2 под каждой гистограммой – это

фагоцитарные индексы (%) и средние значения фагоцитарных чисел в условных единицах интенсивности флуоресценции.

**Note:** the results were taken into account 15 minutes after the addition of bacteria to leukocytes of whole peripheral blood. Region R2 corresponds to active phagocytes. The numerical values of the indicators (% Hist) and (Mean) for the R2 region under each histogram are the phagocytic indices (%) and the average values of the phagocytic numbers in arbitrary units of fluorescence intensity.

## ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ\_МЕТАДАННЫЕ

### Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

**Клюева Светлана Николаевна** – к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46, Тел.: 8(987)830-50-75, E-mail: [klyueva.cvetlana@mail.ru](mailto:klyueva.cvetlana@mail.ru)

**Klyueva Svetlana Nikolaevna**, [PhD \(Biology\), Research Associate Department Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 410005, Russian Federation, \[Saratov, Universitetskaya str., 46, Phone: +7\\(987\\)830-50-75, E-mail: \\[klyueva.cvetlana@mail.ru\\]\\(mailto:klyueva.cvetlana@mail.ru\\)\]\(#\)](#)

### Блок 2. Информация об авторах

**Кравцов Александр Леонидович** – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

**Kravtsov A.L.**, PhD, MD (Biology), Leading Research, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Буданова Ангелина Андреевна** – к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

**Budanova A.A.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Department Immunology Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Кожевников Виталий Александрович** – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

**Kozhevnikov V.A.**, Junior Researcher, Department of Immunology Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

**Бугоркова Светлана Александровна** (Bugorkova Svetlana Aleksandrovna) – д.м.н., и.о. зав. отделом иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия;

**Bugorkova S.A.**, PhD, MD (Medicine), Chief Researcher, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Блок 3. Метаданные статьи**

APPLICATION OF A BIOFLUORESCENT STRAIN OF *YERSINIA PESTIS* AND FLOW CYTOMETRY TO ASSESS THE PHAGOCYTIC ACTIVITY OF BLOOD LEUKOCYTES IN AN *IN VITRO* TEST

ПРИМЕНЕНИЕ БИОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ В ТЕСТЕ *IN VITRO*

**Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:**

БИОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ ШТАММ *YERSINIA PESTIS*  
BIOFLUORESCENT STRAIN OF *YERSINIA PESTIS*

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, лейкоциты крови, фагоцитарная активность, зеленый флуоресцирующий белок, проточная цитометрия, оценка клеточного иммунитета *in vitro*.

**Keywords:** *Yersinia pestis*, blood leukocytes, phagocytic activity, green fluorescent protein, flow cytometry, assessment of cellular immunity *in vitro*.

Краткие сообщения.

Количество страниц текста – 8,

Количество таблиц – 1,

Количество рисунков – 1.

08.07.2024

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

| Порядковый номер ссылки | Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные                                                                                                                                                                                                                                         | ФИО, название публикации и источника на английском                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1.                      | Каральник Б.В., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Пономарева Т.С., Жунусова Г.Б., Закарян С.Б., Мухамедьярова Р.Б. Выявление иммунной памяти на первом этапе антигенспецифического клеточного ответа при повторном введении живой чумной вакцины // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2019. Т. 18, № 6. С. 2633.         | [Karalnik B.V., Deryabin P.N., Denisova T.G., Ponomareva T.S., Zunussova G.B., Zakaryan S.B., Vuchamedyarova R.B. Revelation of immune memory at the first stage of antigen specific cell response after second introduction of the live plague vaccine. Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention, 2019, Vol. 18, no. 6, pp. 26-33 (In Russ.)] |                                               |
| 2.                      | Клюева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Кожевников В.А., Гончарова А.Ю. Фагоцитарная и цитокинпродуцирующая активность лейкоцитов крови мышей линии BALB/с, привитых против чумы на фоне иммуномодуляции полиоксидонием // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 4. С. 1412-1420. | [Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorcova S.N., Schukovskaya T.N., Kozhevnikov V.A., Goncharova A.Yu. Blood leukocyte phagocytic and cytokine producing activity of antiplague vaccinated BALB/c mice against the background of immunomodulation                                                                                                                                    | doi:<br>10.31857/S102872210007044-3.          |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                       |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | by polyoxidonium. Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2019, Vol. 13 (22), no. 4, pp. 1412-1420 (In Russ.)]                                                                                                                                                                                                      |                                       |
| 3. | Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А. Влияние противочумной вакцинации на фагоцитарную активность гранулоцитов крови человека // Российский иммунологический журнал, 2021. Т.24, № 1, С.113-122.                                                          | [Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., Kudryavtseva O.M., S.A. Bugorkova Effect of antiplague vaccination on phagocytic activity of human blood granulocytes. Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2021, Vol. 24, no. 1, pp. 123-132 (in Russ.)]                                                          | doi: 10.46235/1028-7221-166-EOA.      |
| 4. | Куклева Л.М., Тучков И.В., Оглодин Е.Г., Девдариани З.Л., Морозов О.А., Кузнецов О.С., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А. Получение штамма <i>Yersinia pestis</i> , продуцирующего флуоресцентный белок GFP, и перспективы его использования // Проблемы особо опасных инфекций. 2019, № 4. С. 61–66. | [Kukleva L.M., Tuchkov I.V., Oglodin E.G., Devdariani Z.L., Morozov O.A., Kuznetsov O.S., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A. Construction of <i>Yersinia pestis</i> Strain Producing Fluorescent Protein GFP and Prospects of Its Usage. Problemy Osobo Opasnykh Infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections. 2019; 4:61–66 (In Russ)] | doi: 10.21055/0370-1069-2019-4-61-66. |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                     |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5.  | Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба: Методические указания. - М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002.- 63с.                                                                                                                                          | [Basic requirements for vaccine strains of the plague microbe: Guidelines. - M.: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of Russia, 2002.- 63 p.] |                                                                                                                     |
| 6.  | Ashe B.M., Zimmerman M. Comparison of the neutral proteinases from polymorphonuclear leukocytes of several experimental animal species. <i>Biochem., Int.</i> 1982, Vol.5, no.4, pp.487-494.                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                        | <a href="https://doi.org/10.1111/1/j.1365-3083.2012.02767.x">https://doi.org/10.1111/1/j.1365-3083.2012.02767.x</a> |
| 7.  | Bi Y., Wang X., Han Y., Guo Z., Yang R. <i>Yersinia pestis</i> versus <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> : effects on host macrophages. <i>Scandinavian Journal of Immunology</i> , 2012, Vol.76, no.6, pp. 541-551.                                                                             |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                     |
| 8.  | Dudte S.C., Hinnebusch B.J., Shannon J.G. Characterization of <i>Yersinia pestis</i> interactions with human neutrophils in vitro. <i>Front Cell Infect. Microbiol.</i> , 2017, no. 7, pp. 358-365.                                                                                              |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                     |
| 9.  | Gupta-Wright A., Tembo D., Jambo K., Chimbayo E., Mvaya L., Caldwell S., Russell D.G., Mwandumba H.C. Functional analysis of phagocyte activity in whole blood from HIV/Tuberculosis – infected individuals using a novel flow cytometry based assay. <i>Front Immunol.</i> , 2017, no. 8, 1222. |                                                                                                                                                                                                        | doi:<br>10.3389/fimmu.2017.01222.                                                                                   |
| 10. | Jansen W.T.M., Väkeväinen Anttila M., Käyhty H., Nahm M., Bakker N., Verhoef J., Verheul A.F. Comparison of a classical phagocytosis assay and a                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                     |

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                |  |                                   |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-----------------------------------|
|     | flow cytometry assay for assessment of the phagocytic capacity of sera from adults vaccinated with pneumococcal conjugate vaccine. Clin. Diag. Lab. Immunol., 2001, Vol. 8, no. 2, pp. 245-250.                                                                |  |                                   |
| 11. | Rosales C., Uribe-Querol E. Neutrophil activation by antibody receptors. In book: Neutrophils. Ed. Khajjah M. London: Intechopen limited, 2019. 85p.                                                                                                           |  | doi:<br>10.5772/intechopen.80666. |
| 12. | Shannon J.G., Hinnebusch B.J. Antibody opsonization enhances early interactions between <i>Yersinia pestis</i> and neutrophils in the skin and draining lymph nodes in a mouse model of bubonic plague. Infection and Immunity, 2021, Vol.89, no.1, e00061-20. |  | doi:<br>10.1128/IAI.00061-20.     |
| 13. | Silva M.T. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. J. Leuk. Biology, 2010, Vol. 88, no. 5, pp. 885-96.                                                                                                                     |  | doi:<br>10.1189/jlb.0410205.      |
| 14. | Spinner J.L., Cundiff J.A., Kobayashi S.D. <i>Yersinia pestis</i> type III secretion system dependent inhibition of human polymorphonuclear leukocyte function. Infect. Immun., 2008, Vol. 76, no. 8, pp. 3754-3760.                                           |  |                                   |
| 15. | Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. Nature, 2002, Vol. 417, pp. 91-94.                                                                                                               |  |                                   |