

На правах рукописи

КОСТЮЧЕНКО МАРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО
АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКОГО *IN VITRO* ТЕСТА ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ БРУЦЕЛЛЕЗА И ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО
ИММУНИТЕТА**

3.2.7. – Иммунология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Ставрополь – 2026

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Пономаренко Дмитрий Григорьевич – кандидат биологических наук, заместитель директора по противоэпидемической и оперативной работе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Официальные оппоненты:

Фирстова Виктория Валерьевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Сизякина Людмила Петровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической иммунологии и аллергологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Защита диссертации состоится «05» июня 2026 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

д.б.н.,

Ермолаева С.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Бруцеллез остается глобальной проблемой общественного здравоохранения в мире. За последние несколько десятилетий география распространения бруцеллезной инфекции в мире постоянно расширялась [Пономаренко Д.Г. и др., 2025]. Многообразие симптоматики клинического течения бруцеллеза с учетом неблагоприятия современной эпидемиологической ситуации и распространенности в мире актуализирует проблему совершенствования методов для диагностики и верификации бруцеллезной инфекции [Manturl, V. G., 2007; Нурпейсова А. Х., 2016; Zheng R., 2018; Qie C., 2020].

Для оценки напряженности противобруцеллезного иммунитета на современном этапе в соответствии с нормативно-методическими документами применяются иммунологические реакции, направленные на детекцию специфических антител – такие как реакция агглютинации (реакции Хеддельсона/Райта) и иммуноферментный анализ. Очевидна необходимость совершенствования нормативно-методических документов, регулирующих оценку иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза, а также анализа характера поствакцинальных иммунологических изменений, основанных на исследовании факторов специфического клеточного иммунитета.

Учитывая ведущую роль клеточного иммунитета в формировании иммунологической защиты от бруцеллеза, оценку клеточной реакции в ответ на антигенную стимуляцию можно считать наиболее информативным и объективным подходом при анализе иммунологической перестройки организма при вакцинации и для диагностики инфекции [Вершилова П. А., 1974; Кулаков Ю. К. 2016; Wang Y. 2024].

К одному из наиболее перспективных направлений научных исследований можно отнести разработку антигенспецифических методов оценки напряженности клеточного противобруцеллезного иммунитета для осуществления иммунологического скрининга и индивидуального подхода при определении показаний к вакцинации/ревакцинации.

В последние годы для анализа состояния специфического клеточного иммунитета все более широкое применение находят антигенстимулированные клеточные тесты *in vitro*. Эти методы активно разрабатывались и применялись различными исследователями, среди которых можно выделить Дубровину В.И. (2015), Фирстову В.В. (2015), Дерябина Н.П. (2016), Гостищеву С.Е. (2017), Бычкову Н.В. (2022), Васильеву О.О. (2023), Булыгина А.С. (2023), Талаева В.Ю (2024), Черепович Б.С. (2025) и др. Их работы способствовали внедрению современных технологий в практику иммунодиагностики и оценки поствакцинальных реакций. Несмотря на имеющиеся разработки, современные методические подходы пока не адаптированы для целенаправленного выявления иммунологических

маркеров и объективной оценки специфического клеточного иммунного ответа при бруцеллезе.

Разработка высокоинформативных методов антиген-индуцированной клеточной диагностики *in vitro*, отличающихся высокой информативностью, предполагает тщательный подбор и обоснование выбора стимулирующего агента, обладающего выраженным активирующим эффектом и обеспечивающего высокую специфичность иммунного ответа в условиях экспериментального анализа. Кроме того, до проведения нами исследований отсутствовал коммерчески доступный бруцеллезный антиген, предназначенный для использования в клеточных тестах *in vitro*.

Учитывая вышеизложенное, весьма актуальными и востребованными являются разработка и внедрение в практику новых методических подходов к оценке специфического иммунитета к возбудителю бруцеллеза, основанных на антигенспецифических клеточных тестах *in vitro* с использованием современного высокоточного аналитического оборудования, позволяющих проводить исследование активности Т-лимфоцитов в отношении возбудителя бруцеллеза.

Цель исследования: оценить возможность и перспективу применения цитометрического анализа и реакции антигенспецифической активации Т-лимфоцитов *in vitro* для выявления диагностических маркеров инфекционного и вакцинного иммунологических процессов при бруцеллезе.

Задачи исследования:

1. Получить и стандартизировать антигенный бруцеллезный полисахаридно-белковый комплекс (АБПК) для использования в клеточных тестах *in vitro*.

2. Оптимизировать методику клеточного антигенспецифического теста на основе АБПК и определить его информативность для диагностики бруцеллеза.

3. Изучить особенности антиген-индуцированной активации Т-лимфоцитов при острой инфекции и в условиях повторного инфицирования в экспериментальной модели, а также выявить корреляции между Т-клеточной реактивностью, фагоцитарной активностью и системными маркерами воспаления.

4. Провести *in vitro*-анализ особенностей антиген-индуцированной экспрессии активационных маркеров на Т-лимфоцитах периферической крови больных с различными формами бруцеллеза.

5. Исследовать особенности формирования протективного иммунного ответа при бруцеллезе на основе анализа антигенспецифической реактивности Т-клеток и установить прогностический критерий иммунологической защиты среди маркеров их активации.

6. Разработать методический подход для ранней оценки эффективности противобруцеллезной вакцинации на основе *ex vivo* анализа антигенреактивности Т-лимфоцитов.

Научная новизна

Впервые получен бруцеллезный полисахаридно-белковый антигенный комплекс, обладающий способностью специфически активировать Т-лимфоциты *in vitro* (патент RU 2708561), и дана его комплексная биологическая и физико-химическая характеристика. Установлено, что для запуска эффективной активации Т-клеточных рецепторов *ex vivo* (экспрессия маркеров на CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитах) необходим комплекс антигенов, содержащий везикулы/белки внешней мембраны (OMP, OMV) с преобладанием субфракции 25-33 кДа.

Разработан методологический подход для оценки антигенспецифической Т-клеточной реактивности *in vitro*, позволяющий выявлять диагностически значимые иммунологические маркеры. Показано, что анализ динамики антигенреактивности Т-лимфоцитов позволяет оценивать интенсивность иммуновоспалительных реакций. Выявлено, что максимальные показатели активации Т-лимфоцитов (фенотипы CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺; Me КС 45–60 %) характерны для острой формы бруцеллеза и тяжелого рецидива хронической формы. Установлена корреляция между динамикой и функциональным состоянием лейкоцитов, цитокинов и пулом антигенреактивных Т-клеток.

Впервые доказана взаимосвязь между интенсивностью активации CD3⁺ Т-клеток *in vitro* и степенью поствакцинального иммунного ответа ($r = -0,841-0,966$; $R^2 = 0,708-0,969$) после иммунизации вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19ВА. Установлено, что у биомоделей коэффициент стимуляции Т-лимфоцитов ≥ 50 % (по экспрессии CD25⁺) обеспечивает 100 % защиту от заражения штаммом *B. melitensis* 16 М (патент RU 2806161). Продемонстрирована возможность оценки формирования Т-клеточного иммунного ответа у человека уже на 14-е сутки после вакцинации (патент RU 2714136).

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость заключается в расширении представлений об антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов при бруцеллезе. Впервые показана возможность применения методологии *ex vivo* для оценки антигензависимой активации Т-клеток и выявления Т-клеточной иммунопревалентности. Разработана и стандартизирована методика клеточного антигенспецифического теста для верификации инфекции и оценки уровня специфического клеточного иммунитета.

Установлена высокая диагностическая информативность теста: специфичность – 93,7 %, чувствительность при остром бруцеллезе – 95,3 %, при хроническом – 91,7 %, диагностическая точность – 93,8 %. У вакцинированных живой вакциной (*B. abortus* 19ВА) через 30 дней после иммунизации во всех случаях (100 %) зарегистрирован положительный результат теста.

Разработан алгоритм применения клеточного теста *in vitro* для иммунодиагностики бруцеллеза у человека и предложен прогностический

маркер, позволяющий оценивать степень защищенности организма от инфекции. Сформирован комплекс иммунологических критериев, отражающих напряженность клеточного иммунитета; подтверждена роль CD8⁺ Т-лимфоцитов при хроническом течении инфекции. Предложенные показатели могут использоваться для оценки иммунобиологических характеристик антигенов и вакцинных штаммов, а также как лабораторные маркеры диагностики и выявления специфического иммунного ответа у привитых.

Практическая значимость подтверждена внедрением полученного антигенного комплекса, алгоритма постановки и учета антигенспецифического клеточного теста *in vitro* с использованием проточной цитофлуориметрии в работу Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (акты внедрения от 13.01.2020, 01.06.2020, 01.02.2024).

Практическая значимость подтверждена следующими нормативными и методическими документами федерального уровня:

1. Методические рекомендации МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей».

2. Методические указания МУ 3.1/4.2.4145-25 «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика бруцеллеза и геномный мониторинг бруцелл».

3. Три патента на изобретения: № 2806161 от 26.10.2023 «Способ оценки протективного иммунитета к возбудителю бруцеллеза»; № 2708561 от 09.12.2019 «Способ получения бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro*»; № 2714136 от 29.03.2019 «Способ оценки фактической привитости людей против бруцеллеза на ранних сроках после вакцинации».

Положения, выносимые на защиту:

1. Сконструированный бруцеллезный антигенный полисахаридно-белковый комплекс обеспечивает специфическую стимуляцию Т-лимфоцитов с экспрессией маркерных молекул – молекул активации (CD69, CD25, CD95, МНС-II и др.), уровень которых можно использовать как критерий для оценки интенсивности иммуновоспалительных реакций или Т-клеточной анергии при бруцеллезе.

2. Разработанный клеточный антигенспецифический тест *in vitro* позволяет выявлять у людей диагностические маркеры бруцеллезной инфекции, обладает высокой диагностической точностью, специфичностью и чувствительностью.

3. Результат анализа уровня антигенспецифической активации Т-лимфоцитов в клеточном антигенспецифическом тесте может использоваться в качестве критерия количественной оценки иммунологической эффективности вакцинации людей (фактической привитости) на ранних сроках после вакцинации.

Личный вклад автора

Автором выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, спланированы и организованы все исследования. Лично проведен сравнительный анализ специфичности и антигенной активности серий бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса *in vitro*, определена оптимальная концентрация антигена для стимуляции Т-лимфоцитов. Изучена антиген-индуцированная экспрессия маркеров активации Т-лимфоцитов у больных острыми и хроническими формами бруцеллеза, оценена эффективность вакцинации у лиц групп риска на ранних сроках (с 14-х суток). На модели мышей исследована динамика Т-клеточной активации при первичной и повторной инфекции, определен протективный потенциал иммунного ответа, проведен статистический анализ. Отдельные этапы работы выполнены совместно с сотрудниками ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора: получение антигенного комплекса – с к.б.н. Курчевой С.А. (зав. лабораторией научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций); разработка методики теста – с к.м.н. Ракитиной Е.Л. (врач клинической лабораторной диагностики лаборатории бруцеллеза); изучение корреляции цитологических показателей – с к.б.н. Логвиненко О.В. (зав. сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза). Исследования проводились под руководством к.б.н. Пономаренко Д.Г. (зав. лабораторией бруцеллеза).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена применением аттестованного оборудования, стандартизированных методик и корректной статистической обработкой данных с использованием общепринятых методов анализа.

Исследования выполнены в рамках плановых НИР отраслевой программы Роспотребнадзора: «Совершенствование лабораторных методов диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллёза» (регистрационный номер АААА-А17-117112220025-4, 2017–2019 гг.); «Факторы системного воспаления и гемостаза при бруцеллезной инфекции. Совершенствование иммунологических методов лабораторной диагностики» (регистрационный номер 121040200152-0, 2021–2024 гг.).

Материалы диссертации апробированы на 14 всероссийских и международных научно-практических конференциях, включая: V Всероссийскую конференцию «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2024); Всероссийскую конференцию «Инновационные решения актуальных вопросов биологической и токсикологической безопасности» (Казань, 2023); юбилейную конференцию, посвящённую 100-летию ФБУН ННИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной (Нижний Новгород, 2019); ежегодные конференции молодых учёных Роспотребнадзора (2013–2024 гг.).

Окончательная апробация диссертации проведена 25 декабря 2024 г. на межлабораторной конференции ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (Протокол № 2 от 25.12.2024).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения и основные результаты, представленные в диссертационной работе, соответствуют пунктам 6 и 9 паспорта специальности 3.2.7 – «Иммунология».

Публикации

По результатам выполненных исследований опубликовано 37 научных работ, включая 4 статьи, размещенные в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. 33 публикации представлены в сборниках научных трудов, а также в материалах всероссийских и международных научных и научно-практических конференций. В соавторстве получено 3 патента Российской Федерации на изобретение. Разработаны и внедрены в практическую деятельность 1 методические указания федерального уровня внедрения и 2 методических рекомендаций, в т.ч. 1 – федерального и 1 – учрежденческого уровня внедрения.

Структура и объем работы

Работа выполнена в соответствии с общепринятой структурой диссертационного исследования и состоит из введения, обзора литературы, четырёх глав, посвящённых собственным исследованиям (включающих разделы по материалам и методам, а также по результатам), заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованных источников. Библиографический список включает 295 наименований, из которых 94 – отечественные и 201 – зарубежные публикации. Текст диссертации изложен на 197 страницах машинописного текста и сопровождается 25 таблицами и 34 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные модели. В качестве биомodelей для экспериментальных исследований использовали 650 аутбредных белых мышей линии SHK, предоставленных филиалом «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, МО (Московская область).

Клинический материал. Исследования проведены на биологическом материале от 548 добровольцев, разделённых на три группы: основную – пациенты с верифицированным диагнозом «бруцеллез», находившиеся на лечении в инфекционном отделении специализированного профиля МБУЗ «2-я Городская клиническая больница» г. Ставрополя; группу вакцинированных – лица, получившие противобруцеллёзную вакцину на основе штамма *Brucella abortus* 19 VA (НПО «Микроген», Россия) по эпидемическим показаниям; и контрольную группу – лица без анамнестических данных о перенесённом бруцеллезе, не иммунизированные и не контактировавшие с возбудителем.

Обследование проводилось в период с 2016 по 2025 год. Все участники исследования дали письменное информированное согласие в соответствии с Федеральным законом Российской Федерации № 323-ФЗ от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» с последующими изменениями (ред. от 03.08.2018). Обезвреживание биоматериала от лиц, инфицированных бруцеллой, осуществлялось в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Штаммы. Для заражения лабораторных животных применялись следующие штаммы: *Brucella melitensis* 16М; *Brucella melitensis* С-565; *Brucella abortus* 544. Вакцинация проводилась живой противобруцеллезной вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19 ВА (НПО «Микроген», Россия). Животным контрольной группы вводили стерильный раствор натрия хлорида объемом 0,1 мл. Выделение культур проводили на средах Бруцеллагар/бульон (37 °С, 14 суток).

Метод оценки антигенспецифической активации Т-лимфоцитов. Оценивали *in vitro* с использованием полисахаридно-белкового комплекса *B. abortus* 19 ВА (патент РФ № 2708561, МР 3.1.0207-20). Кровь инкубировали с антигеном (24 ч, 37 °С). Иммунокомпетентные клетки окрашивали моноклональными антителами к поверхностным антигенам клеток крови человека и мышей: CD69, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD178 (Beckman Coulter), мечеными флюорохромами FITC, PE (Beckman Coulter) и применялись согласно рекомендациям производителя. Анализ проводили на проточных цитофлуориметрах FACS Calibur и FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro и BD Diva 6.0 соответственно. Рассчитывали коэффициент стимуляции (КС): КС \geq 50% считали положительной реакцией.

Цитоинзимохимические исследования. Проводили постановку НСТ-теста, определяли активность миелопероксидазы, содержание лизосомальных катионных белков, активность сукцинатдегидрогеназы, активность кислой фосфатазы. Рассчитывали лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ).

Определение цитокинового профиля и иммуносерологические методы. Цитокины (TNF- α , IL-6, IL-10, прокальцитонин) в сыворотке биомоделей оценивали методом ИФА (Cloud-Clone Corp). Антитела к *Brucella* у людей определяли реакциями Хеддельсона, Райта с использованием Бруцеллезного диагностикума РУ ФСР2008/03141 (СтавНИПЧИ, Россия) и ИФА (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Методы оценки инфицированности. У лабораторных животных определяли индекс инфицированности и индекс интенсивности обсеменения внутренних органов, средний геометрический титр специфических антител.

Методы статистической обработки данных. Обработка и анализ полученных результатов осуществлялись с применением программного пакета Microsoft Excel 2016. Для количественной оценки параметров рассчитывали: среднее значение (\bar{X}); медиану (Me); доверительный

интервал ($\min \div \max$). Для изучения взаимосвязи между исследуемыми показателями применяли коэффициент линейной корреляции Пирсона (r). Степень связи интерпретировали по шкале Чеддока. Дополнительно использовалась классификация Е. П. Голубкова. Статистическую значимость различий считали подтвержденной при уровне $p \leq 0,05$. Также проводили регрессионный анализ (R^2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки антигенреактивности Т-лимфоцитов при бруцеллезе

С целью предварительной оценки наличия принципиальной возможности применения современных методов проточной цитофлуориметрии и *in vitro* специфической активации Т-лимфоцитов антигеном, были проведены исследования с использованием клинического материала от 36 больных с лабораторно подтвержденным острым бруцеллезом. Анализ значения экспрессии CD3 клетками CD25, HLA-DR, маркера индукции апоптоза и его лиганда – CD 95 и CD 95L (CD178) показал, что у 97,2 % обследуемых с острым бруцеллезом было выявлено увеличение не менее чем на 10 % интенсивности экспонирования хотя бы одного из изученных рецепторов активации. Средние значения КС варьировали от 26,61 % до 45,18 %.

Для специфической *in vitro* активации лимфоцитов использовали аллерген бруцеллезный «Бруцеллин». Экспериментальные исследования с использованием биомоделей указали на недостаточную специфическую активность бруцеллина в отношении активации Т-лимфоцитов. При анализе маркеров активации лимфоцитов в динамике (7, 14, 21 и 30-е сутки) после иммунизации мышей штаммом *Brucella abortus* 19 ВА не выявлено статистически значимого повышения экспрессии молекул CD69, CD25, CD95 и МНС-II при специфической стимуляции бруцеллином *in vitro*.

Изучение антигенного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса для использования в клеточных тестах *in vitro*

В ходе исследований было отобрано три серии бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса, полученных из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА (АБПК), из которых был выбран АБПК с наиболее гетерогенным составом. При использовании оптимизированной методики и разработанного АБПК доля пула лимфоцитов, экспрессирующих активационные молекулы при стимуляции составила в среднем CD3⁺CD69⁺ 25,20±2,65% (КС_{mean} – 57,46 %), CD3⁺CD25⁺ 8,32±1,00 % (КС_{mean} – 72,12 %), CD3⁺CD95⁺ 17,14±1,95 % (КС_{mean} – 48,42 %) и CD3⁺МНС-II⁺ 18,99±4,08% (КС_{mean} – 35,70 %) у биомоделей, иммунных к бруцеллам.

Для оценки лабораторно-клинической ценности КАСТ-теста были проведены исследования по изучению его диагностической точности на основе критериев диагностической специфичности и чувствительности.

Опираясь на полученные данные, предложенный методический подход КАСТ обладает специфичностью – 93,7 %, чувствительностью для диагностики острого бруцеллеза – 95,3 %, для диагностики хронического бруцеллеза – 91,7 %. Показатель диагностической точности составил 93,8 %. При обследовании 62 человек, вакцинированных против бруцеллеза живой бруцеллезной вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19ВА, у всех участников исследования (100 % обследованных) был зарегистрирован положительный результат КАСТ-теста на 30-е сутки после вакцинации, что указывает на развитие специфической Т-клеточной реактивности к антигенам бруцелл.

Диагностическая точность клеточного антигенспецифического теста

Проведенный сравнительный анализ интенсивности экспрессии мембранных маркеров активации (CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD71⁺) Т-лимфоцитов у пациентов с острой формой бруцеллеза при стимулировании гетерогенными бактериальными антигенами – антраксин, тулярин, туберкулин, не выявил неспецифической активации Т-лимфоцитов *in vitro*. Что указывает на наличие четко выраженной антигенспецифической реактивности клеточного иммунитета у данной категории больных. Только при использовании в качестве антигена АБПК имела место специфическая активация Т-лимфоцитов *in vitro* со средним значением коэффициента стимуляции, превышающим 50 % (таблица 1).

Таблица 1 – Значения маркеров активации лимфоцитов в крови больных острым бруцеллезом при стимуляции клеток различными бактериальными антигенами *ex vivo*

Маркеры активации \ Антигены	Интенсивность антигениндуцированной экспрессии CD3-лимфоцитами маркеров активации, %				
	NaCl (0,9%) (контроль)	Антраксин	Тулярин	Туберкулин	АБПК
CD69	8,97 ± 1,12	11,33 ± 1,53	10,41 ± 1,58	9,96 ± 1,23	19,54 ± 1,58*
CD25	7,58 ± 0,62	9,92 ± 1,69	8,65 ± 1,81	7,92 ± 0,87	16,21 ± 0,96*
CD71	6,12 ± 1,57	7,05 ± 1,24	6,98 ± 0,51	6,35 ± 1,58	12,71 ± 1,45*

* – в сравнении с контролем разница значений статистически значима при $p \leq 0,05$

Таким образом, исследования показали, что полученный антигенный белково-полисахаридный комплекс на основе вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА может быть использован в качестве стимулирующего компонента клеточного антигенспецифического теста для диагностики бруцеллеза и исследования специфического иммунитета.

Анализ активации Т-лимфоцитов в динамике развития острой бруцеллезной инфекции

Впервые на экспериментальной модели острой генерализованной бруцеллезной инфекции (белые мыши, инфицированные *Brucella melitensis*

16М, 10⁶ ж.м.к.) прослежена динамика антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов при стимуляции *ex vivo* бруцеллезным полисахаридно-белковым комплексом.

Показано, что специфическая активация CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов, оцениваемая по экспрессии активационных маркеров CD25, CD69, CD71 и CD95, развивается поэтапно: на 7-е сутки после заражения наблюдается начало иммунного ответа, к 14-м суткам формируется пик антигенреактивности – что соответствует общим закономерностям острого инфекционного бруцеллезного процесса (коэффициент стимуляции составляет 56,8 % для CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и 48,6 % для CD3⁺CD8⁺CD25⁺), а на 21–30-е сутки происходит «смещение» иммунного ответа в сторону цитотоксической направленности с доминированием CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, о чем свидетельствует рост коэффициента стимуляции CD3⁺CD8⁺CD25⁺ до 58,1 % к 30-м суткам. Выявлена временная диссоциация в динамике активационных маркеров: экспрессия CD71 и CD95 снижается к 30-м суткам, что может свидетельствовать об истощении пролиферативного потенциала и усилении регуляторных/апоптотических механизмов. Некоторое снижение антигенной активации CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов можно связать с ослаблением иммунореактивности на фоне интенсивной диссеминации возбудителя.

Установлено, что разработанный клеточный антигенспецифический тест с АБПК позволяет надежно выявлять функционально активные Т-клеточные популяции, ассоциированные с острым течением бруцеллезной инфекции, и может служить основой для оценки специфического клеточного иммунитета *in vitro*.

Динамика экспрессии активационных маркеров Т-лимфоцитов при остром бруцеллезе в условиях повторного инфицирования

Впервые на модели острой бруцеллезной инфекции (белые мыши, *B. abortus*, 10⁶ ж.м.к) исследована антигенспецифическая реактивность Т-лимфоцитов при повторном заражении на фоне уже развившейся острой инфекции.

Установлено, что при первичной инфекции коэффициент стимуляции антиген-реактивных Т-лимфоцитов достигает максимума на 14–21 сутки. При повторном заражении антигенспецифическая стимуляция вызывает выраженный рост экспрессии CD69, МНС-II и CD25, с постепенным увеличением КС до 70–77 % к 28-м суткам. Это свидетельствует о сохранении и усилении функциональной готовности Т-клеток и формированию нестерильного специфического иммунитета.

Анализ связи интенсивности иммуновоспалительных реакций и антигенреактивности Т-лимфоцитов в динамике развития острой бруцеллезной инфекции

В экспериментальной модели острой бруцеллезной инфекции (аутбредные белые мыши, *Brucella melitensis* С-565, 10⁶ ж.м.к.) впервые

комплексно изучена взаимосвязь между динамикой антигенспецифической активации Т-лимфоцитов и показателями системного воспаления, фагоцитарной функции и цитокинового профиля.

Установлено, что развитие инфекции сопровождается выраженным лейкоцитозом и повышением ЛИИ, достигающим максимума на 14–30 сутки, что отражает фазы первичной и вторичной генерализации инфекции и эндотоксинемию. На ранних сроках (7–14 сутки) наблюдается активация кислородзависимого бактерицидного потенциала нейтрофилов (НСТ-тест, «респираторный взрыв»), а также рост провоспалительных цитокинов – TNF (пик на 14 сутки: 146,5 пг/мл) и IL-6 (пик на 30 сутки: 35,4 пг/мл). Концентрация прокальцитонина, маркера системного воспаления, коррелирует с TNF ($r = 0,984$) и достигает максимума на 14–21 сутки.

Показана тесная прямая корреляция между КС CD3⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов и выраженностью лейкоцитоза ($r = 0,955$) и ЛИИ ($r = 0,968$), а также обратная связь с активностью фагоцитарных ферментов – СДГ ($r = -0,878$) и НСТ-тестом ($r = -0,710$), что указывает на сопряженность Т-клеточной реактивности и степени системного воспаления. Для CD3⁺CD69⁺ Т-клеток выявлена сильная положительная корреляция с уровнями TNF ($r = 0,957$) и прокальцитонина ($r = 0,910$), но выраженная отрицательная связь с IL-6 ($r = -0,903$) и IL-10 ($r = -0,986$), что свидетельствует о сложной регуляции ранней Т-клеточной активации в условиях иммуновоспалительного дисбаланса. Активация CD3⁺CD71⁺ и CD3⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов тесно ассоциирована с метаболической активностью фагоцитов: КС этих популяций положительно коррелирует с НСТ-тестом ($r = 0,950$ и $0,940$) и СДГ ($r = 0,973$ и $0,898$), но отрицательно – с IL-6 и IL-10, что подчеркивает роль пролиферативного и апоптотического компонентов в формировании адаптивного ответа.

Особенности антигениндуцированной экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитами *ex vivo* у больных с различными формами течения бруцеллезной инфекции

Наиболее высокие значения антигениндуцированной экспрессии маркеров CD25, CD69, CD71 на поверхности Т-лимфоцитов наблюдались у лиц с диагнозами «острый бруцеллез» и «хронический бруцеллез» в период обострения. Антигенреактивность *ex vivo* Т-клеток у пациентов с острой инфекцией и лиц с активным рецидивирующим хроническим бруцеллезом количественно были сходны (*Me* КС CD3⁺CD25⁺CD69⁺CD71⁺ – 45-60 %) и уровень регуляции был выше, чем у больных с хроническим бруцеллезом в состоянии ремиссии. При этом, было обнаружено, что лиц с хроническим бруцеллезом без рецидивирующего течения выявлен большой пул антигенреактивных СТЛ клеток, КС стимуляции CD3⁺CD8⁺CD25⁺ и CD3⁺CD8⁺CD69⁺ превышал 55-60 %, что подтверждает важную роль CD8⁺ Т-лимфоцитов при хроническом течении бруцеллеза у людей и может

рассматриваться как маркер иммунитета за счет цитотоксического эффекта (таблица 2).

Таблица 2 – Медианные значения КС активированных субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺ у больных с различными формами течения бруцеллезной инфекции

КС (медианные значения)	Больные с диагнозом «острый бруцеллез»	Больные с диагнозом «хронический бруцеллез»	
		С обострением	Без обострения
Me КС CD3 ⁺ CD25 ⁺ (%)	52,38	53,89	38,69
Me КС CD3 ⁺ CD69 ⁺ (%)	54,63	56,92	41,42
Me КС CD3 ⁺ CD71 ⁺ (%)	50,31	60,15	41,19

Корреляционный анализ не выявил статистически выраженной зависимости величины титра антител в реакциях агглютинации Хеддельсона и Райта и средних значений экспрессии активационных молекул Т-лимфоцитами, стимулированных АБПК. У больных острым бруцеллезом анализ корреляции показал наличие умеренной прямо пропорциональной связи относительно содержания IgG и умеренной обратно пропорциональной связи относительно содержания IgM с *ex vivo* интенсивностью антигенной активации Т-лимфоцитов. Однако, у больных с различными формами течения бруцеллезной инфекции тесной взаимосвязи интенсивности антителогенеза и антигенреактивности *ex vivo* Т-клеток не выявлено.

Изучение протективной активности иммунного ответа к возбудителю бруцеллеза на основе анализа антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов *in vitro*

В эксперименте на белых мышах, вакцинированных *Brucella abortus* 19 ВА в дозах 10³, 10⁵ и 10⁸ ж.м.к., впервые показано, что уровень антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов *ex vivo* напрямую зависит от иммунизирующей дозы и коррелирует с формированием протективного иммунитета. Наиболее выраженный антиген-индуцированный Т-клеточный ответ (КС ≥50 % по CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺МНС-II⁺) наблюдался при вакцинации дозой 10⁸ ж.м.к. и сохранялся до 90-х суток.

После заражения вирулентным штаммом *B. melitensis* 16М (10³ ж.м.к.) у этой группы достигнута 100 % защита, в то время как в группах с низкими дозами вакцины регистрировалась частичная восприимчивость (75 % и 42 % инфицированных соответственно). Установлена сильная обратная корреляция между КС CD3⁺CD25⁺ и показателями инфицированности: долей зараженных животных ($r = -0,972$), индекса инфицированности ($r = -0,841$) и интенсивностью обсеменения органов ($r = -0,781$).

При этом серологический ответ (СГТ антител) не демонстрировал достоверной связи с уровнем защиты ($R^2 = 0,34-0,39$), в отличие от Т-клеточной реактивности ($R^2 = 0,70-0,97$). Впервые обоснован

прогностический критерий иммунологической защиты: при КС ≥ 50 % по CD25⁺ *ex vivo* обеспечивается иммунологическая устойчивость. В результате экспериментальных исследований был разработан «Способ оценки протективного иммунитета к возбудителю бруцеллеза» (патент RU 2806161). Полученные данные подтверждают ведущую роль клеточного звена иммунитета в защите от бруцеллеза и создают основу для ранней (с 14-х суток) оценки эффективности противобруцеллезной вакцинации на основе разработанного клеточного антигенспецифического теста.

Оценка иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза у человека на ранних сроках после иммунизации

При оценке специфической активности Т-клеток у 62 добровольцев, не обладающих специфическим иммунитетом к возбудителю бруцеллеза, перед вакцинацией и через 14 дней после иммунизации вакциной АБПК исследовали уровень фоновой и антиген-индуцированной экспрессии маркеров активации – CD25, CD69 и CD71 – как на популяции CD3⁺ лимфоцитов, так и на субпопуляции CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов. Полученные данные свидетельствуют о высокой диагностической информативности данного метода, ключевым элементом которого является оценка *ex vivo* антиген-индуцированной активации Т-клеток (таблица 3).

Таблица 3 – Показатели КС Т-лимфоцитов и Т-хелперов до иммунизации и через 14 дней после вакцинации против бруцеллеза

Сроки обследования	Значения КС популяций Т-лимфоцитов и Т-хелперов (%)					
	CD3 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD69 ⁺	CD3 ⁺ CD71 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD71 ⁺
До иммунизации	11,66±1,92	8,87±1,76	8,87±1,76	8,30±1,73	9,00±1,23	12,80±1,72
На 14 суток после вакцинации	2,95±1,38	66,78±1,97	59,93±1,82	53,18±1,32	66,78±2,03	60,09±1,72

* – в сравнении с контролем разница значений статистически значима при $p \leq 0,05$

Установлено, что значение коэффициента стимуляции, равное 50 % и более, на основании анализа *ex vivo* экспрессии мембранных рецепторов активации (CD25, CD69, CD71) Т-лимфоцитов, служит маркером развития функционально активного адаптивного Т-клеточного иммунитета у вакцинированного контингента против бруцеллеза. Данный метод может быть рекомендован для лабораторной оценки иммунологической эффективности вакцинации населения против бруцеллеза по эпидемиологическим показаниям, особенно на ранних сроках после введения вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА (с 14 суток). Опираясь на полученные данные, был разработан «Способ оценки фактической привитости людей против бруцеллеза на ранних сроках после вакцинации» (патент RU 2714136).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего диссертационного исследования впервые разработан и внедрен в практику алгоритм применения клеточных антигенспецифических тестов *in vitro* для диагностики бруцеллеза и оценки специфического иммунитета. Изучен и внедрен комплексный бруцеллезный антиген для клеточных тестов. Диагностическая точность теста для выявления бруцеллеза у людей составила 93,8 %. Получены новые данные об антиген-индуцированной активации Т-лимфоцитов: максимальная экспрессия маркеров CD25, CD69 и CD71 выявлена при остром течении и обострении хронического бруцеллеза. У пациентов с хроническим бруцеллезом без обострений обнаружен высокий пул антиген-реактивных CD8⁺ Т-лимфоцитов (КС CD3⁺CD8⁺CD25⁺/CD69⁺ > 55–60 %), что подтверждает вклад цитотоксических клеток в иммунный контроль. Выявлена динамика активации Т-лимфоцитов при острой инфекции: на 14 сутки — выраженная активация, на 21–30-е сутки — поляризация в сторону цитотоксической реакции; при реинфицировании реактивность усиливается. Подтверждено, что у иммунных биомоделей КС CD3⁺CD25⁺-лимфоцитов ≥ 50 % обеспечивает защиту от заражения штаммом *B. melitensis* 16 М (10³ ж.м.к.). Разработан подход к оценке формирования поствакцинального иммунитета, позволяющий количественно оценивать развитие специфического Т-клеточного ответа в ранние сроки после иммунизации и мониторить эффективность вакцинации.

ВЫВОДЫ

1. Впервые для клеточных тестов *in vitro* получен и внедрен в практику антигенный бруцеллезный полисахаридно-белковый комплекс, обладающий высокой специфичностью (98-100 %) и антигенстимулирующей Т-клетки активностью.

2. Разработан алгоритм постановки и учета антигенспецифического клеточного теста *in vitro* для диагностики бруцеллеза и оценки специфического иммунитета, обладающий высокой диагностической эффективностью: чувствительность составила 95,3 % при остром и 91,7 % при хроническом бруцеллезе, специфичность – 93,7 %, диагностическая точность – 93,8 %.

3. В эксперименте на мышах показано, что при остром бруцеллезе пик антигенспецифического Т-клеточного ответа приходится на 14 сутки инфекции с последующей цитотоксической поляризацией, реинфицирование усиливает антигенспецифическую реактивность Т-лимфоцитов; доля антигенреактивных клеток прямо коррелирует с маркерами системного воспаления: лейкоцитоз, ЛИИ, TNF-α, прокальцитонин ($r = 0,955 \div 0,968$; $R^2 = 0,912 \div 0,938$) и обратно – с фагоцитарной активностью и уровнями IL-6 и IL-10 ($r = -0,548 \div -0,986$, $R^2 = 0,299 \div 0,972$).

4. Выявлена наиболее выраженная антигенспецифическая активация CD3⁺-лимфоцитов (по экспрессии CD25, CD69, CD71) у пациентов с острым и

активным хроническим бруцеллёзом с преимущественной активацией цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов.

5. Экспериментально установлена высокая обратная корреляция между уровнем антигенспецифической активации Т-лимфоцитов *in vitro* и восприимчивостью к бруцеллезу после вакцинации ($r = -0,835 \div -0,968$, $R^2 = 0,703 \div 0,970$). При значении коэффициента стимуляции $\geq 50\%$ по экспрессии CD25⁺ *ex vivo* обеспечивается иммунологическая защита (прогностический критерий) от развития бруцеллезной инфекции после заражения *Brucella melitensis* в дозе 1×10^3 живых микробных клеток.

6. Впервые предложен методический подход для *in vitro* оценки иммунологической эффективности вакцинации людей против бруцеллеза на ранних сроках после иммунизации (с 14 суток): более чем двукратное повышение коэффициента стимуляции CD3⁺-клеток по экспрессии CD25⁺ свидетельствует о формировании адаптивного Т-клеточного иммунитета у вакцинированных.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для оценки клеточного иммунитета против бруцеллезной инфекции целесообразно продолжить поиск новых маркеров. В перспективе планируется дальнейшая разработка и апробация антигенспецифического клеточного теста с целью оценки активности протективного Т-клеточного иммунитета при других инфекционных заболеваниях, а также изучение и внедрение новых методов, направленных на изучение клеточного иммунитета.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендуемых ВАК:

1. Костюченко М.В. Перспективы оценки антигенреактивности лимфоцитов *in vitro* для диагностики острого бруцеллеза / Костюченко М.В., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Санникова И.В., Дейнека Д.А., Голубь О.Г. // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 91–96.
2. Костюченко М.В. Изучение формирования клеточного поствакцинального иммунитета против бруцеллеза в лимфоцитарных тестах *in vitro* с использованием экспериментального антигенного комплекса / Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 3. – С. 547–554.
3. Курчева С.А. Качественные показатели экспериментальных бруцеллезных антигенных препаратов, предназначенных для клеточных тестов *in vitro* / Курчева С.А., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Костюченко М.В., Кошкидько А.Г., Жарникова И.В., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Жиров А.М. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 3. – С. 83–88.
4. Пономаренко Д.Г. Количественный анализ протективной активности Т-клеточного иммунитета к возбудителю бруцеллеза / Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Хачатурова А.А.,

Лукашевич Д.Е., Курчева С.А., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. // Медицинская иммунология. – 2024. – Т. 26, № 1. – С. 211–220.

В тезисах научных конференций:

1. **Костюченко М.В.** Изучение специфической активации лимфоцитов *in vitro* у больных бруцеллезом / **Костюченко М.В.**, Саркисян Н.С., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В. // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 22–24 октября 2014 г., г. Ставрополь. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2014. – С. 88–89.

2. Пономаренко Д.Г. Применение иммунофенотипирования для учета реакции антигенспецифической активации лимфоцитов *in vitro* при определении напряженности иммунитета к возбудителю бруцеллёза / Пономаренко Д.Г., Саркисян Н.С., **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В. // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 22–24 октября 2014 г., г. Ставрополь. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2014. – С. 98–100.

3. **Костюченко М.В.** Показатели специфической активации лимфоцитов у больных бруцеллёзом и сибирской язвой / **Костюченко М.В.**, Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Саркисян Н.С., Логвиненко О.В. // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: материалы международной конференции (23–24 июня 2015 г., Москва). – М., 2015. – С. 202–204.

4. Пономаренко Д.Г. Особенности клеточной антигенреактивности у больных бруцеллёзом и сибирской язвой / Пономаренко Д.Г., **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Рязанова А.Г., Санникова И.В., Дейнека Д.А., Голубь О.Г. // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, 08–10 декабря 2015 г. – СПб., 2015. – С. 171–172.

5. Саркисян Н.С. Разработка метода количественной оценки степени клеточно-опосредованной специфической сенсибилизации при бруцеллезе на основе антигенспецифической активации лимфоцитов *in vitro* и проточно-цитометрического анализа / Саркисян Н.С., Пономаренко Д.Г., **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л. // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, 08–10 декабря 2015 г. – СПб., 2015. – С. 176–177.

6. **Костюченко М.В.** Особенности экспрессии маркеров апоптоза на лимфоцитах крови у больных бруцеллезом / **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Санникова И.В., Дейнека Д.А. // Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными

инфекциями: материалы Всероссийской научно-практической конференции, Нижний Новгород, 25 мая 2016 г. – Н. Новгород: Растр-НН, 2016. – С. 249–251.

7. **Костюченко М.В.** Оценка возможности использования клеточных тестов *in vitro* и технологии проточной цитофлуориметрии для диагностики острого бруцеллеза / **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г. // Здоровье населения и среда обитания: материалы научно-практической конференции «20-я ежегодная Неделя медицины Ставрополья». – Ставрополь: Параграф, 2016. – С. 65–69.

8. Пономаренко Д.Г. Применение проточной цитофлуориметрии для диагностики острого бруцеллеза / Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Логвиненко О.В. // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, Москва, 1–3 ноября 2016 г. – М.: Грифон, 2016. – С. 157–159.

9. **Костюченко М.В.** Экспрессия активационных молекул на лимфоцитах у больных острым бруцеллезом при их активации антигеном *in vitro* / **Костюченко М.В.**, Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Голубь О.Г. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных [Электронный ресурс]: материалы II Всероссийской научно-практической конференции / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2017. – С. 239–241.

10. **Костюченко М.В.** Использование антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки иммунологической реактивности у лиц, подлежащих вакцинации и ревакцинации против бруцеллеза / **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В. // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 5. – С. 267.

11. **Костюченко М.В.** Применение методов анализа антигенреактивности клеток *in vitro* для диагностики бруцеллеза / **Костюченко М.В.**, Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Русанова Д.В. // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Иркутск, 5–7 декабря 2017 г.) / под ред. А.Ю. Поповой. – Иркутск: ИНЦХТ, 2017. – С. 70–72.

12. **Костюченко М.В.** Оценка специфической активности белково-полисахаридного антигенного комплекса для клеточных тестов *in vitro* / **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В. // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: материалы X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Москва, 24–26 октября 2018 г.). – М.: Русский Печатный Двор, 2018. – С. 194–196.

13. Ракитина Е.Л. Изучение формирования поствакцинального иммунитета против бруцеллёза в клеточных тестах *in vitro* с использованием экспериментального бруцеллезного антигена / Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В. // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: материалы X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Москва, 24–26 октября 2018 г.). – М.: Русский Печатный Двор, 2018. – С. 259–261.

14. Ракитина Е.Л. Особенности экспрессии активационных молекул лимфоцитов у больных с различными клиническими формами бруцеллезной инфекции / Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Логвиненко О.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Бердникова Т.В., Хачатурова А.А., Голубь О.Г., Пономаренко Д.Г. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (24–25 апреля 2019 г.) / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2019. – С. 186–188.

15. **Костюченко М.В.** Совершенствование методических подходов для оценки иммунологической эффективности вакцинации людей против бруцеллеза / **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Бердникова Т.В., Хачатурова А.А., Пономаренко Д.Г. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (24–25 апреля 2019 г.) / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь: Экспо-Медиа, 2019. – С. 222–223.

16. Курчева С.А. Разработка антигенного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса для использования в клеточных тестах *in vitro* / Курчева С.А., Пономаренко Д.Г., Жарникова И.В., Ковалев Д.А., Кошкидько А.Г., Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Логвиненко О.В., Жданова Е.В., Геогджаян А.С. // Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения: сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 100-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (г. Н. Новгород, 11–12 сентября 2019 г.) / под ред. Е.И. Ефимова. – Н. Новгород: Ремедиум Приволжье, 2019. – С. 290–291.

17. **Костюченко М.В.** Оценка активности клеточного противобруцеллезного иммунитета / **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Бердникова Т.В., Хачатурова А.А. // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: материалы VI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием, г. Сочи, 30 октября – 2 ноября 2019 г. – Краснодар: Новация, 2019. – С. 114–115.

18. Логвиненко О.В. Специфическая реактивность гуморального и клеточного иммунитета у переболевших бруцеллезом / Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., **Костюченко М.В.**, Русанова Д.В.,

Бердникова Т.В., Хачатурова А.А., Курчева С.А. // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания: материалы VI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием, г. Сочи, 30 октября – 2 ноября 2019 г. – Краснодар: Новация, 2019. – С. 132–133.

19. Пономаренко Д.Г. Новый методический подход для оценки иммунологической эффективности вакцинации людей против бруцеллеза / Пономаренко Д.Г., **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Хачатурова А.А., Бердникова Т.В. // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Уфа, 2–4 октября 2019 г.). – Уфа: Башкирская энциклопедия, 2019. – С. 284–288.

20. **Костюченко М.В.** К возможности оценки интенсивности иммуновоспалительных реакций у больных бруцеллезом на основании анализа антигенреактивности Т-лимфоцитов / **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Бахранова М.Ш., Пономаренко Д.Г. // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Москва, 24–26 мая 2021 г. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство, 2021. – С. 197.

21. Логвиненко О.В. Анализ функционально-метаболического состояния лейкоцитов крови при экспериментальной острой бруцеллезной инфекции / Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Коняева О.А., Пономаренко Д.Г. // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского, Москва, 24–26 мая 2021 г. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство, 2021. – С. 202.

22. **Костюченко М.В.** Анализ экспрессии на лимфоцитах маркеров ранней и поздней активации в динамике развития острой бруцеллезной инфекции / **Костюченко М.В.**, Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Коняева О.А. // Здоровье населения и среда обитания: материалы научно-практической конференции «25-я ежегодная Неделя медицины Ставрополя». – Ставрополь: Параграф, 2021. – С. 21–24.

23. **Костюченко М.В.** Анализ функциональной активности лейкоцитов и показателей интоксикации при остром бруцеллезе (экспериментальные исследования) / **Костюченко М.В.**, Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Коняева О.А., Пономаренко Д.Г. // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (г. Екатеринбург, 15–17 сентября

2021 г.) / под ред. А.Ю. Поповой. – Екатеринбург: ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2021. – С. 270–272.

24. **Костюченко М.В.** Анализ антигенреактивности Т-лимфоцитов при остром бруцеллезе в условиях повторного инфицирования / **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Германова А.Н., Даурова А.В., Жаринова И.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Коняева О.А., Пономаренко Д.Г. // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию со дня основания ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2022. – С. 161–162.

25. Пономаренко Д.Г. Анализ антигенреактивности Т-лимфоцитов *ex vivo* и протективного иммунитета к возбудителю бруцеллеза / Пономаренко Д.Г., **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Хачатурова А.А., Курчева С.А., Русанова Д.В., Бердникова Т.В., Лукашевич Д.Е., Германова А.Н., Даурова А.А., Жаринова И.В., Коняева О.А., Касумова Э.Р., Акмалетдинова А.О., Куличенко А.Н. // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию со дня основания ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2022. – С. 173–174.

26. Ракитина Е.Л. Иммуногистохимический анализ функционального состояния лимфоцитов в лимфатических узлах и селезенке после иммунизации против бруцеллеза / Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., **Костюченко М.В.**, Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Германова А.Н., Даурова А.В., Жаринова И.В., Коняева О.А., Акмалетдинова А.О. // Проблемы особо опасных инфекций на Северном Кавказе: материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию со дня основания ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2022. – С. 175–177.

27. Акмалетдинова А.О. Состояние бактерицидных систем фагоцитов при остром бруцеллезе в условиях экспериментальной суперинфекции / Акмалетдинова А.О., Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Даурова А.В., Коняева О.А. // Биоразнообразие, биоресурсы, вопросы биотехнологии и здоровье населения Северо-Кавказского региона: материалы IX (66-й) ежегодной научно-практической конференции. – Ставрополь: Издательство СКФУ, 2022. – С. 173–175.

28. Пономаренко Д.Г. Экспрессия молекул костимуляции CD69 на Т-лимфоцитах при условиях суперинфекции / Пономаренко Д.Г., **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В. // Материалы XIV межгосударственной научно-практической конференции по вопросам санитарной охраны

территории и снижения риска распространения чумы (26–27 сентября 2022 г., Санкт-Петербург). – Саратов: Амирит, 2022. – С. 148–150.

29. Матвиенко А.Д. Бактерицидный потенциал фагоцитов в условиях бруцеллезной суперинфекции / Матвиенко А.Д., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Пономаренко Д.Г. // Бактериология. – 2022. – № 3. – С. 49.

30. **Костюченко М.В.** Анализ связи интенсивности иммуновоспалительных реакций и антигенреактивности Т-лимфоцитов в динамике развития острой бруцеллезной инфекции / **Костюченко М.В.**, Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Матвиенко А.Д., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Даурова А.В., Жаринова И.В., Курчева С.А., Русанова Д.В., Коняева О.А. // Здоровье населения и среда обитания: материалы научно-практической конференции «26-я ежегодная Неделя медицины Ставрополя». – Ставрополь: Параграф, 2022. – С. 81–85.

31. Пономаренко Д.Г. Экспрессия Т-лимфоцитами молекул II класса главного комплекса гистосовместимости при остром бруцеллезе и повторном инфицировании / Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Логвиненко О.В., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Даурова А.В., Жаринова И.В., Германова А.Н., Матвиенко А.Д., Курчева С.А., Русанова Д.В., Коняева О.А. // Здоровье населения и среда обитания: материалы научно-практической конференции «26-я ежегодная Неделя медицины Ставрополя». – Ставрополь: Параграф, 2022. – С. 86–90.

32. **Костюченко М.В.** Новые технологии для иммунологической диагностики бруцеллеза / **Костюченко М.В.**, Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Матвиенко А.Д. // Современные проблемы распространения, диагностики, профилактики и терапии инфекционных заболеваний: материалы научно-практической конференции (Ставрополь, 29–30 ноября 2022 г.). – Ставрополь, 2022. – С. 19–23.

33. Ракитина Е.Л. Состояние активации апоптоза Т-лимфоцитов при бруцеллезной инфекции в эксперименте / Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Логвиненко О.В., Пономаренко Д.Г. // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. А.Н. Куличенко. – Ставрополь, 2024. – С. 206–207.

Патенты РФ:

1. Патент РФ RU 2806161 С1 на изобретение «Способ оценки протективного иммунитета к возбудителю бруцеллеза». / Пономаренко Д.Г., **Костюченко М.В.**, Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Жаринова И.В., Даурова А.В., Матвиенко А.Д., Курчева С.А., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Бюл. № 30. Опубликовано: 26.10.2023. Дата начала отсчета срока действия патента: 05.12.2022.

2. Патент РФ RU 2708561 С1 на изобретение «Способ получения бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro*». / Курчева С.А., Пономаренко Д.Г., Жарникова И.В., Ковалёв Д.А., Ракитина Е.Л., Кошкидько

А.Г., **Костюченко М.В.**, Жданова Е.В., Геогджаян А.С., Логвиненко О.В. Бюл. № 34. Опубликовано: 09.12.2019. Дата начала отсчета срока действия патента: 09.01.2019.

3. Патент РФ RU 2714136 С1 на изобретение «Способ оценки фактической привитости людей против бруцеллёза на ранних сроках после вакцинации». / Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., **Костюченко М.В.**, Логвиненко О.В., Курчева С.А., Жарникова И.В., Русанова Д.В., Бердникова Т.В., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Бюл. № 5. Опубликовано: 12.02.2020. Дата начала отсчета срока действия патента: 29.03.2019.

Нормативные и методические документы:

1. Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей: методические рекомендации МР 3.1.0207-20 / разработ. ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора [и др.]; утв. Руководителем Роспотребнадзора, Главным государственным санитарным врачом РФ А. Ю. Поповой 19.08.2020. – М.: Федер. центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2021. – 24 с. – (Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации).

2. Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика бруцеллеза и геномный мониторинг бруцелл: методические указания МУ 3.1/4.2.4145-25 / разработ.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [и др.]; утв. Руководителем Роспотребнадзора, Главным государственным санитарным врачом РФ А. Ю. Поповой 11.04.2025. – М., 2025.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБПК – антигенный белково-полисахаридный комплекс

ж.м.к. – живые микробные клетки

ИФА – иммуноферментный анализ

КБ – катионные белки

КС – коэффициент стимуляции

КФ – кислая фосфатаза

ЛИИ – лейкоцитарный индекс интоксикации

МПО – миелопероксидаза

НСТ – тест восстановления нитросинего тетразолия

СДГ – сукцинатдегидрогеназа

СГТ – средние значения геометрического титра антител

СТЛ – цитотоксический Т-лимфоцит

HLA – лейкоцитарный антиген человека

IFN- γ – интерферон γ

IL – интерлейкин

Ig – иммуноглобулин

MHC-II – молекула главного комплекса гистосовместимости II класса

TNF- α – фактор некроза опухоли α