

## ОЦЕНКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНАЦИИ ЛЮДЕЙ ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

© 2019 г. М. В. Силкина\*, А. С. Карцева, О. В. Калмантаева,  
М. М. Рогозин, В. В. Фирстова, И. Г. Шемякин

\*E-mail: marksil@yandex.ru

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»  
Роспотребнадзора, Оболенск, Россия

Поступила: 21.05.2019. Принята: 29.06.2019

Вакцинопрофилактика сибирской язвы в России проводится по эпидемиологическим показаниям 1 раз в год с использованием живой сибиреязвенной вакцины. Основной проблемой является отсутствие метода контроля иммунологической эффективности вакцинации. В статье проанализированы гуморальный и клеточный специфический иммунитет у людей через 10–12 месяцев после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной. Показано, что практически у всех вакцинированных доноров в сыворотках крови не были выявлены антитела к протективному антигену (ПА). Однако у всех вакцинированных за исключением одного донора в крови циркулировали Т- и В-лимфоциты, способные усиливать экспрессию активационных рецепторов и пролиферативную активность лимфоцитов *in vitro* в присутствии ПА. Полученные данные позволяют предположить, что в отдаленные сроки после вакцинации против сибирской язвы сохраняется специфический клеточный иммунитет.

**Ключевые слова:** *B. anthracis*, антитела, CD69, CD30, лимфоциты, пролиферация, протективный антиген, вакцина

DOI: 10.31857/S102872210007270-2

Адрес: Оболенск, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Силкина Марина Владимировна.

Тел.: +7 496 731 20 84; E-mail: marksil@yandex.ru

Авторы:

**Силкина М. В.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Карцева А. С.**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Калмантаева О. В.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Рогозин М. М.**, стажер-исследователь ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Фирстова В. В.**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия;

**Шемякин И. Г.**, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время специфическая профилактика сибиреязвенной инфекции в России и странах ближнего зарубежья осуществляется с использованием вакцины живой сибиреязвенной сухой для подкожного и скарификационного применения (серия 265, Киров). Зарубежом существует две вакцины против сибирской язвы человека AVA (anthrax vaccine adsorbed), одобренная для использования в США, и AVP (anthrax vaccine precipitated), лицензированная в Великобритании. Обе они являются химическими вакцинами. Эффективность иммунизации химическими вакцинами проводят на основании выявления токсиннейтрализующих антител. Однако через год после иммунизации химическими вакцинами у большинства людей в крови не детектируются специфические антитела, а сыворотки серопозитивных доноров не способны нейтрализовать действие летального токсина (ЛТ) сибирской язвы [1, 2].

Попытки оценить иммунологическую эффективность иммунизации живой сибиреязвенной

вакциной не принесли успеха. В экспериментах на животных, привитых сибиреязвенной вакциной, было показано, что титры антител сывороток их крови не соответствовали степени защиты животных от сибиреязвенной инфекции и не коррелировали с напряженностью иммунитета. Среди иммунизированных живой сибиреязвенной вакциной выявлялось 13% серонегативных доноров [1]. У серопозитивных доноров уровень антител к ПА падал в течение 6 месяцев. Аналогичная картина наблюдалась у людей, переболевших сибирской язвой, в крови которых также долго не циркулировали специфические антитела [3].

На мышинной модели было показано, что защита от сибиреязвенной инфекции зависит от высвобождения  $IFN\gamma$  Th1 клетками [4]. В связи с этим логично предположить, что в поддержании иммунологической памяти участвует не только гуморальное звено иммунитета, но и клеточное. Вследствие этого возникает необходимость в поиске новых методов оценки иммунологической памяти после вакцинации людей против сибирской язвы. Одним из подходов может стать оценка Т- и В-клеточного звена иммунитета.

**Цель исследования** – проанализировать гуморальный и клеточный иммунитет к возбудителю сибирской язвы у людей, иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

У доноров, многократно иммунизированных вакциной сибиреязвенной живой сухой для подкожного и скарификационного применения (серия 265, Киров), брали цельную кровь в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner-Bio-One, Австрия) с лития гепарином для последующего выделения мононуклеаров и активатором свертывания крови для получения сыворотки. Интервал между последней вакцинацией донора и включением его в исследование составлял 10–12 месяцев. Контролем выступала группа доноров (6 человек), не иммунизированных и ранее не болевших сибирской язвой.

Рекомбинантный белок ПА *B. anthracis* получали в системе экспрессии *E. Coli* штамма BL21(DE3), трансформированные экспрессионной плазмидой pET22b(+) (Novagen, Merck, США).

В сыворотках крови доноров определяли титры антител к ПА *B. anthracis* методом твердофазного иммуноферментного анализа [5].

Учет результатов производили на спектрофотометре Smart Spec Plus (BIO-RAD, США) при длине волны 492 нм.

Из гепаринизированной крови доноров выделяли мононуклеарные клетки на градиенте плотности Histopaque-1,077 (Sigma, США) с последующей инкубацией их в 96-луночном планшете. Для рестимуляции клеток в экспериментальные лунки вносили раствор ПА (10 мкг/мл), в лунки отрицательного контроля вносили среду RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), а в лунки положительного контроля – 5 мкг/мл ConA (Sigma, США).

Для оценки пролиферативной активности лимфоцитов клетки предварительно окрашивали 6-карбоксихлорофлуоресцеином диацетатом (CFSE) в соответствии с инструкцией производителя (BD eBioscience, США).

Фенотипирование лимфоцитов проводили с использованием моноклональных антител: для выявления субпопуляций Т-клеток – CD3 PerCP, CD4 PE, CD25 APC, CD69 FITC, CD30 PE; для В-клеток – CD19-APC, CD30 PE, CD69 FITC (все производства eBioscience, США) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы анализировали на проточном цитофлюориметре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программы BD FACSDiva.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Excel 2013. Статистический анализ цитометрических данных проводили в программе BD FACS Diva (версия 8.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Определение антител к ПА

У 11 из 12 доноров, вакцинированных 10–12 месяцев назад против сибирской язвы, в сыворотках крови не были выявлены антитела к ПА (**Рис. 1**). Только у одного донора титры антител составили 1:400.

### Активация поверхностных маркеров

О количестве активированных Т- и В-лимфоцитов в ответ на добавление к ним *in vitro* ПА судили на основании выявления количества CD69-позитивных клеток (**Табл. 1**). У контрольных (невакцинированных) доноров количество CD69<sup>+</sup> или CD30<sup>+</sup> В- и Т-лимфоцитов при добавлении в среду культивирования ПА не увеличивалось. Из 12-ти доноров у 4-х было выявлено увеличение активированных В-лимфоцитов, и у 7-х – Т-лимфоцитов. Увеличение популяции активированных Т-лимфоцитов происходило

**Таблица 1.** Уровень экспрессии молекул CD69, CD30 на поверхности В- и Т-лимфоцитов после стимуляции ПА

№ донора	Условия инкубирования	Субпопуляции Т-лимфоцитов, %				Субпопуляции В-лимфоцитов, %	
		CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup> CD30 <sup>+</sup>
1	Среда	1,6	1,8	1,4	1,8	<b>6</b>	<b>3,6</b>
	ПА	2,3	2	3	2,6	<b>26,3</b>	<b>9,4</b>
2	Среда	3,3	2,4	1,3	1,3	<b>1,2</b>	<b>2,1</b>
	ПА	3,4	2,9	1,9	2,6	<b>5</b>	<b>7,1</b>
3	Среда	<b>1,7</b>	1,6	1,5	1,3	4,1	2,3
	ПА	<b>4,4</b>	2,4	1,9	1,5	5,3	2,7
4	Среда	<b>2,1</b>	1,9	<b>1,7</b>	1,2	3,2	<b>2,1</b>
	ПА	<b>7,3</b>	2,7	<b>4,8</b>	1,7	5,5	<b>4,1</b>
5	Среда	<b>3,6</b>	3,4	1	1	5,2	1,5
	ПА	<b>7,8</b>	3,7	1,5	1,5	6,7	2
6	Среда	1,1	1,9	1,4	1,9	<b>7,8</b>	5,3
	ПА	2,8	2,2	1,8	2,1	<b>14,4</b>	5,3
7	Среда	<b>2,8</b>	2,8	1,3	1	6,1	3,3
	ПА	<b>7,3</b>	3,6	1,9	1,7	7,2	5,1
8	Среда	2,1	2,2	2,2	<b>2,3</b>	7,1	5,1
	ПА	3,7	2,4	2,4	<b>12,3</b>	8,5	7,2
9	Среда	6,8	3,5	1,7	1,6	<b>8,1</b>	4
	ПА	7,2	4,5	2,3	1,9	<b>12,5</b>	5,9
10	Среда	<b>1,4</b>	2	1,6	1	2	3,9
	ПА	<b>13,2</b>	2,1	2,1	1,6	2,5	4,4
11	Среда	<b>0,7</b>	1,2	1,4	1,8	2,4	2,3
	ПА	<b>10,3</b>	1,7	2,7	2,5	2,8	2,5
12	Среда	<b>1,5</b>	1,3	<b>2,2</b>	1,2	3,9	3,2
	ПА	<b>16,2</b>	1,8	<b>5,6</b>	1,9	4,3	3,6

только за счет Т-хелперов, но не цитотоксических лимфоцитов. Сравнительный анализ количества CD69<sup>+</sup> Т- и В-лимфоцитов показал, что под влиянием ПА у всех доноров (за исключением одного № 8, вакцинированного 12 месяцев назад) происходила активация либо Т- либо В-лимфоцитов. В присутствии ПА у 3-х доноров отмечали увеличение CD30<sup>+</sup> В-лимфоцитов, у 3-х – CD30<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

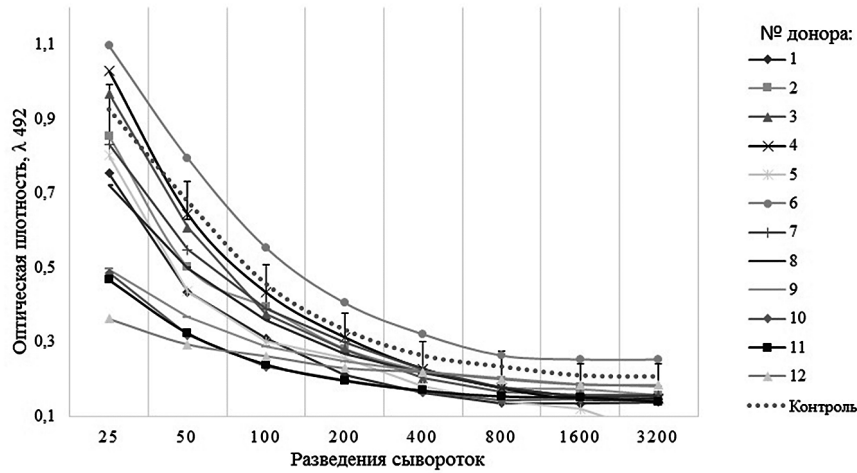
#### *Пролиферативная активность лимфоцитов*

Под влиянием ПА происходило усиление пролиферативной активности Т-лимфоцитов (у 9-ти вакцинированных доноров) и/или В-лимфоци-

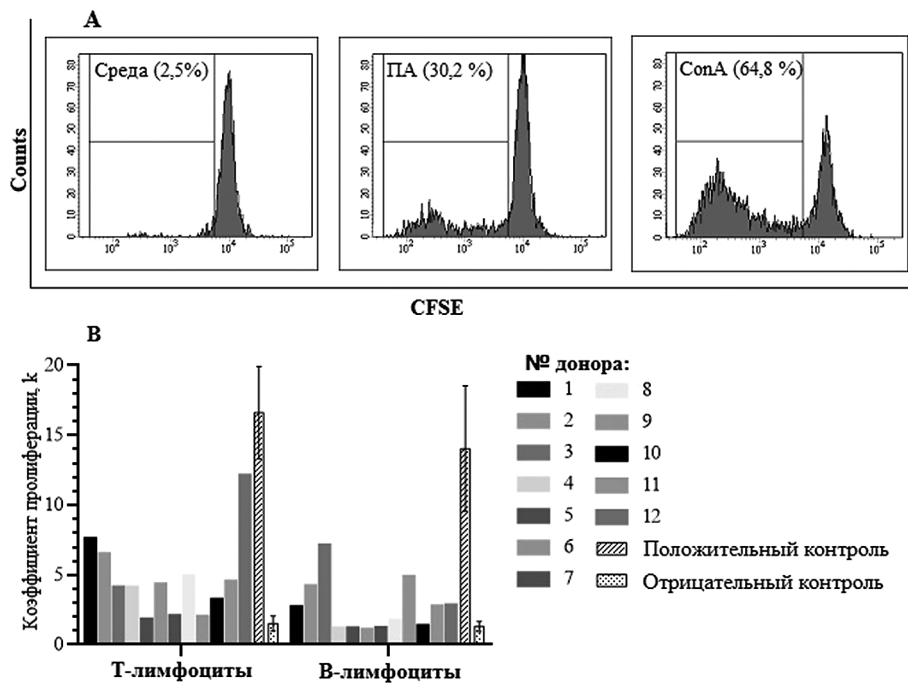
тов (у 6-ти доноров) (**Рис. 2**). Только у одного донора (№ 8) не было выявлено усиления пролиферативной активности лимфоцитов под влиянием ПА. Лимфоциты контрольной группы доноров не усиливали пролиферативную активность в ответ на добавление ПА в среду культивирования.

#### **ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты наших исследований показали, что через 10–12 месяцев после иммунизации против сибирской язвы в сыворотках крови преобладающего большинства доноров не выявляются антитела к ПА, что соответствует мно-



**Рисунок 1.** Титры антител IgG к протективному антигену в сыворотке крови доноров, через 10–12 месяцев после иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой.



**Рисунок 2.** Проллиферативная активность лимфоцитов в ответ на их активацию ПА *in vitro* у доноров, через 10–12 месяцев после иммунизации вакциной сибирезвеной живой сухой.

**Примечание:** А – пример однопараметрических цитофлюорограмм, отражающих пролиферативную активность Т-лимфоцитов донора № 12; В – коэффициент пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на их активацию ПА (По оси ординат k – соотношение количества пролиферирующих лимфоцитов, активированных ПА, к количеству пролиферирующих лимфоцитов в среде, по оси абсцисс – доноры. Положительный контроль – среднее значение k пролиферирующих лимфоцитов в присутствии ConA. Отрицательный контроль – среднее значение k пролиферирующих лимфоцитов контрольной группы в присутствии ПА).

гочисленным исследованиям, проведенным ранее [1]. В реакциях *in vitro* мы показали, что под влиянием ПА у всех вакцинированных доноров (за исключением 1 человека) происходит усиление экспрессии рецептора CD69 на поверхности Т- и В-лимфоцитов, что свидетельствует об

активации клеток. Об активации лимфоцитов свидетельствует также усиление их пролиферативной активности в присутствии ПА. У 75% вакцинированных доноров происходило усиленное деление Т-лимфоцитов, а у 50% доноров – В-лимфоцитов. Активация Т- и В-лимфоцитов



под действием ПА, по всей видимости, свидетельствует о наличии в крови специфических Т- и В- клеток памяти, способных запускать каскад иммунных реакций в ответ на взаимодействие со антигеном [6, 7].

В норме у здоровых людей CD30 молекула экспрессируется на поверхности небольшого процента Т-лимфоцитов (0–2%). CD30 рецептор является ко-стимулирующим рецептором, способствующему активации Т-клеток преимущественно по Th2 пути [8]. В наших экспериментах было выявлено усиление экспрессии CD30 молекулы на поверхности лимфоцитов у пяти доноров, что позволяет предположить о гетерогенном пути направленности иммунного ответа в общей популяции людей.

Таким образом, в отдаленные сроки после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной в крови у людей циркулируют Т- и В-лимфоциты, способные к быстрому запуску иммунных реакций. У людей, переболевших сибирской язвой, наблюдается аналогичная картина: в отдаленные сроки после инфекции в крови не обнаруживаются специфические антитела, но длительное время сохраняется Th1 клетки, способные отвечать на антигены *B. anthracis* [9].

Анализ когорты сельскохозяйственных рабочих, ранее зараженных кожной формой сибиреязвенной инфекции, показал наличие CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов памяти к антигенам *B. anthracis*. Длительные наблюдения показали, что несмотря на продолжение работы в эндемичных по сибирской язве районах, у этих людей реинфекция практически не наблюдается [10, 11].

Таким образом, несмотря на отсутствие специфических антител у людей сохраняется поствакцинальный клеточный противосибиреязвенный иммунитет, о чем свидетельствуют выявляемые в реакции *in vitro* специфические Т- и В-лимфоциты, способные быстро активироваться под влиянием ПА.

## ВЫВОДЫ

1. Через 10–12 месяцев после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной практически у всех доноров в сыворотках крови не выявляются антитела к ПА.

2. Через 10–12 месяцев после иммунизации живой сибиреязвенной вакциной практически у всех доноров в крови циркулируют Т- и/или В-лимфоциты, способные усиливать пролиферацию под влиянием ПА и/или усиливать экспрессию активационного CD69 рецептора на поверхности клеток.

3. В отдаленные сроки после вакцинации у людей сохраняется клеточный противосибиреязвенный иммунитет.

Работа выполнена в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Маринин Л. И., Дятлов И. А., Мокриевич А. Н., Бактеева И. В., Белова Е. В., Борзилов А. И., Комбарова Т. И., Кравченко Т. Б., Миронова Р. И., Попова В. М., Сомов А. Н., Титарева Г. М., Тюрин Е. А., Чекан Л. В., Шишкина О. Б., Шишкова Н. А. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. ЗАО МП «ГИГИЕНА», Москва, 2009. 304. [Marinin L. I., Dyatlov I. A., Mokrievich A. N., Bakhteeva I. V., Belova E. V., Borzilov A. I., Kombarova T. I., Kravchenko T. B., Mironova R. I., Popova V. M., Somov A. N., Titareva G. M., Tyurin E. A., Chekan L. V., Shishkina O. B., Shishkova N. A. Methods for studying the biological properties of the causative agent of anthrax. ZAO MP "HYGIENA", Moscow, 2009, 304.]
2. Dumas E. K., Gross T., Larabee J., Pate L., Cuthbertson H., Charlton S., Hallis B., Engler R., Collins L. C., Spooner C. E., Chen H., Ballard J., James J. A., Farris A. Anthrax vaccine precipitated induces edema toxin-neutralizing, edema factor-specific antibodies in human recipients. *Clin. and Vaccine Immunology*. 2017, 24 (11), e00165–17.
3. Brenneman K. E., Doganay M., Akmal A., Goldman S., Galloway D. R., Mateczun A. J., Cross A. S., Baillie L. W. The early humoral immune response to *Bacillus anthracis* toxins in patients infected with cutaneous anthrax. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011, 62 (2), 164–172.
4. Pepper M., Linehan J. L., Pagán A. J., Zell T., Dileepan T., Cleary P. P., Jenkins M. K. Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nat Immunol.* 2010, 11(1), 83–89.
5. Силкина М. В., Карцева А. С., Зенинская Н. А., Марьян М. А., Рябко А. К., Мунтян Я. О., Фирстова В. В., Шемьякин И. Г., Дятлов И. А. Анализ содержания плазмобластов в крови людей в разные сроки после иммунизации вакциной сибиреязвенной живой сухой. *Иммунология* 2019, 40 (2), 23–29. [Silkina M. V., Kartseva A. S., Zeninskaya N. A., Marin M. A., Ryabko F. K., Muntian Ya. O., Firstova V. V., Shemyakin I. G., Dyatlov I. A. Analysis of plasmoblasts in the human blood at different times after immunization with live anthrax vaccine. *Immunology* 2019, 40 (2), 23–29.]
6. Fang H., Cordoba-Rodriguez R., Lankford C. S. R., Frucht D. M. Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology* 2015, 174 (8), 4966–4971.
7. Kachura M. A., Hickie C., Kell S. A., Sathe A., Calacasan C., Kiwan R., Hall B., Milley R., Ott G., Coffman R. L., Kanzler H., Campbell J. D. A CpG-ficoll nanoparticle adjuvant for anthrax protective antigen enhances immunogenicity and provides single-immu-

- nization protection against inhaled anthrax in monkeys. *The Journal of Immunology* 2015, 196 (1), 284–297.
8. *Marín N. D., García L. F.* The role of CD30 and CD153 (CD30L) in the anti-mycobacterial immune response. *Tuberculosis* 2017, 102, 8–15.
  9. *Ascough S., Ingram R. J., Chu K. K., Reynolds C. J., Musson J. A., Doganay M., Metan G., Ozku Y., Baillie L., Sriskandan S., Moore S. J., Gallagher T. B., Dyson H., E. Williamson D., Robinson J. H., Maillere B., Boyton R. J., Altmann D. M.* Anthrax lethal factor as an immune target in humans and transgenic mice and the impact of HLA polymorphism on CD4<sup>+</sup> T cell immunity. *PLoS Pathog.* 2014, 10 (5), e1004085.
  10. *Laws T. R., Kuchuloria T., Chitadze N., Little S. F., Webster W. M., Debes A. K., Saginadze S., Tsertsvadze N., Chubinidze M., Rivard R. G., Tsanova S., Dyson E. H., H. Simpson A. J., Hepburn M. J., Trapaidze N.* A Comparison of the Adaptive Immune Response between Recovered Anthrax Patients and Individuals Receiving Three Different Anthrax Vaccines. *PLOS ONE* 2016, 11 (3), e0148713
  11. *Ingram R. J., Metan G., Maillere B., Doganay M., Ozkul Y., Kim L. U., et al.* Natural exposure to cutaneous anthrax gives long-lasting T cell immunity encompassing infection-specific epitopes. *J Immunol.* 2010, 184 (7), 3814–21.

## ESTIMATION OF IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF PEOPLE VACCINATED AGAINST ANTHRAX

© 2019 M. V. Silkina\*, A. S. Kartseva, O. V. Kalmantaeva, M. M. Rogozin,  
V. V. Firstova, I. G. Shemyakin

\*E-mail: marksil@yandex.ru

*Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology»  
of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare,  
Obolensk, Russia*

**Received:** 21.05.2019. **Accepted:** 29.06.2019

Vaccine prevention of anthrax in Russia is carried out according to epidemiological indications 1 time per year with the use of live anthrax vaccine. The main problem is the lack of a method to control the immunological efficacy of vaccination. The article presents data that analyzes the anthrax human humoral and cellular immunity among donors vaccinated 10–12 months ago with live anthrax vaccine. It was shown that in the blood serum of the most vaccinated donors did not detect antibodies to the protective antigen (PA). However, in all vaccinated patients (with the exception of one donor) T and B lymphocytes circulated in the blood enhanced proliferative activity and the expression of activation receptors on their cell surface in response to PA *in vitro*. The obtained data suggested that predominantly specific cellular immunity is persisted in the long-term after vaccination against anthrax.

*Key words:* *B. anthracis*, antibodies, CD69, CD30, lymphocytes, proliferation, protective antigen, vaccine

### Authors:

**Silkina M. V.**, ☒ junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia. Phone: +74967312084, **E-mail:** marksil@yandex.ru;

**Kartseva A. S.**, junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Kalmantaeva O. V.**, Ph.D., researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Rogozin M. M.**, junior researcher, Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Firstova V. V.**, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher of the Laboratory of molecular biology, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia;

**Shemyakin I. G.**, Doctor of Biological Sciences, professor, deputy director for Research, Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology» of Federal Service of Consumer Right Surveillance & Human Welfare, Ministry of Health & Welfare, Obolensk, Russia.