

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**АНАЛИЗ АНТИТЕЛ ЛЮДЕЙ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЖИВОЙ
ЧУМНОЙ ВАКЦИНОЙ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы
Направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Пенсковой Екатерины Борисовны

Научный руководитель
доцент кафедры микробиологии
и физиологии растений, к. б. н, _____ О.Ю.Ксенофонтова

Зав.кафедрой микробиологии
и физиологии растений, д.б.н., профессор _____ С. А. Степанов

Саратов 2017

Актуальность темы. Среди бактериальных инфекций наиболее опасной является чума, оставившая глубокий след в истории человечества. Три ее пандемии унесли жизни около 200 млн. человек. В прошлом эпидемии чумы нередко приводили к падению государств и разрушению древних цивилизаций. В отдельных странах погибало до 90% населения. В настоящее время данная инфекция постоянно остается в поле зрения органов здравоохранения. Существование на территориях нашей страны и многих государств мира очагов чумы, где возбудитель циркулирует среди грызунов, обуславливает потенциальную угрозу эпидемических осложнений. Использование современных транспортных средств может способствовать заносу инфекции на расстояния, в том числе и в районы, где нет достаточной настороженности медицинской службы в отношении этого заболевания. Кроме того, войны и другие социальные и экологические катастрофы по-прежнему могут угрожать взрывами чумных эпидемий. На протяжении более 40 лет заболеваний человека чумой на территории России не регистрировалось. Однако в последние годы (2015-2016 гг.) имели место единичные случаи заболеваний человека чумой в Горном Алтае. Все это создает напряженную обстановку по чуме и необходимость проведения противоэпидемических и профилактических мероприятий.

В России для специфической профилактики чумы применяется живая сухая чумная вакцина ЕВ НИИЭГ отечественного производства (ЖЧВ), имеющая государственную регистрацию и вызывающая развитие иммунитета длительностью до года.

При ряде инфекционных заболеваний (корь, столбняк, дифтерия, полиомиелит, гепатит В и др.) определены так называемые защитные титры, то есть минимальное содержание в крови антител, обеспечивающих защиту от инфекции, детекцию которых осуществляют сертифицированными тест-системами, зарегистрированными для практического применения [1, 2]. Однако в настоящее время отсутствуют утвержденные стандарты для оценки

уровня противочумного иммунитета у людей.

Несмотря на то, что основную роль при формировании иммунитета при чуме играет клеточное звено [3, 4], косвенную оценку эффективности вакцинации чумной вакциной осуществляют путем определения поствакцинальных титров антител [5, 6].

Для обнаружения антител к возбудителю чумы используют РНГА с антигенным эритроцитарным диагностикумом, а также РНАг с иммуноглобулиновым диагностикумом производства Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева (Казахстан), ИФА с применением иммуноферментной тест-системы для выявления антител к антигену F1 чумного микроба «ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) [7]. Современные антигенные чумные диагностикумы направлены, как правило, на выявление в сыворотке крови антител к одному видоспецифическому антигену F1 чумного микроба. В то же время, известно, что при иммунизации животных *Y. pestis* образуются антитела к порядку 50 белкам чумного микроба. Отмеченные выше особенности послужили основанием к расширению спектра диагностических антигенов чумного микроба для конструирования диагностических тест-систем.

Цели и задачи. В связи с этим целью настоящей работы было: определить эффективность применения иммуноферментного анализа для оценки гуморального иммунитета у людей вакцинированных живой чумной вакциной.

Для достижения указанной цели были определены следующие задачи:

1. Определение титра антител к антигену F1.
2. Отследить динамика антителообразования.
3. Определение антител к соматическим антигенам *Y. pestis* и видоспецифическому ферменту – фибринолизину

Материалы и методы исследования. Работа проводилась на базе

лаборатории диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора(г.Саратов).

В работе использовали 15 образцов сывороток крови людей вакцинированных живой чумной вакциной производства ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора со сроками вакцинации от 1 месяца до 4 лет и трех сывороток людей, не вакцинированных живой чумной вакциной (контрольная группа).

Кровь, собранную из локтевой вены в объеме 1-5 мл в стерильную пробирку, переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл. Для отделения сыворотки пробирки центрифугировали в течение 10-15 мин при 3000 оборотов в минуту. Образовавшуюся сыворотку аккуратно отбирали пипеткой, не допуская попадания эритроцитов и инактивировали при температуре $(56,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ в течение (30 ± 1) мин.

Препараты водорастворимых антигенов *Y. pestis* (капсульный антиген F1 серия 44, ЛПС, основной соматический антиген (ОСА) серия 32Б, фибринолизин серия 10) любезно предоставлены канд мед. наук М.Н. Киреевым (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора). Выявление специфических антител к антигену F1 *Y.pestis* в клиническом материале осуществляли методом непрямого ИФА с использованием тест-системы иммуноферментной для выявления антител к чумному микробу (ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*) (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией по применению тест-системы и общепринятой методикой [8].

Инкубацию планшетов с исследуемым материалом проводили в течение (60 ± 5) мин при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в термостате с последующей трехкратной промывкой лунок планшета ФСБ для удаления несвязавшихся антител. Для выявления специфических комплексов «антиген-антитело» использовали конъюгат белка А с пероксидазой хрена. Инкубацию с конъюгатом осуществляли в течение (60 ± 5) мин при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

После шестикратной промывки лунок планшета ФСБ от несвязавшегося конъюгата вносили субстратную смесь на основе цитратно-фосфатного буфера, содержащую 0,02% гидроперита, 223 мкг/мл АВТS. Инкубацию проводили в течение 30 мин на шейкере при температуре (20 ± 2) °С. Результат учитывали спектрофотометрически с использованием фотометра автоматического микропланшетного Multiskan EX по оптической плотности при длине волны 405 нм. Пробу считали положительной, если значение ее оптической плотности было более чем в 2 раза больше, чем значение оптической плотности отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля в реакции использовался сыворотку крови человека, не содержащей антитела к антигену F1 *Y.pestis*.

Структура и объем работы.

Работа изложена на 47 страницах, включает в себя введение , 3 главы, заключение , выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 5 рисунками. Список использованных источников 55 наименований .

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об современных представлениях об иммунопрофилактике инфекционных болезней.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные об эффективности вакцинопрофилактике .

В результате проведенного анализа уровни антител к антигену F1 *Y. pestis* в сыворотках крови вакцинированных людей через месяц после иммунизации ЖЧВ составили 1:5120, через 4 мес. после вакцинации – на уровне диагностического титра 1:320, через 6 мес. – колебались от 1:160 до 1:640, через 18 мес. от 1:160 до 1:640, через 4 года и в контрольной группе невакцинированных людей наблюдались антитела в титре ниже диагностического – 1:40-1:80.

Вторым важным моментом является то, что через 1 месяц после вакцинации антитела выявлены не у всех вакцинированных. Это согласуется с данными о том, что процент положительной сероконверсии у лиц, вакцинированных ЖЧВ, не достигает 100% и варьирует в пределах от 35% до 80% [9-13], поэтому серологическая оценка иммунологической эффективности по наличию антител только к одному F1 антигену не отражает в полной мере истинный уровень иммунобиологической перестройки организма в ответ на введение ЖЧВ и функциональную активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета.

На втором этапе работы исследованы четыре сыворотки (№ 3, 14, 19, 23). Для определения специфических антител к антигенам *Y. pestis* в лунки 96-луночного планшетов сорбировали препараты антигенов фракции 1 (F1), липополисахарида (ЛПС), основного соматического антигена (ОСА), фибринолизина в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 18 ч при температуре 4 °С. Свободные сайты связывания блокировали 0,5% раствором лактальбумина в фосфатно-солевом буфере с 0,5% твин-20 (ФСБ-Т). Лунки после инкубации отмывали троекратно ФСБ. Дальнейшие этапы анализа проводили в соответствии с п. 2.7

Результаты анализа представлены в таблице 2 и на рисунке 5. В результате работы установлено, что у вакцинированных людей в сыворотке крови, кроме антител к антигену к F1 чумного микроба присутствуют антитела к ЛПС в титре 1:20-1:160, к ОСА – 1:20-1:80, к фибринолизину – 1:40-1:160. Показано, что титр антител к указанным антигенам был в среднем ниже в 4-8 раз титра антител к антигену F1. Это может объясняться экранированием поверхностного капсульного антигена F1 других иммунодоминантных антигенов чумного микроба при антителообразовании [14, 15]. Полученные результаты подтверждают данные о высокой иммуногенности капсульного антигена F1 чумного микроба [16], но не исключают осуществления оценки сероконверсии к чуме у людей с

ложноотрицательными ответами по данным ИФА с F1 с помощью панели специфических антигенов чумного микроба.

Выводы

1. Установлено, что в сыворотках крови вакцинированных людей через месяц после иммунизации ЖЧВ титр антител составил 1:5120, через 4 мес. после вакцинации – 1:320, через 6 мес. – от 1:160 до 1:640, через 18 мес. - от 1:160 до 1:640, через 4 года и в контрольной группе невакцинированных людей наблюдались антитела в титре 1:40-1:80. Наличие неспецифических реакций у невакцинированных людей связано с перекрестными реакциями антител к F1 антигену чумного микроба с антигенами других микроорганизмов, в частности энтеробактерий
2. В результате работы установлено, что у вакцинированных людей в сыворотке крови, кроме антител к антигену к F1 чумного микроба присутствуют антитела к ЛПС в титре 1:20-1:160, к ОСА – 1:20-1:80, к фибринолизину – 1:40-1:160. Полученные результаты подтверждают данные о высокой иммуногенности капсульного антигена F1 чумного микроба [32], но не исключают осуществления оценки сероконверсии к чуме у людей с помощью указанных антигенов

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Медуницын, Н.В. Вакцинология/ Н.В. Медуницын. Издание третье, переработанное и дополненное. – М.: Триада-Х, 2010. – 512 с.
2. МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В): Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 19 с.
3. Наумов, А.В. Иммунология чумы / А.В. Наумов, М.Ю. Ледванов, И.Г. Дроздов. - Саратов, 1992. - 172 с.
4. Philipovskiyy, A.V. Vaccination with Live *Yersinia pestis* Primes CD4 and CD8 T Cells That Synergistically Protect against Lethal Pulmonary *Y. pestis* Infection / A.V. Philipovskiyy, S.T. Smiley //Infection and Immunity. - 2007. - V. 75, N. 2. - P. 878–885.
5. Plotkin, S.A. Correlates of Protection Induced by Vaccination / S.A. Plotkin // Clinical and Vaccine Immunology. — 2010. — V. 17, N 7. — P. 1055–1065.
6. Williamson, E.D. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine / E.D. Williamson, P.C. Oyston // Clin. Exp. Immunol. – 2013. – N 172 (1). – P. 1-8.
7. Девдариани, З.Л. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*) [Текст] /З.Л. Девдариани, Н.Е. Терешкина, Т.М. Тараненко [и др.] //Проблемы особо опасных инфекций. -2013. -Вып. 1. - С. 74-77.
8. Д.Дасгупты Искусственные иммунные системы и их применение. /Под ред. Д.Дасгупты. Перевод с англ. яз. – М.: Изд-во «Физматлит», 2006.

9. Долгушин, И.И. Иммунопрофилактика инфекционных заболеваний /И.И. Долгушин, О.А. Гизингер, С.В. Лучинина // Челябинск, 2014. – 112 с.

10. 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. 1993: 175 с

11. Хаитов Р.М. Иммунология. Норма и патология./ Р.М.Хаитов, Г.А.Игнатьева , И.Г.Сидорович . Учебник. – 3-е изд., М., Медицина, 2010. – 752 с

12. Ковальчук Л.В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. / Л.В.Ковальчук, Л.В Ганковская , Р.Я.Мешкова ,Учебник. Гэотар-Медиа, 2011. 640 с.

13. Д. Мейл, Иммунология / Дж. Бростофф, Д. Б. А.Рот, Ройтт
Издательство: Логосфера, 2007 г. – 568 стр

14. Бурместер, А Наглядная иммунология / .Т.Пецутто, А,Улрихс , Айхер Color Atlas of Immunology. Издательство: Бином. Лаборатория знаний, 2009 г. - 320 стр.

15. Л. П. Титов Иммунология / Терминологический словарь.
Издательство: Медицинское информационное агентство, 2008 г. - 512 стр.

16. Никифоров В.В ,Чума / В.В.Никифоров, М.Г. Авдеева, Х.А. Намитоков Учебно-методическое пособие, Москва-Краснодар-Майкоп, 2015.