

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Костюченко Марина Владимировна

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

3.2.7. – Иммунология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Пономаренко Дмитрий Григорьевич

Ставрополь – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	17
1.1. Особенности формирования иммунного ответа при бруцеллезе	17
1.1.1 Иммунопатогенез бруцеллеза	17
1.1.2 Особенности иммунного ответа при бруцеллезной инфекции	20
1.1.3 Роль гуморального и клеточного иммунитета в формировании противобруцеллезного иммунитета	27
1.2 Современные методы оценки напряженности противобруцеллезного иммунитета и диагностики бруцеллеза	33
1.3 Клеточная антигенспецифическая реактивность как маркер иммунной защиты при инфекционных заболеваниях	35
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1 Материалы	42
2.1.1 Экспериментальные модели	42
2.1.2 Клинический материал	42
2.1.3 Штаммы	44
2.1.4 Питательные среды и условия культивирования	45
2.1.5 Антигены микроорганизмов	45
2.2 Методы исследования	46
2.2.1 Методика получения антигенного бруцеллезного полисахаридно- белкового комплекса для клеточных тестов <i>in vitro</i>	46
2.2.2 Метод оценки антигенспецифической активации Т-лимфоцитов <i>in vitro</i>	48
2.2.3 Цитометрический анализ экспрессии активационных молекул на поверхности лимфоцитов	50
2.2.4 Методы оценки инфицированности и иммунного ответа у биомоделей	52
2.2.5 Оценка функциональной активности фагоцитов	54
2.2.6 Содержание катионных лизосомальных белков	55
2.2.7 Активность миелопероксидазы	55

2.2.8 Активность сукцинатдегидрогеназы	56
2.2.9 Активность кислой фосфатазы.....	56
2.3 Оценка цитокинового профиля	57
2.4 Методы статистической обработки данных.....	58
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	60
3.1 Разработка антигенспецифических клеточных тестов <i>in vitro</i> для оценки антигенреактивности Т-лимфоцитов при бруцеллезной инфекции.....	60
3.1.1 Анализ возможности и перспективы применения технологии проточной цитофлуориметрии и антигенспецифической активации лимфоцитов <i>ex vivo</i> для диагностики бруцеллеза	60
3.1.2 Изучение возможности и перспективы применения технологии проточной цитофлуориметрии и клеточного антигенспецифического теста.....	66
3.1.3 Изучение антигенного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса для использования в клеточных тестах <i>in vitro</i>	69
3.1.3.1 Изучение качественных показателей экспериментальных серий различных образцов антигенного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса.....	69
3.1.3.2 Сравнительный анализ специфичности и специфической активности различных экспериментальных серий антигенного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса в клеточных тестах <i>in vitro</i>	72
3.1.3.3 Определение количества бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса в клеточных тестах, необходимого для специфической стимуляции клеток <i>ex vivo</i>	74
3.1.3.4 Сравнительная оценка специфической активности бруцеллина и АБПК в клеточных антигенспецифических тестах <i>in vitro</i>	78
3.1.4 Изучение диагностической точности клеточного антигенспецифического теста <i>in vitro</i>	84
3.2 Изучение особенностей <i>ex vivo</i> активации Т-лимфоцитов и иммунновоспалительных реакций в динамике развития острой бруцеллезной инфекции.....	88

3.2.1 Анализ активации Т-лимфоцитов в динамике развития острой бруцеллезной инфекции	88
3.2.2 Изучение особенностей динамики антигениндуцированной экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов при остром бруцеллезе в условиях повторного инфицирования	96
3.2.3 Анализ связи интенсивности иммуновоспалительных реакций и антигенреактивности Т-лимфоцитов в динамике развития острой бруцеллезной инфекции.....	101
3.2.4 Выявление особенностей антигениндуцированной экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитами <i>ex vivo</i> у больных с различными формами течения бруцеллезной инфекции	110
3.3 Анализ механизмов формирования и активации специфического иммунитета к бруцеллезу с использованием клеточного антигенспецифического <i>in vitro</i> теста	117
3.3.1 Изучение протективной активности иммунного ответа к возбудителю бруцеллеза на основе анализа антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов <i>in vitro</i>	117
3.3.2 Оценка иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза у человека на ранних сроках после иммунизации по показателям антигенреактивности Т-лимфоцитов	129
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	153
ВЫВОДЫ	154
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	156
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	157
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

На территории Российской Федерации регистрируется неустойчивая эпидемиологическая ситуация на фоне сохраняющегося неблагополучия эпизоотического характера, обусловленная циркуляцией возбудителей бруцеллеза среди сельскохозяйственных видов животных, включая крупный и мелкий рогатый скот, в регионах интенсивного скотоводства. В последние годы можно отметить наметившуюся тенденцию к увеличению заболеваемости людей бруцеллезом на 30-35 % относительно среднесуточных значений, связанную с возникновением «завозных» эпизоотий КРС, в том числе на крупных животноводческих предприятиях и формированием групповых эпидемических очагов на относительно благополучных территориях Центрального, Приволжского и Южного федеральных округов, и ухудшением эпизоотической ситуации по бруцеллёзу в Республике Дагестан, субъектах Сибирского федерального округа [61, 64].

Известно, что бруцеллез у человека демонстрирует удивительное многообразие симптоматики при клинических проявлениях, что становится все более очевидным по мере разработки и внедрения современных методов диагностики [54, 217, 248, 294]. Современное состояние эпидемиологической обстановки, характеризующееся увеличением распространенности бруцеллеза по всему миру, в сочетании с полиморфизмом клинических проявлений преимущественно острой формы заболевания, требует модернизации существующих диагностических алгоритмов и методов верификации бруцеллезной инфекции.

Наиболее широко в клинической лабораторной диагностике инфекций используются иммунологические методы. Иммунодиагностика основана на выявлении «продуктов» (биомаркеров) иммуновоспалительных реакций, образованных при взаимодействии системы иммунитета с антигенными субстанциями микроорганизмов: специфических антител, пула антигенреактивных

лейкоцитов и биомаркеров (аналитов), отражающих наличие и интенсивность иммунологической реактивности по отношению к антигенам возбудителей инфекции.

В соответствии с нормативно-методическими документами для оценки напряженности противобруцеллезного иммунитета на современном этапе для диагностики применяются иммунологические реакции, направленные на детекцию специфических антител – такие как реакция агглютинации (реакции Хеддельсона/Райта) и иммуноферментный анализ (ИФА) [93].

Очевидна необходимость совершенствования нормативно-методической базы, регулирующих оценку иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза, а также анализа характера поствакцинальных иммунологических изменений.

С учетом ключевой роли клеточного иммунитета в реализации защитных механизмов против бруцеллеза, исследование клеточных иммунных реакций в ответ на антигенную стимуляцию следует рассматривать как наиболее информативный и объективный критерий оценки иммунологических изменений, происходящих в организме в поствакцинальный период, а также для лабораторной диагностики инфекционного процесса [20].

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.

Поиску оптимальных методов, позволяющих оценить клеточный иммунитет при инфекциях, в том числе и особо опасных, посвящено множество работ.

В последние годы для анализа состояния клеточного иммунитета и верификации инфекционных процессов все более широкое применение находят антиген-стимулированные клеточные тесты *in vitro* с использованием проточно-цитометрического анализа. Эти методы активно разрабатывались и применялись различными исследователями, среди которых можно отметить Бывалова А.А.

(2007), Щуковскую Т.Н. (2007), Шмелькову Т.П. (2008), Рыжикову С.Л. (2009), Хайдукова С.В. (2011), Богачеву Н.В. (2013), Литвинову Л.С. (2014), Дубровину В.И. (2015), Фирстову В.В. (2015), Дерябина Н.П. (2016), Гостищеву С.Е. (2017), Бычкову Н.В. (2022г.), Васильеву О.О. (2023), Булыгина А.С. (2023), Талаева В.Ю (2024), Черепович Б. С. (2025) и др. и др. Их работы способствовали внедрению современных технологий в практику иммунодиагностики и оценки поствакцинальных реакций. Однако данные методические подходы пока не адаптированы для выявления иммунологических маркеров и оценки клеточного иммунитета при бруцеллезной инфекции.

Разработка высокоинформативных методик проведения антиген-стимулированных клеточных тестов *in vitro* требует строгого отбора стимулирующего агента, обладающего выраженным активирующим эффектом и обеспечивающего высокую специфичность иммунного ответа в условиях экспериментального анализа. На данный момент отсутствует 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 бруцеллёза, основанных на антигенспецифических клеточных тестах *in vitro* с использованием современного высокоточного аналитического оборудования, позволяющих проводить исследование активности Т-лимфоцитов в отношении возбудителя бруцеллёза (специфической активности).

Цель и задачи исследования

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.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

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 исследования

Впервые получен бруцеллезный полисахаридно-белковый антигенный комплекс, обладающий способностью специфически активировать Т-лимфоциты в условиях *in vitro* (патент RU 2708561). Дана комплексная биологическая и физико-химическая характеристика бруцеллезного антигена. Впервые установлено, что для запуска эффективной и специфической активации Т-клеточных рецепторов (TCR) *ex vivo*, характеризующуюся экспрессией маркеров активации (CD69, CD25, CD95, МНС-II и др.) на поверхности сенсibiliзированных CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ лимфоцитах, необходимо применение комплекса антигенов бруцелл, содержащего везикулы/белки внешней мембраны (OMP, OMV) с преобладанием субфракции с молекулярной массой 25-33 кДа.

Разработан и впервые применен методологический подход для оценки

антигенспецифической Т-клеточной реактивности при бруцеллезе *in vitro*, позволяющий выявлять диагностически значимые иммунологические маркеры. Впервые показано, что на основе анализа антигенреактивности Т-лимфоцитов *in vitro* в динамике развития острой бруцеллезной инфекции можно оценивать интенсивность иммуновоспалительных реакций. Впервые выявлено, что максимальные показатели интенсивности антиген-индуцированной активации Т-лимфоцитов, характеризующиеся повышенным содержанием клеток с фенотипами CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺ и CD3⁺CD71⁺ (медианные значения коэффициента стимуляции (*Me KC*) – 45–60 %) характерны для острой формы бруцеллеза и для тяжелого рецидива у больных с хронической формой бруцеллеза. Установлена корреляция (от высокой до умеренной) между динамикой и функциональным состоянием лейкоцитов, про- и противовоспалительных цитокинов и динамикой пула антигенреактивных Т-клеток.

Впервые доказана значимая взаимосвязь между интенсивностью *in vitro* активации CD3⁺ Т-клеток и степенью выраженности поствакцинального иммунного ответа, охарактеризованная высокими значениями коэффициента корреляции ($r = -0,841-0,966$) и детерминации ($R^2 = 0,708-0,969$), после иммунизации живой вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19ВА. Установлено, что у биомоделей, иммунизированных против бруцеллеза, коэффициент стимуляции Т-лимфоцитов на уровне 50 % и выше – оцененный по интенсивности антиген-индуцированной экспрессии маркера CD25⁺ в условиях *ex vivo* – обеспечивает полную защиту (100 %) от развития инфекции после заражения штаммом *B. melitensis* 16 М в дозе 1×10^3 жизнеспособных клеток (патент RU 2806161). Результаты исследований также продемонстрировали возможность оценки формирования Т-клеточного иммунного ответа у человека уже на 14-е сутки после введения вакцины против бруцеллеза (патент RU 2714136).

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений об особенностях антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов при бруцеллезной инфекции. Впервые показана возможность применения *ex vivo*-

методологии для оценки антиген-зависимой активации Т-клеток с целью выявления Т-клеточной иммунопревалентности. Разработана и стандартизирована методика клеточного антигенспецифического теста, позволяющая верифицировать бруцеллезную инфекцию у человека и оценивать уровень специфического клеточного иммунитета.

По результатам изучения диагностической информативности установлено, что специфичность клеточного антигенспецифического теста составила 93,7 %, чувствительность для диагностики острого бруцеллеза – 95,3 %, хронического бруцеллеза – 91,7 %. Показатель диагностической точности составил 93,8 %. При обследовании людей, вакцинированных против бруцеллеза живой бруцеллезной вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19ВА, через 30 дней после иммунизации у всех обследуемых (100 %) выявлен положительный результат клеточного антигенспецифического теста.

Разработан алгоритм применения клеточного антигенспецифического теста *in vitro* для иммунологической диагностики бруцеллеза у человека. Предложен лабораторный показатель, выступающий в качестве прогностического маркера наличия специфического иммунного ответа к бруцеллам и позволяющий оценить степень защищенности организма от инфекции.

Разработан комплекс иммунологических критериев, отражающих сформированность клеточного иммунитета против бруцелл. Подтверждена роль CD8⁺ Т-лимфоцитов при хроническом течении бруцеллеза у людей. Предложенные показатели могут быть использованы для оценки иммунобиологических характеристик антигенов и перспективных вакцинных штаммов, а также в качестве лабораторных маркеров для диагностики бруцеллеза и выявления специфического иммунного ответа у привитых лиц.

Полученный комплексный бруцеллезный антиген, разработанный алгоритм постановки и учета антигенспецифического клеточного теста *in vitro* для диагностики бруцеллеза и оценки специфической активности Т-клеточного иммунитета к возбудителю бруцеллеза после вакцинации с использованием проточной цитофлуориметрии внедрены 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:

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 бруцеллёза и геномный мониторинг бруцелл».

3. 3 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».

Методология и методы исследования

При разработке и выполнении исследовательской программы применялась методология, соответствующая современным стандартам научного исследования. В качестве объектов изучения были выбраны лабораторные животные и доноры, иммунизированные против бруцеллеза, пациенты с установленным диагнозом «бруцеллез», а также полисахаридно-белковые антигенные комплексы, выделенные из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА. Предметом исследования стало выявление характерных особенностей формирования антиген-специфических клеточных иммунных ответов при взаимодействии с возбудителем бруцеллеза.

При организации и реализации исследований, направленных на достижение поставленных целей, применялись общенаучные и специализированные методы, включая биологические, иммунологические и цитометрические подходы, с последующей статистической обработкой и интерпретацией полученных данных с

использованием современных программных средств. В ходе выполнения исследования применялись современные информационные ресурсы, включая отечественные и международные научные электронные базы данных, публикации в российских и зарубежных профильных журналах, а также материалы российских и международных научных конференций.

Положения, выносимые на защиту

1. Сконструированный бруцеллёзный антигенный полисахаридно-белковый комплекс обеспечивает специфическую стимуляцию Т-лимфоцитов с экспрессией маркерных молекул – молекул активации (CD69, CD25, CD95, МНС-II и др.), уровень которых может являться критерием для оценки интенсивности иммуновоспалительных реакций или Т-клеточной анергии при бруцеллёзе.

2. Разработанный клеточный антигенспецифический тест *in vitro* позволяет выявлять у людей диагностические маркеры бруцеллёзной 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.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена применением современного, аттестованного и сертифицированного оборудования, а также корректной статистической обработкой экспериментальных данных с использованием общепринятых методов анализа.

В основу диссертационной работы положены исследования, проведенные в рамках плановых НИР: «Совершенствование лабораторных методов диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллёза» (регистрационный номер АААА-А17-117112220025-4), сроки исполнения – 2017-2019 гг., «Факторы системного воспаления и гемостаза при бруцеллёзной инфекции. Совершенствование иммунологических методов лабораторной диагностики» (регистрационный номер 121040200152-0), сроки исполнения – 2021-2024 гг.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на: V Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2024); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные решения актуальных вопросов биологической и токсикологической безопасности» (Казань, 2023); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2019); VI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2019); XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2019); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию ФБУН ННИИЭМ имени академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения» (Новгород, 2019); X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Москва, 2018); IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 2017), II Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (Ставрополь, 2017); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Москва, 2016); Научно-практической конференции 20-ой ежегодной Неделя медицины Ставрополя «Здоровье населения и среда обитания» (Ставрополь, 2016), VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (Ставрополь, 2014); V

Международной научно-практической конференции «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (Владикавказ, 2014); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения» (Уфа, 2013). Кроме того, материалы, изложенные в диссертации, обсуждены на научно-практических конференциях молодых ученых (2017 г., 2018 г.) и итоговых научно-практических конференциях ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора (2016 г., 2017 г., 2018г., 2019 г).

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Личный вклад автора в получении научных результатов

Автором лично выполнен аналитический обзор отечественной и зарубежной научной литературы по теме диссертации, спланированы и организованы все экспериментальные исследования. Непосредственно автором проведен сравнительный анализ специфичности и антигенной активности опытных серий бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса в клеточных тестах *in vitro*, определена оптимальная концентрация антигена для специфической стимуляции Т-лимфоцитов. Автором изучены особенности антиген-индуцированной экспрессии маркеров активации на Т-лимфоцитах периферической крови больных с острыми и хроническими формами бруцеллеза, а также оценена иммунологическая эффективность противобруцеллезной вакцинации у лиц из групп риска на ранних сроках (с 14-х суток) после иммунизации. В эксперименте на лабораторных мышах автором исследована динамика Т-клеточной активации при первичной и повторной бруцел-

лезной инфекции, определен протективный потенциал клеточного иммунного ответа на основе анализа антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов, а также проведен статистический и корреляционный анализ полученных данных. Отдельные разделы исследования выполнены в сотрудничестве с научными сотрудниками лабораторий ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора: получение экспериментальных серий бруцеллезного полисахаридно-белкового антигенного комплекса совместно с к.б.н. Курчевой С.А., зав. научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций; разработка методики постановки и учета реакции клеточного антигенспецифического теста совместно с к.м.н. Ракитиной Е.Л., врачом клинической лабораторной диагностики сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза, исследования по изучению особенности корреляции цитологических показателей совместно с к.б.н. Логвиненко О.В., зав. сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза (под руководством к.б.н. Д.Г. Пономаренко, зав. лабораторией бруцеллеза).

Публикации

По результатам выполненных исследований опубликовано 37 научных работ, включая 4 статьи, размещённые 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 том числе 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, перспектив

дальнейшей разработки темы и списка использованных источников. Библиографический список включает 295 наименований, из которых 94 — отечественные и 201 — зарубежные публикации. Текст диссертации изложен на 193 страницах машинописного текста и сопровождается 25 таблицами и 34 рисунками.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Особенности формирования иммунного ответа при бруцеллезе

1.1.1 Иммунопатогенез бруцеллеза

Бруцеллез (лихорадка мальтийская, средиземноморская, гибралтарская, кипрская, ундулирующая, тифомалярийная, болезнь Банга) – системная зоонозная инфекция, которая характеризуется полиорганной патологией и высоким риском перехода в хроническую фазу. Возбудитель передается от животных (крупный рогатый скот, овцы, свиньи) к человеку через потребление зараженных продуктов, при контакте с выделениями животных или аэрогенным путем. Клинически заболевание проявляется поражением опорно-двигательного аппарата (артриты, спондилиты), сердечно-сосудистой системы (эндокардиты), нервной системы (нейробруцеллез) и половых органов (аднексит, орхит) [78, 227].

Возбудители бруцеллеза – аэробные и микроаэрофильные неподвижные грамотрицательные бактерии рода *Brucella* (семейство *Brucellaceae*) [56]. Согласно современной таксономии, род включает 12 генетически и биохимически обособленных видов, различающихся по антигенной структуре и вирулентности [139, 253]. Наибольшую эпидемиологическую значимость для человека представляют *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*, обладающие выраженными патогенными свойствами [139, 155].

Патогенный потенциал бруцелл определяется не только видовой принадлежностью [10, 20, 34], но и инфицирующей дозой, индивидуальной чувствительностью макроорганизма, а также особенностями иммунного ответа, включая клеточные и гуморальные механизмы [4, 15–18, 20, 21, 94].

Бруцеллез протекает в нескольких клинических формах, и наиболее часто на практике используется классификация Г. П. Руднева (1955), принимающая в расчет, как длительность течения болезни, так и степень тяжести (легкая, средней тяжести, тяжелая форма) и фазы – компенсации, субкомпенсации и декомпенсации процесса

в каждом отдельном случае заболевания [2]. Применительно этой классификации, выделяют скрытую, острую (до 3 месяцев), подострую (до 6 месяцев), хроническую (более 6 месяцев) и резидуальную (клиника последствий – более 2-3 лет) формы бруцеллеза [294].

Иммунопатогенез бруцеллеза включает последовательное прохождение нескольких фаз: лимфогенного заноса, связанная с первичным распространением возбудителя (инициальная фаза); гематогенного заноса, отражающая начало системного поражения организма (первичная генерализация); полиочаговых локализацией инфекции в различных органах и тканях; экзоочаговых обсеменений как проявление вторичной генерализации инфекционного процесса; резидуального метаморфоза, связанная с формированием морфологических изменений после активной стадии болезни [51, 59].

Входными воротами для бруцелл служат поврежденные участки кожных покровов или слизистых оболочек. После внедрения в организм микроорганизмы захватываются клетками моноцитарно-макрофагальной системы, где в результате незавершенного фагоцитоза часть возбудителей сохраняет жизнеспособность внутри фагосом (инициальная фаза). Внутриклеточная локализация позволяет бруцеллам избегать иммунного надзора. Размножаясь в эндоплазматическом ретикулуме макрофагов, патогены остаются недоступными для компонентов гуморального иммунитета.

Циркуляция возбудителя по лимфатическим путям приводит к его накоплению в регионарных лимфоузлах, где формируется первичный воспалительный очаг – так называемый бруцеллезный комплекс. На этом этапе происходит начальная иммунологическая перестройка организма, активизируется продукция специфических антител. Однако клинические проявления болезни отсутствуют – это период первичной латенции.

Интенсивное внутрилимфатическое размножение возбудителя создает предпосылки для его попадания в общий кровоток – что соответствует второй фазе инфекционного процесса, известной как гематогенная диссеминация или первичная генерализация. Эта стадия характеризуется развитием бактериемии и

эндотоксинемии, а также типичными клиническими проявлениями острой формы бруцеллеза: фебрильной лихорадкой, ознобами, гипергидрозом, увеличением множества мелких лимфоузлов и прочими признаками системного воспаления.

Следующая стадия – фаза полиочаговых локализаций – связана с гематогенным распространением бруцелл в органы, содержащих ткани моноцитарно-макрофагальной системы (печень, селезенка, костный мозг, лимфатические узлы). Здесь активируется местный иммунный ответ, который сопровождается формированием очаговых воспалительных изменений, скоплениями активированных макрофагов и внутриклеточной репликацией возбудителя. Эти процессы выполняют защитную функцию, направленную на ограничение бактериемии и локализацию инфекции.

Однако слабоэффективный фагоцитоз и способность бруцелл к внутриклеточному паразитированию приводят к гибели значительного числа фагоцитов. Высвобождающиеся бактерии продолжают циркулировать по организму лимфо- и гематогенным путем, вызывая дальнейшую генерализацию инфекции. Развиваются метастатические вторичные очаги в различных органах, представленные специфическими гранулемами. На фоне инфекционного процесса отмечается значительная иммуноаллергическая перестройка организма. Длительная персистенция бруцелл в макрофагальных клетках обусловлена несколькими ключевыми механизмами: незавершенным фагоцитозом, ингибированием апоптотических процессов в фагоцитах и замедленным развитием специфического иммунного ответа.

Завершающая стадия патологического процесса – резидуальный метаморфоз – связана с исходами воспалительных изменений. Она может проявляться как полной обратной эволюцией патологических очагов, так и формированием устойчивых фиброзных или рубцовых изменений в пораженных тканях, что способствует затяжному течению болезни и возникновению ее осложнений [6, 16–23, 50, 51, 82, 91, 136, 176, 217, 224, 258].

1.1.2 Особенности иммунного ответа при бруцеллезной инфекции

Для успешного преодоления как врожденных, так и адаптивных механизмов защиты организма, бруцеллы используют разнообразные стратегии, направленные на создание внутриклеточной среды, способствующей их длительному выживанию и репликации [112, 220]. На ранних этапах инфицирования патоген стремится минимизировать активацию факторов неспецифического иммунитета, снижая выраженность действия патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs – Pathogen Associated Molecular Patterns), что позволяет обеспечить незаметную колонизацию клеток системы мононуклеарных фагоцитов [188].

Распознавание указанных молекулярных структур осуществляется специфическими рецепторами, входящими в семейство рецепторов распознавания паттернов (pattern recognition receptors, PRR). К этому семейству относятся как трансмембранные толл-подобные рецепторы (TLR), так и цитозольные NOD-подобные рецепторы (NLR) [193, 201, 235]. Некоторые белковые структуры бруцелл обладают высокой степенью гомологии с компонентами хозяина, что затрудняет их идентификацию через TLR. Кроме того, отсутствие у этих микроорганизмов таких факторов вирулентности, как капсула, фимбрии или плазмиды, также снижает вероятность активации данных рецепторов [163].

Несмотря на это, сигнальный путь, связанный с TLR, все же участвует в распознавании бруцелл. Функциональная активация клеток проявляется секрецией ключевых провоспалительных цитокинов – таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкины IL-12, IL-6 и IL-1 β , а также усиленным представлением антигенов, что подтверждается экспрессией костимулирующих молекул CD80 и CD86, что имеет значение для формирования как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа [174].

Ключевую роль в развитии воспалительной реакции играют TLR4 и TLR9, функционирующие в комплексе с цитозольным адаптерным белком MyD88 [133, 134, 137, 163, 197, 231, 269, 289, 291]. Взаимодействие через эти пути запускает каскад сигнальных событий, приводящих к активации основных

транскрипционных факторов: NF-κB, AP-1 и интерферон-регуляторных факторов IRF3/IRF7 [240]. Данные экспериментальных работ демонстрируют важность взаимодействия TLR9 с белком-адаптером MyD88 в обеспечении эффективного иммунного ответа, направленного на устранение *B. abortus* и *B. melitensis* из пораженных макрофагов и дендритных клеток [158, 240].

Среди других компонентов, участвующих в распознавании бруцелл, особое внимание уделяется цитозольному рецептору NLRC4, который способен детектировать флагеллин бактерий и играть важную роль в контроле инфекции *in vivo* [281].

Одними из наиболее изученных PAMPs, участвующих в иммунном ответе против бруцелл, являются липополисахариды (LPS) [117, 246, 264]. Особенность LPS бруцелл заключается в уникальной структуре липида А, содержащего длинные цепи остатка жирных кислот (C28), в отличие от коротко цепочных аналогов у энтеробактерий (C12–C16). Такая модификация снижает его способность взаимодействовать с комплексом TLR4/MD-2, тем самым уменьшая активацию провоспалительных путей [117, 169, 250].

Кроме того, гликозилирование ядра LPS еще больше снижает его сродство к TLR4, что ограничивает активацию сигнальных каскадов [113, 141]. Также установлено, что О-полисахаридная часть LPS бруцелл препятствует полноценному связыванию компонента C3 системы комплемента, блокируя выработку противовоспалительных медиаторов C3a и C5a [113, 142].

Известно, что LPS штамма *B. abortus* в S-форме обладает выраженной иммуномодулирующей активностью. Эта молекула не подвергается деградации в фагоцитах, а перемещается к поверхности клетки, где образует макродомены с молекулами МНС II класса. Подобное взаимодействие снижает способность Т-лимфоцитов CD4⁺ распознавать антигены бруцеллы, что способствует ее персистенции [163].

Важное значение в активации врожденного иммунитета имеет CD14 – рецептор на поверхности макрофагов, взаимодействующий с LPS грамотрицательных бактерий посредством специфических белков-переносчиков.

Связывание LPS с CD14 инициирует каскад реакций, завершающихся активацией процессов фагоцитоза и синтеза цитокинов, включая IL -1, IL -2, IL -6, IL -12 и IL -18 [88, 112, 127, 264]. Так, например, липопроотеины OMP16 и OMP19 бруцелл активируют TLR2 и участвуют в формировании цитокин-зависимого воспаления [111].

Таким образом, LPS бруцелл на начальных этапах инфекции благодаря слабой иммуностимуляции помогает бактерии избегать распознавания со стороны врожденного иммунитета, а на более поздних стадиях оказывает иммуномодулирующее действие, что способствует хронизации процесса и длительной персистенции возбудителя [13, 127, 132, 169].

Бруцеллы способны существовать и размножаться как в профессиональных фагоцитах (моноциты, макрофаги), так и в непрофессиональных (трофобласты, фибробласты, дендритные клетки), а также в эпителиальных клетках [20, 21, 113, 116, 220, 276]. После преодоления слизистых барьеров они захватываются макрофагами и дендритными клетками [277]. Опсонизированные формы поглощаются через рецепторы комплемента, тогда как неопсонизированные взаимодействуют с лектиновыми и фибронектиновыми структурами [108]. Неопсонизированные бактерии могут эффективно размножаться внутриклеточно, в то время как опсонизация или активация макрофагов интерфероном- γ усиливает их внутриклеточное уничтожение [277].

Формирование бруцеллосодержащей вакуоли (*Brucella-containing vacuole*, BCV) происходит вскоре после поглощения бактерии. В этой среде с ограниченным доступом питательных веществ метаболическая активность бруцелл снижается, наблюдается замедление синтеза регуляторных белков и экспрессии генов [20, 101, 108, 113, 128, 138, 220]. Дальнейшее развитие жизненного цикла связано с последовательными трансформациями вакуоли: eBCV \rightarrow rBCV \rightarrow aBCV (эндоцитарная \rightarrow репликативная \rightarrow аутофагическая вакуоль). В этом процессе ключевую роль играют белки хозяина, такие как BECLIN1, VtpB, PI3K, ULK1 и Atg14L, которые обеспечивают завершение репликации и выход бруцелл для последующей диссеминации [245, 267, 268].

Еще одним механизмом уклонения от иммунного ответа является индуцированная нейтропения. На ранних стадиях инфекционного процесса бруцеллы поглощаются нейтрофилами, что приводит к неконтролируемому высвобождению липида А – компонента липополисахарида (LPS), – инициируя невоспалительный тип клеточной гибели этих гранулоцитов. Погибающие клетки служат «носителями» для распространения бруцелл по органам и тканям [42, 114].

Путем подавления функциональной активности нейтрофилов и снижения чувствительности к TLR-опосредованному распознаванию, бруцеллы предотвращают активацию адекватного антибактериального ответа, что значительно ослабляет иммунный контроль и способствует хронизации инфекции.

Особое значение в патогенезе имеет способность бруцелл подавлять апоптоз инфицированных макрофагов. Вирулентные штаммы обеспечивают выживание клеток-хозяев, в то время как аттенуированный штамм *B. abortus* RB51 индуцирует каспаза-2-зависимый апоптоз фагоцитов с одновременным повышением воспалительной реакции [30].

Первоначальная реакция врожденного иммунитета организма-хозяина не обеспечивает достаточного контроля над внутриклеточной репликацией бруцелл и не препятствует их персистенции в тканях. Одним из ключевых механизмов, обеспечивающих внутриклеточное выживание бруцеллы, является система секреции четвертого типа (T4SS), кодируемая *virB* опероном [42, 120, 141, 142]. Эта система играет важную роль в активации инфламмосомы, а также в транслокации специфических белков и ДНК-белковых комплексов в цитоплазму клетки-хозяина [113, 234].

Экспрессия компонентов T4SS у бруцелл зависит от условий среды, в частности, от окислительного стресса фагосомы после фагоцитоза [192, 221]. Всего в составе этой системы насчитывается 12 функционально значимых генов. Для S-форм бруцелл экспрессия T4SS необходима для миграции к репликативным нишам и успешной внутриклеточной репликации, тогда как для R-форм она имеет значение в реализации цитотоксического действия в макрофагах [112, 125, 215, 241, 288].

Помимо T4SS и LPS, в поддержании внутриклеточной жизнедеятельности бруцелл задействованы и другие факторы патогенности:

— циклический β -глюкан, входящий в состав внешней мембраны, способствует предотвращению слияния бруцеллосодержащей вакуоли с лизосомами, что позволяет избежать деградации бактерии [105, 163, 183, 196, 246, 277];

— двухкомпонентная регуляторная система BvrR/BvrS, которая управляет экспрессией генов, связанных с сохранением целостности клеточной стенки, метаболической адаптацией и внутриклеточной репликацией [98, 99, 150, 196, 211, 215, 219];

— регулятор VjbR (LuxR) – транскрипционный активатор lux-оперона, который контролирует экспрессию факторов вирулентности на начальных этапах инфицирования [196].

Активация врожденного иммунитета запускает формирование адаптивного антигенспецифического ответа. После фагоцитоза бактериальные пептиды, ассоциированные с МНС I и II, представляются Т-лимфоцитам. Распознавание этих комплексов Т-клеточными рецепторами приводит к активации антигенпрезентирующих клеток (АРС) и секреции IL-12, что стимулирует дифференцировку наивных Т-клеток в Th1-лимфоциты [214, 262]. Эти клетки продуцируют IL-2 и IFN- γ , которые играют ключевую роль в эрадикации бруцелл [255, 285].

Реализация иммунологической защиты при бруцеллезе тесно связана с развитием клеточного иммунного ответа, характеризующегося функциональной активностью антигенпрезентирующих клеток, поляризацией иммунного ответа в сторону Th1-фенотипа и генерацией цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов (CTL) [139, 253].

Согласно исследованиям Rafiei с соавторами (2006), на ранних этапах инфекции доминируют Th1-лимфоциты, но по мере прогрессирования болезни наблюдается переход к Th2-ответу, характеризующемуся продукцией IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 [251]. При этом снижается уровень IFN- γ , что свидетельствует о подавлении противовоспалительного иммунного ответа [106].

Противовоспалительные цитокины способствуют персистенции возбудителя и хронизации процесса [106, 148, 191], позволяя бруцеллам эффективно избегать иммунного надзора [112, 198, 211, 220].

Снижение количества регуляторных Т-клеток (Treg) с фенотипом CD25, как указывает Ganji A., может способствовать развитию Т-клеточной анергии и формированию хронической формы заболевания [165, 180, 218, 263]. Анализ цитокинового профиля показал, что Th2-доминантный ответ наблюдается как при остром, так и при хроническом течении бруцеллеза, что подчеркивает его значение в патогенезе инфекции [168].

Генерация провоспалительных цитокинов играет важную роль в поддержании бруцелл в тканях хозяина. С точки зрения иммунопатоморфогенеза, инфекционный процесс характеризуется развитием гранулематозного воспаления – механизма, обеспечивающего ограничение распространения патогена и рассматриваемого как компонент защитной реакции организма [142]. Эпителиоидные гранулемы чаще всего формируются в паренхиматозных органах – преимущественно в печени, селезёнке и костном мозге. Активные лимфоцитарно-макрофагальные узелки продуцируют IFN- γ , IL-12/23p40 и TNF- α , поддерживающие функциональную активность гранулёмы [213, 257].

Особое внимание уделяется роли белка флагеллина в развитии гранулематозного воспаления, поскольку он демонстрирует выраженную иммуногенную (сенсibiliзирующую) активность [42].

У пациентов с бруцеллезом регистрируются реакции гиперчувствительности двух типов: IgE-зависимая (немедленная) и лимфоцит-опосредованная (замедленная). Аллергические реакции начинают формироваться ещё в инкубационном периоде и достигают максимальной выраженности к завершению первого месяца заболевания [3, 36, 79]. Уровень сенсibilизации организма оказывает существенное влияние на клиническую картину и особенности иммунологических процессов, развивающихся при бруцеллезе [46].

Гиперчувствительность замедленного типа представляет собой одну из форм специфического иммунного ответа, которая способствует локализации и

устранению патогена через индукцию гранулематозного воспалительного процесса. [2, 8, 9 49, 54, 79, 81]. Исследования показали, что степень IgE-обусловленной аллергизации у больных острым бруцеллезом коррелирует с формированием иммуносупрессивного состояния [210].

Также было установлено, что высокая активность лимфоцит-опосредованной сенсibilизации имеет обратную зависимость с выраженностью иммунопатологических изменений. У пациентов с низкой степенью клеточной сенсibilизации наблюдалось снижение уровня общих Т-лимфоцитов до $60,87 \pm 1,25$ % ($p \leq 0,05$), Т-хелперов – до $30,1 \pm 2,38$ % ($p \leq 0,001$), CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов – до $19,18 \pm 2,2$ ($p \leq 0,05$), а также уменьшение концентрации общего иммуноглобулина G до $7,24 \pm 0,92$ мг/мл [66, 67, 77, 247].

Вне зависимости от способа проникновения возбудителей бруцеллеза в организм хозяина, патоген проникает в кровеносное русло, вызывая бактериемию и иммуновоспалительные реакции, имеющие системный характер. Стратегия приживаемости бруцелл в макроорганизме предполагает колонизацию профессиональных макрофагов. Благодаря низкой токсичности липополисахарида у бруцелл, способности к блокировке фагоцитоза, ингибированию дифференциации дендритных клеток и замедлению сигнализации Toll-подобных рецепторов (преимущественно TLR2, TLR4), происходит индукция неполноценной презентации антигенов МНС I и II, бруцеллы уклоняются от их распознавания и клиринга факторами естественного иммунитета [238].

Таким образом, благодаря широкому спектру факторов патогенности, бруцеллы успешно избегают Th1-опосредованного иммунного ответа и формируют длительную персистирующую инфекцию даже при активации защитных механизмов организма человека.

1.1.3 Роль гуморального и клеточного иммунитета в формировании противобруцеллезного иммунитета

Иммунный ответ при бруцеллезе характеризуется специфической клеточной защитой, которая развивается параллельно с реакциями гиперчувствительности замедленного типа. Исследования, проведенные на различных моделях лабораторных животных, естественных хозяев и человека, подтверждают ведущую роль Т-хелперного ответа 1 типа (Th1), а также провоспалительных цитокинов – таких как интерферон гамма (IFN- γ) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) – в обеспечении эффективного контроля бруцеллезной инфекции. [153, 167, 253, 265, 266, 280, 285].

Формирование защитного иммунитета при бруцеллезе связано с вовлечением в процесс профессиональных антигенпрезентирующих клеток (APC) – таких как дендритные клетки и макрофаги – и кооперацией CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов в рамках клеточного иммунного ответа [214, 285, 199]. Однако патоген обладает механизмами, позволяющими ему уклоняться от Th1-опосредованной иммунной защиты [253, 265, 266].

Одним из примеров такой стратегии является белок PrpA (пропил-рацемаза *B. abortus*), который способствует митогенной активации В-клеток и усиливает продукцию иммуносупрессивного цитокина IL-10 в ходе инфекционного процесса [265, 125, 126, 270, 278]. При этом экспрессия PrpA коррелирует со снижением уровня IFN- γ и TNF- α и повышением продукции TGF β 1 *in vivo*. Мутантные штаммы бруцелл, лишенные PrpA, демонстрируют сниженную способность к внутриклеточному выживанию, что подчеркивает значимость этого белка в патогенезе [265, 266].

У мышей бруцеллезная инфекция протекает с выраженным Th1-ответом, который обеспечивает эффективное элиминирование возбудителя. Ключевые цитокины – TNF- α , IFN- γ и IL-12 – играют центральную роль в инициации и поддержании этого типа иммунного ответа [197].

Анализ функциональной активности макрофагов человека, инфицированных *B. suis*, показал их способность продуцировать IL-1, IL-6, IL-10 и IL-8, но не TNF- α . Установлено, что внешнемембранный белок Omp25 участвует в подавлении секреции TNF- α , хотя механизмы регуляции этой активности остаются недостаточно изученными. Предполагается, что подавление TNF- α может блокировать аутокринную активацию макрофагов, тем самым ингибируя развитие Th1-ответа и ослабляя антибактериальные механизмы [236].

Еще одним важным элементом клеточного иммунитета являются трофобласты, которые служат основной мишенью для бруцелл у естественных хозяев и принимают непосредственное участие в патологических изменениях при инфекции [139, 223].

Наиболее эффективными эффекторными клетками в борьбе с бруцеллами считаются CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоциты, секретирующие IFN- γ , а также дендритные клетки, экспрессирующие индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS/NOS2). Их активация осуществляется через сигнальные пути TLR4/9 с участием адаптерного белка MyD88 [133, 134, 158, 199, 231, 269, 291].

На ранних этапах инфекции наблюдается увеличение числа V γ 9V δ 2 Т-лимфоцитов (T γ 9 δ 2), что характерно для большинства внутриклеточных инфекций. Эти клетки проявляют цитотоксическую активность, включая синтез перфоринов, гранзимов и гранулизинов, и участвуют в разрушении инфицированных фагоцитов посредством апоптоза [118, 144, 195, 279]. Однако бруцеллы способны противостоять этим механизмам: исследования *in vitro* показали, что дикие штаммы *B. suis* снижают активность T γ 9 δ 2, вероятно, за счет уменьшения распознавания инфицированных макрофагов и повышения их устойчивости к цитолизу [208].

Среди клеточных компонентов иммунной системы в патогенезе бруцеллеза значительная роль отводится НК-лимфоцитам (естественным киллерам), которые активируются в ответ на контакт с поражёнными макрофагами. Гуморальный иммунный ответ представлен преимущественно IgG2c-антителами, характеризующимися поликлональной направленностью. Установлено, что уровень формирования специфических антител в ответ на введение убитых

нагреванием клеток *Brucella abortus* (НКВА) зависит от функциональной активности НК-клеток больше, чем от концентрации IFN- γ или IL-12 [152, 233]. Анализ маркеров активации (CD69) позволил установить, что НКВА вызывает активацию спленоцитов, особенно заметную на НК-лимфоцитах.

Совместное действие НК-клеток и IL-2 способствует ограничению внутриклеточной репликации *B. suis*. Также важное значение имеет группа инвариантных НКТ-клеток (iNKT, фенотип CD3⁺CD16⁺CD56⁺), которые распознают гликолипидные антигены, представленные через молекулы CD1d. Эти клетки подавляют внутриклеточное размножение бруцелл, причем для их действия необходимо взаимодействие с CD1d на поверхности макрофагов [118, 119, 251].

Сравнительный анализ содержания iNKT-клеток у пациентов с острым и хроническим бруцеллезом выявил значительное увеличение их доли в периферической крови при острой форме – до $10,13 \pm 1,07$ %. У больных с хроническим течением количество этих клеток не отличалось от такового у здоровых лиц. Повышение уровня iNKT-клеток указывает на их компенсаторную роль при недостаточном иммунном ответе [69].

Цитокины выступают ключевыми регуляторами иммунного ответа. Формирование протективного иммунитета против *Brucella abortus* тесно коррелирует с активацией Th1-опосредованного ответа и секрецией провоспалительных цитокинов [125, 126, 265]. Напротив, высокий уровень противовоспалительных молекул, таких как IL-10 и TGF β 1, способствует персистенции бруцелл и хронизации инфекции [161, 266, 270].

Вместе с тем известно, что активированные провоспалительными цитокинами IFN- γ и TNF- α макрофаги более эффективны в отношении бруцелл, расположенных интрацеллюлярно. При этом именно IFN- γ отводится наиболее важная роль в поддержании пула активных профессиональных фагоцитов [130].

IFN- γ , являющийся ключевым индуктором Th1-ответа, продуцируется активированными Т-лимфоцитами и стимулирует макрофаги к секреции IL-12 [197]. В то же время IL-10 выполняет иммуносупрессивную функцию, регулируя баланс между Th1 и Th2 реакциями [125, 126, 270, 278]. Его повышенная продукция

во время бруцеллезной инфекции приводит к снижению активности IFN- γ -активированных макрофагов и угнетению защитного Th1-ответа, что способствует длительному существованию патогена в организме [278].

Таким образом, формирование противобруцеллезного иммунитета представляет собой сложный процесс, в котором задействованы как клеточные, так и гуморальные механизмы. Эффективная защита требует преобладания Th1-ответа и провоспалительных цитокинов, тогда как доминирование иммуносупрессивных факторов, таких как IL-10 и TGF β 1, способствует персистенции возбудителя и развитию хронического течения болезни.

Исследования на экспериментальных моделях демонстрируют, что продукция цитокина IL-10 CD4⁺ Т-клетками занимает ключевое место в регуляции функциональной активности макрофагов при бруцеллезе. У генетически модифицированных мышей, неспособных к выработке IL-10 или экспрессии его рецептора, отмечено снижение способности бруцелл к внутриклеточному выживанию в печени и селезенке, наряду с гиперактивацией провоспалительных сигнальных каскадов [137, 138, 142, 179, 278]. Одним из ключевых свойств IL-10 является его способность инициировать дифференцировку В-клеток в IgE-продуцирующие плазмоциты, что связано с развитием ранней аллергической сенсибилизации при инфекции [142].

Исследования Bahador с соавторами (2014) выявили увеличение популяции CD4⁺ Treg-клеток в периферической крови пациентов с бруцеллезом, особенно выраженной при хронической форме заболевания [110]. Эти клетки подавляют пролиферативную активность эффекторных Т-лимфоцитов, ограничивая их цитотоксическую функцию [100]. Дополнительно Treg-лимфоциты обеспечивают периферическую толерантность, контролируя аутореактивные клетки, которые избежали центральной селекции в тимусе [32, 260].

Острая фаза бруцеллеза сопровождается лимфоцитозом CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, одновременно с угнетением фагоцитарной активности нейтрофилов [152]. При хроническом течении развивается поляризация иммунного ответа в сторону Th2-фенотипа, характеризующегося повышением уровня В-лимфоцитов и

секрецией IgA/IgG. Преобладание Th2-активности подавляет Th1-опосредованный иммунитет, создавая условия для персистенции возбудителя [135, 228, 295].

Эффективная защита от бруцелл требует координированного участия Т- и В-лимфоцитов. В-лимфоциты реализуют двойственную функцию: они синтезируют нейтрализующие антитела, способные опсонизировать патогены, а также инициируют комплемент-зависимые механизмы иммунного ответа. Помимо этого, иммуноглобулины усиливают антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), осуществляемую макрофагами, нейтрофилами и естественными киллерами (NK-клетками) [262].

Вместе с тем известно [104], что антитела к О-полисахариду LPS бруцелл играют заметно меньшую роль в иммунологической защите от инфекции, чем клеточный иммунитет (фагоцитарные факторы, Т-лимфоциты, Т/NK). Активный антителогенез способствует снижению интенсивности диссеминации возбудителя, но не предотвращает развитие инфекции.

Кроме того, В-лимфоциты участвуют в регуляции Т-клеточных ответов за счет экспрессии костимулирующих молекул (CD80, CD86), секрецию цитокинов и взаимодействие с TLR-лигандами. При низкой антигенной нагрузке они действуют как антигенпрезентирующие клетки, активируя CD4⁺ Т-хелперы и регулируя их дифференцировку. Их иммуномодулирующая активность создает микроокружение, способствующее внутриклеточной персистенции бруцелл [171].

Фенотип В-клеток зависит от цитокинового окружения: в условиях Th1-ответа (IFN- γ , IL-12) формируются В-1 клетки, продуцирующие преимущественно IL-10, но не IL-4/IL-13. Th2-цитокины стимулируют развитие В-2 подтипа, секретирующего IL-4, IL-13 и лимфотоксин, но с минимальной продукцией IFN- γ [272].

Goenka с соавторами (2011) предположили, что В-лимфоциты усиливают выработку ИФН- γ при бруцеллёзе, способствуя эрадикации инфекции. Авторы также отметили, что нейтрализация иммуносупрессивных цитокинов (IL-10, TGF- β), продуцируемых В-клетками, улучшает микробный клиренс [172]. Повышенный

уровень TGF- β в инфицированных В-клетках коррелирует с хронизацией инфекционного процесса [147,171].

В динамике образования специфических иммуноглобулинов, таких как IgA, IgM, IgG, прослеживается определенная закономерность. Через неделю после развития заболевания появляются иммуноглобулины класса М (IgM), концентрация которых достигает максимальных значений в течение первых нескольких недель, а затем постепенно снижается. На 2–3-й неделе заболевания начинают обнаруживаться сывороточные IgG к антигенам бруцелл, немногим позже – IgA. IgG и IgA детектируются с 2–3 недели, сохраняясь на высоком уровне в острой и хронической стадиях. Однако максимальная концентрация IgM наблюдается только в острой фазе. Подклассы IgG различаются по временному профилю: IgG1/IgG3 доминируют в острой форме, IgG4 – в хронической [172]. При хронизации инфекционного процесса отмечается снижение концентрации специфических иммуноглобулинов, и противобруцеллезные антитела выявляются в более низких титрах, чем в начале заболевания [103, 172, 272].

Отличительной чертой постинфекционного иммунитета является слабая напряженность и быстрое угасание, в результате которого организм человека, перенесшего бруцеллез, остается восприимчивым к повторному заражению, которое регистрируется в 8–7 % случаев [172, 272].

Таким образом, гуморальный иммунный ответ недостаточен для элиминации бруцелл, тогда как защита зависит от Th1-опосредованного клеточного иммунитета. Иммунодефицитные состояния, связанные с нарушением компонентов врожденного иммунитета – в частности, с дисфункцией фагоцитов, – ослабляют Th1-зависимый иммунный ответ и способствуют развитию Т-клеточной анергии, создавая тем самым условия для хронизации инфекционного процесса [95, 125, 126, 139].

1.2 Современные методы оценки напряженности противобруцеллезного иммунитета и диагностики бруцеллеза

В Российской Федерации специфическая профилактика бруцеллеза основана на вакцинации по эпидемиологическим показаниям, которая включена в Национальный календарь профилактических прививок и осуществляется в соответствии с действующими нормативными документами в области иммунопрофилактики [55].

Обязательной вакцинации подлежат взрослые (с 18 лет) из групп профессионального риска, включая сотрудников бактериологических лабораторий, работающих с живыми культурами бруцелл и зараженными животными [93], при отсутствии анамнестических данных о перенесенной инфекции и отрицательных результатах серологических и аллергических тестов [77].

Вакцина, созданная на основе аттенуированного штамма *Brucella abortus* 19ВА, индуцирует нестерильный иммунитет, характеризующийся формированием латентной инфекции, которая в дальнейшем может трансформироваться в стерильный постинфекционный ответ. Максимальная напряженность защитного иммунитета развивается только у 66–75 % привитых и достигает пика через 5–6 месяцев после вакцинации. Однако к 6–8 месяцам уровень защиты снижается и сохраняется лишь у 36–41 % вакцинированных, что обосновывает необходимость ревакцинации не ранее чем через 12 месяцев после первичной иммунизации [19, 26, 35].

Согласно МУ 3.1/4.2.4145-25, перед вакцинацией (включая ревакцинацию) проводится комплексное обследование, включающее серологические (реакция Райта или ИФА) и аллергологические тесты (проба Бюрне или цитометрический анализ активации базофилов), за 30 дней до иммунизации [76, 93]. Тем не менее, современные исследования указывают на ограниченную чувствительность этих методов в выявлении специфических антител у вакцинированных или переболевших пациентов [20, 90].

Серологические методы

Реакция агглютинации (РА), предложенная Райтом и Семплом в 1897 году, остается важным инструментом для ретроспективного анализа и оценки иммунного статуса вакцинированных лиц [15, 79]. Максимальные титры РА ($\geq 2+$ при разведении 1:100) регистрируются через 1–2 месяца после инфицирования, однако их уровень быстро снижается, что ограничивает ценность метода для диагностики хронической формы [22].

Модифицированная методика Хеддльсона (Huddlson I.F., 1943; Кайтмазова Е.И., 1945) позволяет проводить экспресс-диагностику на стекле с использованием неразведенной сыворотки и концентрированного антигена [102]. Однако ее применение ограничено невозможностью отслеживания динамики титров, требующей подтверждения в реакциях Райта, Кумбса или пробе Бюрне [20].

Иммуноферментный анализ (ИФА) демонстрирует высокую чувствительность и специфичность: совпадение результатов IgM/IgG в ИФА с титрами РА составляет 88,5%, а отрицательные данные в обоих тестах фиксируются лишь в 9% случаев [187, 216, 237]. IgM ассоциированы с острой фазой, тогда как IgG более информативны для подострого и хронического течения.

Ограничения серологических методов включают низкую чувствительность на ранних стадиях и снижение специфичности в регионах с высокой эндемичностью [107].

Аллергологические методы

Развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) служит основой аллергической диагностики. Проба Бюрне, разработанная во второй половине XX века, основана на внутрикожном введении бруцеллина и оценке отечно-болевого реакции через 24–48 часов [37, 71]. Она высоко специфична, но выявляется позже антител и сохраняется годами после клинического выздоровления [20].

Недостатки пробы Бюрне включают риск ложноположительных результатов, дополнительную аллергизацию и побочные эффекты (лихорадка, лимфаденит, некроз в месте инъекции). Метод также противопоказан в острой фазе болезни и при выраженной сенсibilизации [289].

С конца XX века разрабатываются безопасные альтернативы пробе Бюрне:

- радиоаллергосорбентный тест (РАСТ);
- микроскопическая оценка дегрануляции базофилов при окраске щелочными красителями;
- определение гистамина (метод Шелли);
- тест аллергической альтерации лейкоцитов;
- выявления специфических Ig E.

Однако эти методы ограничены трудоемкостью или низкой чувствительностью [53, 75, 121, 145, 284, 286, 289].

Метод проточной цитометрии для исследования дегрануляции базофилов, сопровождающейся экспрессией поверхностного маркера CD63, был впервые применен Sainte-Laudu и коллегами еще в 1994 году [145]. На основе этой технологии Пономаренко Д.Г. с соавт. (2012–2013 гг.) разработали цитометрический метод *in vitro* для диагностики бруцеллеза, направленный на выявление сенсibilизации организма к антигенам [65, 66].

Таким образом, на напряженность противобруцеллезного иммунитета серологические методы только косвенно могут указывать, а проба Бюрне имеет ряд недостатков. Так как ряд исследователей [10, 16, 44] указывают на ведущую роль в защите организма от бруцелл клеточного звена иммунитета, следовательно, напряженность антибактериального иммунитета при бруцеллезной инфекции обуславливается не гуморальным, а Т-клеточным иммунитетом. Учитывая это, актуальными становятся методы оценки Т-клеточного иммунитета *in vitro* с использованием автоматизированных систем анализа [25, 43, 66].

1.3 Клеточная антигенспецифическая реактивность как маркер иммунной защиты при инфекционных заболеваниях

Т-клетки играют ведущую роль в адаптивном иммунном ответе против патогенов, биологический цикл которых предполагает внутриклеточную локализацию и персистенцию. Кроме того, Т-лимфоциты постоянно кооперируют с внеклеточным окружением (растворимыми анализитами) и другими клетками.

Состояние плазматической мембраны лимфоцитов играет существенную роль в этой связи, так как она экспрессирует множество рецепторов, которые способны детектировать внеклеточные сигналы путем связывания растворимых медиаторов, а также в результате распознавания лигандов, экспонирование которых осуществляется другими клетками. Иммунологическое проецирование различных рецепторов на плазматической мембране во многом контролируется эндоцитозом, активным процессом, при котором небольшие области плазматической мембраны интернализуются и формируют везикулы, которые подвергаются гомотипическому слиянию с образованием ранних эндосом [160].

Благодаря иммунорегуляторным цитокинам и медиаторам осуществляется Т-клеточная антигениндуцированная активация, обусловленная взаимодействием антигена с TCR, связанным с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). При этом связывание между TCR и антигенными детерминантами эволюционно имеет относительно низкую аффинность, то есть зачастую может формироваться перекрестная реакция, когда несколько TCR распознают один и тот же антигенный пептид, и многие антигенные пептиды распознаются одним и тем же Т-клеточным рецептором [160, 182].

TCR остается одним из самых сложных рецепторов в клетках млекопитающих, и механизм его запуска до конца не изучен. Как октамерный комплекс, TCR включает антигенсвязывающую субъединицу ($TCR\alpha\beta$) и три сигнальные субъединицы CD3 ($CD3\zeta\zeta$, $CD3\delta\epsilon$ и $CD3\gamma\epsilon$). TCR способен различать различные комплексы рМНС, интегрировать эту разнообразную информацию и преобразовывать ее в соответствующие сигнальные каскады, инициируя Т-клеточный иммунный ответ, а также ассоциированную с ним иммунную реакцию макроорганизма [151, 283]. К одной из ключевых особенностей передачи сигналов TCR можно отнести его высокую чувствительность, которая в первую очередь относится к распознаванию антигена. При этом даже в очень низкой концентрации агонистов рМНС достаточно, чтобы вызвать активацию TCR [185].

Клеточная антигенспецифическая реактивность представляет собой один из ключевых функциональных показателей клеточного иммунитета,

характеризующий способность Т-лимфоцитов специфически реагировать на чужеродные антигены возбудителей. Этот параметр отражает уровень сформированности адаптивного иммунного ответа и может служить важным маркером эффективности противoinфекционной защиты [7, 73, 92, 157, 243, 256].

Современные подходы к лабораторной диагностике бруцеллеза требуют интеграции методов, ориентированных на оценку клеточных механизмов иммунитета, поскольку они играют центральную роль в формировании защитного ответа и патогенезе инфекции [17, 229, 273]. Развитие технологий клинической лабораторной диагностики позволило внедрить высокоточные инструментальные системы, включая проточные цитофлуориметры, которые обеспечивают комплексный анализ клеточных популяций и растворимых биомаркеров. Преимущества проточной цитометрии включают высокую чувствительность (обнаружение единичных клеток в образце), возможность мультиплексного анализа (одновременное определение до 20+ параметров на одной клетке), автоматизацию процессов регистрации и обработки данных, а также стандартизацию протоколов с контролем качества на всех этапах исследования [23, 164].

Взаимодействие иммунной системы с антигенами приводит к формированию сенсibilизированного состояния – специфической гиперчувствительности, которая служит ключевым диагностическим критерием перенесенной инфекции. Этот феномен лежит в основе методов, направленных на выявление антигенспецифического иммунного ответа, активно разрабатываемых с конца XX века. Современные технологии позволяют оценивать не только уровень специфических антител, но и функциональную активность лимфоцитов, включая экспрессию активационных молекул (CD69, CD25, HLA-DR), продукцию цитокинов (IFN- γ , IL-2, TNF- α) и пролиферативный потенциал клеток [261].

Активация Т-лимфоцитов в ответ на антигенную стимуляцию сопровождается каскадом внутриклеточных событий: от модуляции сигнальных путей (например, MAPK, NF- κ B) до транскрипционной регуляции генов, кодирующих рецепторы и эффекторные молекулы. На поверхности активированных клеток последовательно экспрессируются маркеры ранней (CD69,

CD25, CD71) и поздней (HLA-DR) активации, а также молекулы апоптоза (Fas, FasL), что отражает динамику иммунного ответа [48, 261]. Для количественной оценки этих процессов используются методы иммунофенотипирования, сочетающие окраску клеток флуорохромными антителами с анализом на проточных цитометрах.

Антиген-специфическая стимуляция клеток *in vitro* сопровождается изменением метаболической активности: повышением гликолиза, синтезом медиаторов воспаления (NO, цитокинов) и рекомбинацией антигенных рецепторов. Эти изменения служат основой для разработки тестов, оценивающих напряженность клеточного иммунитета. Например, определение уровня внутриклеточных цитокинов методом ICCS (*Intracellular Cytokine Staining*) или измерение пролиферации с использованием дифференциации клеток CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) позволяет оценить функциональную готовность Т-клеток к эрадикации патогена. [25, 43].

Экспериментальные исследования демонстрируют перспективность клеточных тестов для диагностики особо опасных инфекций. Так, сотрудники Гарвардской медицинской школы показали, что совместное культивирование CD4⁺ Т-лимфоцитов с дендритными клетками в присутствии протективного антигена *Bacillus anthracis* приводит к активации Т-хелперов и продукции специфических цитокинов, что коррелирует с защитным иммунитетом у модельных животных [259]. Аналогичные подходы применены в работах В.И. Дубровиной и соавт., где поверхностные антигены сибиреязвенного микроба использовались для стимуляции макрофагов *in vitro*. Установлено, что макрофаги иммунных животных демонстрируют повышенный синтез NO в ответ на специфический антиген, что может служить маркером эффективного клеточного иммунитета [27–29].

Показано, что одним из ключевых биомаркеров ранней активации Т-лимфоцитов является поверхностная экспрессия CD25 – α -субъединицы рецептора интерлейкина-2 (IL-2R α). Эта молекула играет двойную роль: она усиливает сигналы IL-2, необходимые для пролиферации и дифференцировки Т-клеток, а также служит индикатором сенсibilизации в реакции бласттрансформации

лимфоцитов (РБТЛ) [31, 242, 263]. CD25 образует высокоаффинный гетеротримерный комплекс с β - и γ -цепями рецептора (CD122 и CD132 соответственно), что позволяет даже низким концентрациям IL-2 эффективно запускать внутриклеточные сигнальные пути (JAK-STAT, MAPK) и активировать гены, связанные с клеточным циклом [232, 271]. Примечательно, что экспрессия CD25 особенно высока на регуляторных Т-клетках (Treg), где она способствует их супрессорной функции, в отличие от эффекторных Т-хелперов, где их уровень временно возрастает после активации [178].

HLA-DR: маркер поздней активации и координации иммунного ответа, представитель II класса главного комплекса гистосовместимости (МНС), обеспечивает презентацию пептидных антигенов CD4⁺ Т-клеткам. Его экспрессия на поверхности лимфоцитов коррелирует с длительной активацией и дифференцировкой клеток в эффекторные фенотипы [159, 184, 203]. В отличие от CD25, HLA-DR сохраняется на клетках в течение нескольких недель, что делает его надежным индикатором хронического воспаления или персистирующей инфекции [115, 194]. Современные исследования подчеркивают, что HLA-DR также участвует в межклеточных взаимодействиях: он модулирует ко-стимуляторные сигналы через связывание с CD40L на Т-клетках, что критично для формирования долгоживущих клеток памяти [261].

Рецептор трансферрина (CD71) отражает метаболическую готовность лимфоцитов к пролиферации. Его экспрессия возрастает через 48–60 часов после антигенной стимуляции, что связано с повышенной потребностью в железе для синтеза ДНК и РНК [96, 149, 177, 205]. CD71 обеспечивает эндоцитоз комплекса трансферрин-железо, который используется для производства нуклеотидов и гема. Дефицит CD71 приводит к нарушению клеточного цикла, что демонстрирует его роль в энергетическом обеспечении иммунного ответа [129, 177].

Среди маркеров ранней активации особое место занимает CD69 – С-лектиновый рецептор, экспрессируемый уже через 2–4 часа после стимуляции. Он участвует в ретенции лимфоцитов в лимфоидных органах и регулирует секрецию цитокинов (IFN- γ , IL-17) [83, 84, 143, 175, 222, 181, 290]. Исследования

В.В. Фирстовой показали, что CD69 может служить чувствительным индикатором клеточного иммунитета к особо опасным инфекциям, таким как туляремия и сибирская язва, где традиционные серологические тесты имеют ограниченную применимость [162]. Кроме того, CD69 подавляет миграцию Т-клеток через ингибирование рецептора S1P1, что усиливает локальный иммунный ответ [293].

Определение апоптоза при активации лимфоцитов митогенами является наиболее информативным при условии параллельной оценки пролиферативного ответа клеток на тот же стимул. Среди маркеров апоптоза наибольший интерес представляет рецептор апоптоза CD95 (FAS, APO-1), интенсивность экспрессии которого указывает на активацию иммунных клеток и их готовности к FAS-индуцированному апоптозу [244]. Функциональным связующим элементом для данного рецептора выступает его лиганд – тримерная молекула FasL (CD178), относящаяся к семейству факторов некроза опухоли (TNF). Связывание Fas с FasL приводит к активации сигнального каскада, завершающегося апоптозом целевой клетки. Рецептор CD95, являющийся молекулой Fas, экспрессируется на мембране множества клеточных популяций и играет важную роль в реализации механизма программируемой гибели клеток. Наиболее выражена его локализация на Т-хелперах, активированных В- и Т-лимфоцитах, тимоцитах, фибробластах и гепатоцитах. Уровень экспрессии на покоящихся Т-клетках остается низким, однако при их активации он возрастает примерно в десять раз [33]. При этом экспрессия FasL характерна исключительно для активированных Т-лимфоцитов [154, 287]. CD95 регулирует апоптоз активированных Т-клеток, предотвращая аутоиммунную патологию.

Современные исследования демонстрируют, что активация Т-лимфоцитов сопровождается следующей последовательностью экспрессии поверхностных антигенов: CD69 (С-лектиновый рецептор) → CD25 (α-цепь IL-2R) → CD71 (рецептор трансферрина) → HLA-DR (МНС II класса) → CD95 (Fas-рецептор). На основании имеющихся данных молекулы CD25, CD69 и CD71 классифицируют как маркеры ранней активации лимфоцитов, тогда как экспрессия HLA-DR и CD95 ассоциируется с более поздними этапами клеточной активации [45, 52].

Антигенспецифические тесты, такие как анализ экспрессии активационных маркеров (CD25, HLA-DR, CD69 и др.), позволяют оценить функциональную активность лимфоцитов *in vitro*. Эти методы особенно ценны для диагностики инфекций с серонегативным течением, где дефекты гуморального иммунитета затрудняют использование стандартных ELISA-тестов [52].

Учитывая вышеизложенное, весьма актуальными и востребованными являются разработка и внедрение антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки напряженности противобруцеллезного иммунитета и диагностики бруцеллеза с использованием современного высокоточного аналитического оборудования.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Экспериментальные модели

В качестве биомоделей для экспериментальных исследований использовали 650 аутбредных белых мышей линии SHK, предоставленных филиалом «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, МО (Московская область). Возраст животных составлял 6–8 недель, масса тела – 20 ± 2 г. Условия содержания и работы с лабораторными животными соответствовали положениям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 года, касающейся защиты животных, используемых в научных целях, а также «Правилам надлежащей лабораторной практики», утвержденным приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 [68]. Соблюдение этических принципов обеспечивалось путем применения всех возможных мер по минимизации болевых ощущений и стресса у животных. Содержание проводилось в соответствии с «Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментальных клиник (вивариев)» [60]. Для каждого срока взятия материала использовали от 6 до 12 особей, что позволяло достичь статистической значимости получаемых данных.

2.1.2 Клинический материал

Исследования проведены на биологическом материале от 518 добровольцев, разделенных на следующие группы:

— основная группа – пациенты с верифицированным диагнозом «бруцеллез», находившиеся на лечении в инфекционном отделении специализированного профиля по диагностике и лечению бруцеллеза МБУЗ «2-я Городская клиническая больница» г. Ставрополя;

— группа вакцинированных – лица, которые были иммунизированы против бруцеллеза вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19 ВА (НПО «Микроген», Россия) по эпидемическим показаниям;

— контрольная группа – лица без анамнестических данных о перенесенном бруцеллезе, не иммунизированные и не контактировавшие с возбудителем.

Критерии включения пациентов в группу лиц с острым бруцеллезом:

— верифицированный диагноз;

— среднетяжелое течение без очаговых поражений внутренних органов (фаза компенсации);

— продолжительность заболевания не более 6 недель.

Критерии включения пациентов в группу лиц с хроническим бруцеллезом:

— подтверждённый диагноз;

— хронический инфекционно-аллергический процесс с множественными очагами воспаления в различных системах организма;

— формирование функциональных нарушений (комбинированная форма);

— длительность течения от 1 до 2 лет.

Критерии включения пациентов в группу лиц с активным хроническим бруцеллёзом в период рецидива:

— подтверждённый диагноз;

— выраженные (манифестные) симптомы, характерные для активного хронического бруцеллеза (воспалительно-дистрофические процессы в опорно-двигательном аппарате, локомоторные нарушения и др.);

— обострения последствий заболевания.

Обследование проводилось в период с 2016 по 2025 год. В выборке мужчин составило 65%, женщин – 35%. Возраст участников колебался от 14 до 67 лет. Поскольку различия в изучаемых параметрах по полу и возрасту не достигали статистической значимости, данные были объединены в общую группу без учёта половой и возрастной принадлежности.

Взятие, транспортировка и обработка клинического материала

Взятие, транспортировка и первичная обработка образцов периферической крови осуществлялась в строгом соответствии с требованиями ГОСТ Р 53079.4-2008. Для обеспечения целостности клеточных популяций и сохранения функциональной активности лейкоцитов, образцы крови, предназначенные для проточно-цитометрического анализа, транспортировались в условиях строгой «холодовой цепи» (2–8 °С) и поступали в лабораторию не позднее 24 часов после взятия. Пробирки герметично закрыты, четко маркированы (уникальный идентификатор, дата и время забора) и упакованы в индивидуальные термостойкие контейнеры с термоконтролем.

Исследование антигенспецифической реактивности лейкоцитов *in vitro* не допускалось в следующих случаях:

- наличие видимого гемолиза или следов заморозки-оттаивания;
- присутствие неоднородных сгустков фибрина, свидетельствующих о нарушении антикоагулянтной обработки;
- превышение допустимого временного интервала между взятием и проведением анализа (более 24 ч), что может привести к апоптозу, спонтанной активации или деградациии клеточных субпопуляций.

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).

Работа с биоматериалом от лиц, инфицированных бруцеллой, осуществлялось в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [76].

2.1.3 Штаммы

Для заражения лабораторных животных применялись следующие штаммы:

- *Brucella melitensis* 16М;

- *Brucella melitensis* C-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.

2.1.4 Питательные среды и условия культивирования

Для выделения чистых культур бруцелл биоматериал высевали на плотную питательную среду Бруцеллагар и в жидкий Бруцелла-бульон. Посевы инкубировали в термостате при температуре $(37\pm 0,5)$ °С в течение 14 суток. Каждые два дня проводили контроль помутневших бульонов и последующий высев на скошенный агар. Посевы на агаре инкубировали также в течение 14 дней для полноценного роста культуры.

Работа с культурами бруцелл, биоматериалом от инфицированных животных, а также проведение иммунологических, биологических и бактериологических исследований выполнялись в соответствии с СанПиН 3.3686-21 [76], а также с методическими указаниями: МУ 3.1/4.2.4145-25 [93] и МУ 3.3.2.2124-06 [41].

2.1.5 Антигены микроорганизмов

Для стимуляции клеточных реакций *in vitro* применяли следующие антигены:

- Бруцеллин жидкий – аллерген бруцеллезный, содержащий 3,8–5,4 мкг белка на 100 мкл раствора (рег. № ЛС-002624, ФГУП «НПО Микроген», Россия);
- Антигенный бруцеллезный полисахаридно-белковый комплекс, выделенный из вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА, концентрация белка – 5 мг/мл (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия);
- Тулярин жидкий – аллерген туляремийный (рег. № ЛСР-009941/08, АО НПО «Микроген», Россия);

— Туберкулин очищенный в стандартном разведении (рег. № ЛСР-002841/07, ФГУП СПБНИИВС ФМБА, Россия);

— Антраксин – сибирязвенный антиген, гидролизат на основе штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1 (экспериментальная серия, производство ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Методика получения антигенного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса для клеточных тестов *in vitro*

Антигенный комплекс (АБПК) получали в соответствии с разработанным нами способом, описанным в патенте РФ № 2708561 «Способ получения бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro*» методикой. В качестве продуцента использовали вакцинный штамм *Brucella abortus* 19 ВА. Культивирование проводили на агаре Альбими в три последовательные генерации по 48 ± 1 ч при температуре 37 ± 1 °С. Для увеличения биомассы заключительную (четвертую) генерацию выращивали в течение 72 ± 1 ч при тех же условиях.

Бактериальную культуру снимали с питательной среды изотоническим раствором NaCl (0,9 %), собирали в стерильные флаконы и подвергали двукратной инактивации холодным ацетоном (-40 ± 1 °С, 48 ± 2 ч). Полную инактивацию подтверждали посредством посева обезвреженной биомассы на селективную среду Бруцеллагар с инкубацией в течение 14 суток при 37 °С; отсутствие роста микроорганизмов свидетельствовало о достижении стерильности.

Инактивированную биомассу высушивали при комнатной температуре (18–20 ч), после чего экстрагировали 2,5 % раствором NaCl в течение 24 ч при температуре 18–25 °С. Полученный экстракт центрифугировали при 17 200 g в течение 40 мин. Осадок ресуспендировали в изотоническом фосфат-буферном растворе (рН 7,2) и подвергали механическому лизису с использованием гидравлического дезинтегратора Х-25: материал замораживали при -40 °С на 12 ч,

а затем четырёхкратно продавливали через калиброванное отверстие патрона дезинтегратора.

После лизиса суспензию повторно центрифугировали при 17 200 g в течение 40 мин. Супернатант (АБПК) расфасовывали в стерильные ампулы, замораживали при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (19 ± 1 ч) и лиофилизировали при температуре не выше $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 22 ± 2 ч. Готовый лиофилизат герметично запаивали в атмосфере очищенного воздуха и хранили при температуре $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ до момента использования в экспериментальных исследованиях.

Контроль бруцеллезного антигена:

1. рН – $7,2 \pm 0,2$ (потенциометрия).
2. Лизис клеток – отсутствие интактных бактерий в ≥ 10 полях зрения (микроскопия).
3. Концентрация белка – $5,0 \pm 0,5$ мг/мл (спектрофотометрия, 280 нм). Белки ОМР – от 10,91 до 112,47 кДа; содержание примесных нуклеиновых кислот (ДНК) в препарате – $100,06 \pm 2,16$ мкг/мл, $\approx 30\%$ от общего количества белка; моно- и дисахариды: D-глюкоза, галактозамин, сахароза, лактоза, ксилоза, галактоза, рамноза, арабиноза, фруктоза.
4. Специфичность – отсутствие перекрестных реакций с *E. coli*, *V. cholerae*, *F. tularensis*, *Y. enterocolitica*, *S. typhimurium* (ИФА).
5. Специфическая активность в ИФА - 100 нг/мл.
6. Активность – титр $\geq 1:64$ в РИД с гипериммунной сывороткой (титр реагента $\geq 1:16$).

Функциональная активность – $\text{CD3}^+\text{CD25}^+$ в Т-лимфоцитах мышей ($n \geq 15$), иммунизированных 19-ВА ($3,4-4,6 \times 10^8$ ж.м.к.):

– контроль: $\leq 20\%$,

– опыт: $\geq 50\%$ (на 14-й день после иммунизации).

7. Стабильность: лиофилизат при $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ – не менее 12 месяцев, восстановленный при минус $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ – не менее 3 месяцев.

Подробное описание разработанного метода получения и контроль бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro* изложены в подготовленных

нами методических рекомендациях МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллёза у людей» (утв. Роспотребнадзором 19.08.2020).

2.2.2 Метод оценки антигенспецифической активации Т-лимфоцитов *in vitro*

Для характеристики клеточного иммунного ответа на бруцеллезный антиген применяли метод *in vitro* стимуляции Т-лимфоцитов антигенным бруцеллезным полисахаридно-белковым комплексом. Данный подход позволяет выявить присутствие и количество антигенспецифических Т-лимфоцитов в периферической крови.

Основные механизмы

Взаимодействие антигена с Т-клеточным рецептором специфических CD3⁺ Т-лимфоцитов запускает каскад внутриклеточных сигнальных реакций. Это включает активацию фосфолипазы С, последующее расщепление фосфатидилинозитолдифосфата на диацилглицерол и инозитолтрифосфат, а также повышение концентрации внутриклеточного кальция. Эти процессы обеспечивают активацию транскрипционных факторов, необходимых для синтеза интерлейкина-2 (IL-2) и экспрессии генов, связанных с активацией и дифференцировкой Т-клеток.

На поверхности активированных Т-лимфоцитов появляются маркеры активации – CD69, CD25, CD71 (ранние), HLA-DR и CD95 (поздние). Их экспрессия служит надежным маркером антигенспецифического иммунного ответа [45, 52].

Методика выполнения

1. В подготовленные пробирки вносили по 50 мкл цельной крови.
2. В опытную пробу добавляли 50 мкл АБПК, в контрольную – равный объём стерильного 0,9% изотонического раствора натрия хлорида.
3. Каждую пробу дополняли 100 мкл культуральной среды RPMI-1640 с L-глутамином.

4. Пробы перемешивали и инкубировали 24 ч при 37 ± 1 °С в атмосфере 5–10 % CO₂.
5. После инкубации удаляли надосадочную жидкость, оставшийся осадок ресуспендировали.
6. По 50 мкл каждой культуры переносили в отдельные пробирки для окрашивания антителами к CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺, CD3⁺HLA-DR⁺ и CD3⁺CD95⁺.
7. Инкубация с антителами проводилась 15 мин при комнатной температуре.
8. Затем добавляли 450 мкл лизирующего раствора (в разведении 1:10) и выдерживали 5–10 мин.
9. Пробы центрифугировали при 700 g в течение 5 мин, удаляли супернатант.
10. Отмывку проводили дважды в буфере, после чего клетки ресуспендировали в 450 мкл отмывочной среды.
11. Анализ выполняли на проточном цитофлюориметре в течение 2–3 часов после завершения процедуры, используя программное обеспечение CellQuest или аналогичное.

Расчет результатов

Уровень интенсивности экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺ и/или CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺, CD3⁺HLA-DR, CD3⁺CD95⁺) рассчитывают с использованием коэффициента стимуляции (КС) по формуле [7]:

$$КС = \frac{(C-D)}{C} \times 100 \% , \quad (1)$$

где С – относительный уровень содержания в крови активированных Т-лимфоцитов в опытной пробе (после инкубации с бруцеллезным антигеном);

Д – относительный уровень в крови активированных Т-лимфоцитов в контрольной пробе (после инкубации с без антигена).

Интерпретация данных

- КС менее 50 % указывает на отсутствие выраженного антигенспецифического ответа – отрицательная реакция;
- КС 50 % и более свидетельствует о наличии пула специфических Т-лимфоцитов, способных к распознаванию данного антигена – положительная реакция.

Таким образом, метод позволяет не только зафиксировать факт контакта иммунной системы с возбудителем, но и количественно оценить долю антигенреактивных Т-лимфоцитов в исследуемом клиническом образце. Повышение уровня активированных Т-лимфоцитов может быть обусловлено бруцеллезной инфекцией и формированием иммунитета после вакцинации.

2.2.3 Цитометрический анализ экспрессии активационных молекул на поверхности лимфоцитов

Для анализа фенотипических характеристик клеточных популяций и выявления степени их активации применяли метод проточной цитометрии. Этот подход позволяет одновременно определять наличие и уровень экспрессии нескольких поверхностных маркеров на различных субпопуляциях лимфоцитов человека и лабораторных мышей.

Исследование проводили с использованием моноклональных антител к следующим маркерам:

- CD69 – ранний индикатор активации;
- CD25 – маркер пролиферативной активности;
- CD71 – трансферриновый рецептор, связанный с метаболической активацией;
- HLA-DR – маркер поздней дифференцировки;
- CD95 (Fas) – молекула, связанная с апоптозом и регуляцией иммунного ответа;
- CD178 (FasL) – мембранный белок, Fas-лиганд, играет ключевую роль в регуляции апоптоза

Все антитела были конъюгированы с флюорохромами FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5 или APC (Beckman Coulter) и применялись согласно рекомендациям производителя.

Условия регистрации и параметры анализа

Измерения проводились на двух моделях проточных цитофлюориметров: FACSCalibur (Becton Dickinson, США), оснащённый программой CellQuest Pro; FACS Canto™ II (Becton Dickinson, США), работающий с программным обеспечением BD FACSDiva 6.0.

Для каждого образца регистрировали не менее 10 000 событий, что позволяло достоверно оценивать относительное содержание редких клеточных субпопуляций.

На первом этапе анализа проводилось пространственное разделение клеток по параметрам светорассеяния – FSC (forward scatter) и SSC (side scatter). Эта процедура позволила отделить лимфоциты от других клеточных элементов крови, основываясь на различиях в размерах и внутренней структуре (рисунок 1)

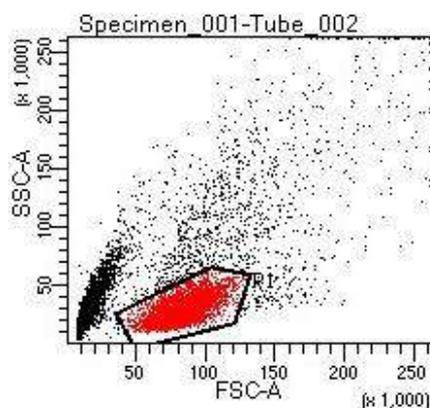
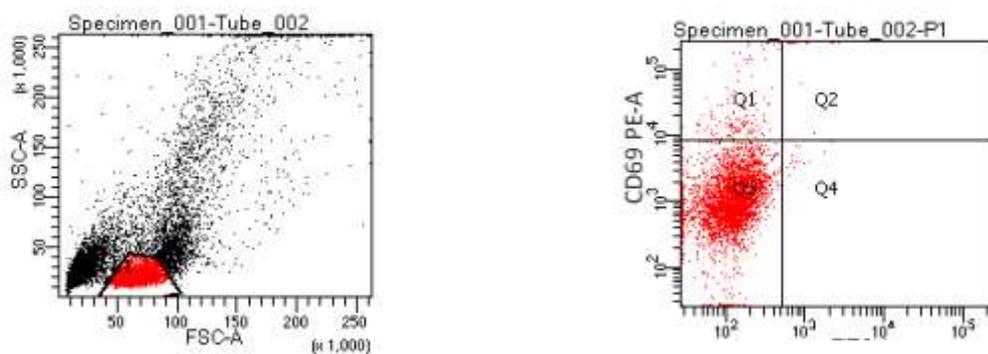


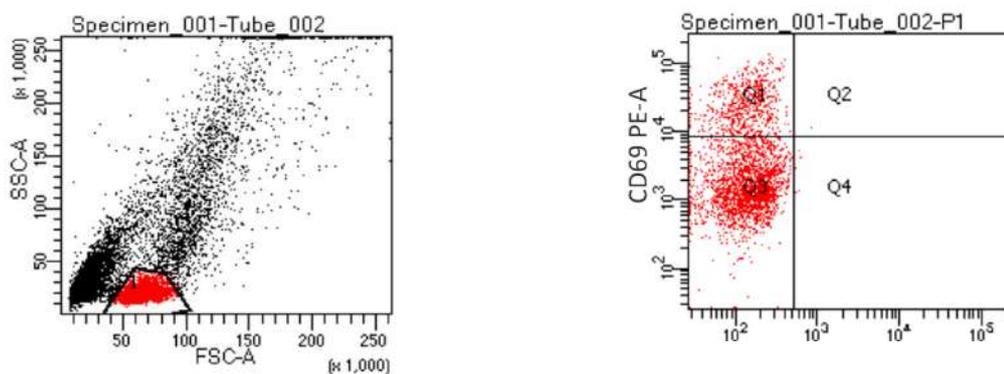
Рисунок 1 – Стратегия гейтирования зоны лимфоцитов по FSC и SSC каналам.

После этого проводили выделение клеточных субпопуляций посредством гейтирования с использованием характерных поверхностных маркеров.

В ходе экспериментов проводилось сравнение количественных изменений в субпопуляциях клеток, несущих определённые поверхностные маркеры, под действием антигенов у интактных и иммунизированных животных (или у добровольцев) (рисунок 2).



После стимуляции 0,9% NaCl



После стимуляции АБПК

Рисунок 2 – Пример цитометрического учета результатов реакции активации лимфоцитов в условиях *in vitro* после стимуляции 0,9% NaCl и АБПК (CD3⁺CD69⁺).

2.2.4 Методы оценки инфицированности и иммунного ответа у биомоделей

Для объективной количественной оценки инфекционного процесса и эффективности формирования иммунного ответа у лабораторных животных использовали следующие параметры:

- Индекс инфицированности (ИИ);
- Индекс интенсивности обсеменения внутренних органов (ИИОВО);
- Средний геометрический титр специфических антител (СГТ).

Индекс инфицированности

Для определения степени распространения возбудителя в организме экспериментальных животных рассчитывали индекс инфицированности по формуле:

$$\text{ИИ} = \frac{(a \times 100)}{(b \times c)}, \quad (2)$$

где a – число выделенных культур бруцелл из исследуемых образцов;

b – количество животных в группе;

c – число анализируемых органов или тканей, взятых от одной особи.

Результат выражали в процентах и использовали для сравнительного анализа уровня заражённости между различными экспериментальными группами [38, 70].

Индекс интенсивности обсеменения внутренних органов

Для более детальной характеристики степени поражения внутренних органов применяли индекс интенсивности обсеменения, который рассчитывали, как отношение суммы баллов, соответствующих интенсивности роста бруцелл, к общему числу исследованных объектов, умноженному на максимальное значение используемой шкалы.

Интенсивность роста оценивали по четырехбалльной системе:

- 4 балла – массивный рост;
- 3 балла – умеренный;
- 2 балла – слабый;
- 1 балл – минимальный.

Этот показатель позволяет оценить степень микробной колонизации и активности инфекционного процесса в различных органах и тканях [38, 70].

Определение среднего геометрического титра антител (СГТ)

Для характеристики гуморального иммунного ответа у биомоделей проводили реакцию агглютинации с применением «Диагностикума бруцеллёзного жидкого» (ФСР 2008/03141, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Россия).

Полученные абсолютные значения титров антител переводили в логарифмическую шкалу (\log_2) [93]. Применение данного метода обеспечивает

высокую точность и воспроизводимость при оценке динамики специфического гуморального ответа у лабораторных животных.

2.2.5 Оценка функциональной активности фагоцитов

Функциональное состояние фагоцитирующих клеток крови исследовали с применением ряда цитохимических реакций, отражающих уровень метаболической активности и содержание ключевых ферментов и биологически активных веществ в полиморфноядерных лейкоцитах (ПМЯЛ) и лимфоцитах. Для анализа использовали мазки крови, взятые у экспериментальных животных из сердца с помощью микрошприца, после чего окрашивали и микроскопировали при увеличении $\times 90$ (масляная иммерсия), окуляр $\times 10$, с использованием оранжевого или синего светофильтров.

Для каждого образца анализировали 100 ПМЯЛ. В каждой клетке оценивали интенсивность окраски, соответствующую содержанию определенного фермента или биологически активного соединения, и рассчитывали средний цитохимический коэффициент [40].

Для комплексной оценки состояния клеточного звена иммунитета, а также активности кислородзависимого метаболизма фагоцитов использовали тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест), выполняемый согласно общепринятой методике. Данный метод позволяет оценить способность нейтрофильных гранулоцитов генерировать реактивные формы кислорода в ответ на стимуляцию, что служит важным показателем их функциональной готовности. Подсчитывали процент клеток, содержащих гранулы формазана, а также вычисляли средний цитохимический коэффициент [40].

Параллельно проводили подсчет общего количества лейкоцитов по модифицированному методу Меньшикова В.В. (2001), который основан на лизисе эритроцитов и окрашивании ядер лейкоцитов специальным реагентом [39].

Анализ лейкоцитарной формулы позволял оценить относительное и абсолютное содержание различных популяций белых кровяных телец, включая

нейтрофилы, лимфоциты и моноциты. Для оценки степени системного воспаления и напряженности иммунного ответа рассчитывали лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) по методике Островского В.К. (1983) [57]. ЛИИ представляет собой интегральный показатель, отражающий соотношение между зрелыми и юными формами нейтрофилов, а также уровнем мононуклеаров, что может свидетельствовать о выраженности эндогенной интоксикации [4].

2.2.6 Содержание катионных лизосомальных белков

Активность катионных белков (КБ) в нейтрофилах оценивали по методу В. Е. Пигаревского (1978) в модификации В.М. Сафроновой, Н.А. Локтева, С.М. Руднева (1994):

1. Мазки фиксировали в метиловом спирте в течение 5 минут.
2. Инкубировали в забуферированном спиртовом растворе прочного зеленого при рН 8,1–8,2 в течение 45 мин.
3. Промывали дистиллированной водой, докрашивали азуром II.

Анализировали наличие и интенсивность зеленой окраски гранул в цитоплазме ПМЯЛ. Интенсивность реакции оценивали полуколичественно по шкале L. Karlow с модификацией G. Astaldi и L. Verga. При этом каждому уровню окраски соответствовал определённый балл, что позволяло количественно оценить уровень катионных белков в клетках [40].

2.2.7 Активность миелопероксидазы

Для выявления миелопероксидазы использовали модификацию метода В.Б. Лецкого (1973):

1. Мазки фиксировали в спирт-формоле.
2. Промывали дистиллированной водой.
3. Инкубировали в смеси бензидина и этилового спирта с добавлением 3% раствора перекиси водорода.

4. Промывали, контрастно окрашивали азуром II, высушивали и микроскопировали.

Положительная реакция проявлялась в виде желтовато-коричневых гранул в цитоплазме нейтрофилов. Учет результатов проводился аналогично предыдущему методу – с подсчетом положительных клеток и расчетом цитохимического коэффициента [40].

2.2.8 Активность сукцинатдегидрогеназы

Активность митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в лимфоцитах определяли цитохимическим методом по Нарцисову Р.П. (1969), основанным на взаимодействии фермента с субстратом – натриевой солью янтарной кислоты (сукцинатом) в присутствии п-нитротетразолия фиолетового, в результате чего образуются нерастворимые фиолетовые гранулы – продукты реакции. Учет проводили при масляной иммерсии (увеличение $\times 900$), подсчитывая в каждом случае не менее 30 лимфоцитов. Результат выражали как среднее количество гранул на одну клетку [40].

2.2.9 Активность кислой фосфатазы

Активность кислой фосфатазы в лимфоцитах определяли по методу А. Гольдбергу и Т. Барка (1965):

1. Мазки инкубировали в реакционной среде, содержащей нафтол As-E-фосфат.
2. Проявляли продукт реакции с последующим окрашиванием.

Реакция считалась положительной при появлении розового окрашивания цитоплазмы. Интенсивность окрашивания оценивали по шкале L. Karlow (единицы цветности), где:

- 0 – отсутствие окрашивания;
- 1 – слабое;
- 2 – умеренное;

- 3 – интенсивное.

Этот подход обеспечивает объективную оценку лизосомальной активности лимфоцитов и может коррелировать с их цитотоксической активностью [40].

2.3 Оценка цитокинового профиля

Для характеристики системного воспалительного ответа и оценки иммунорегуляторных механизмов у биомоделей определяли уровень ключевых цитокинов в сыворотке крови:

- фактора некроза опухоли- α (TNF- α);
- интерлейкина-6 (IL-6);
- интерлейкина-10 (IL-10);
- прокальцитонина (PCT).

Измерения проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА/ELISA) с использованием коммерческих наборов реактивов для мышей (*Mouse ELISA Kits*) производства Cloud-Clone Corp (Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Каталожные номера использованных наборов:

- TNF- α – SEA133Mu;
- IL-6 – SEA101Mu;
- IL-10 – SEA128Mu;

Концентрацию прокальцитонина в сыворотке белых мышей определяли с использованием коммерческого ELISA-набора для мыши (Mouse Procalcitonin ELISA Kit, ElabScience, каталожный номер E-EL-M0691).

Определение специфических антител к Brucella у человека

Серологическую диагностику бруцеллёза у обследованных лиц проводили с применением агглютинативных реакций Хеддельсона и Райта с использованием Бруцеллезного диагностикума РУ ФСР2008/03141 (СтавНИПЧИ, Россия) и твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием в сыворотке крови с использованием тест-систем «ИФА-ВЕКТОР-БЕСТ» (ЗАО Вектор-Бест, Россия).

Измерения выполнялись на полуавтоматическом ИФА-ридере BIORAD iMark с программным обеспечением Zefira версия 4.0. Уровень окрашивания регистрировали по значению оптической плотности раствора при длинах волн от 405 до 650 нм, что позволяет точно количественно оценить концентрацию цитокинов в исследуемых образцах.

Полученные данные использовали для анализа динамики провоспалительных и противовоспалительных компонентов иммунного ответа, а также для выявления корреляционных связей между показателями клеточного и гуморального иммунитета и степенью выраженности инфекционного процесса.

2.4 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:

- $|r| \leq 0,3$ – слабая связь;
- $0,3 < |r| < 0,5$ – умеренная связь;
- $|r| \geq 0,7$ – сильная корреляция.

Дополнительно использовалась классификация Е. П. Голубкова [24], предполагающая более детальную градацию:

- 0,00–0,20 – отсутствие корреляции;
- 0,21–0,40 – очень слабая связь;
- 0,41–0,60 – слабая зависимость;
- 0,61–0,80 – умеренная корреляция;
- 0,80 – тесная связь между переменными.

Статистическую значимость различий считали подтверждённой при уровне $p \leq 0,05$. Также проводили регрессионный анализ (R^2) для выявления степени влияния уровня антигенспецифической реактивности $CD3^+$ лимфоцитов и среднего геометрического титра антител (СГТ) на такие показатели, как: индекс инфицированности (ИИ), индекс интенсивности обсеменения внутренних органов (ИИОВО).

Эти данные позволили установить функциональные зависимости между параметрами иммунного ответа и выраженностью инфекционного процесса у животных после заражения патогенным штаммом *Brucella*.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Разработка антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки антигенреактивности Т-лимфоцитов при бруцеллезной инфекции

3.1.1 Анализ возможности и перспективы применения технологии проточной цитофлуориметрии и антигенспецифической активации лимфоцитов *ex vivo* для диагностики бруцеллеза

В последние годы появилось значительное число исследований, подтверждающих ключевую роль отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов в формировании иммунного ответа на инфекционные агенты. Эти работы опираются на современные методы детекции и количественной оценки функциональной активности Т-клеток при стимуляции специфическими антигенами с применением высокоточного аналитического оборудования [157, 243, 256].

Основу данных методов составляет взаимодействие антигена с рецепторами иммунокомпетентных клеток, которое вызывает их активацию, сопровождающуюся развитием каскада реакций. Установлено, что в процессе активации на поверхности Т-лимфоцитов последовательно экспрессируются молекулы ранней и поздней активации, пролиферации и апоптоза [87, 97, 261].

Вместе с тем методических подходов для *in vitro* оценки антигенреактивности иммунного к бруцеллам макроорганизма не разработаны.

С целью предварительной оценки наличия принципиальной возможности применения современных методов проточной цитофлуориметрии и *in vitro* специфической активации Т-лимфоцитов антигеном, были проведены исследования на 36 больных с клинически подтвержденным острым бруцеллезом. Контрольную группу сформировали лица без анамнестических или лабораторных признаков контакта с возбудителем бруцеллеза, включая отсутствие фактов заболевания, переноса инфекции или введения антибруцеллезной вакцины (32 человека).

Коммерчески доступного бруцеллезного антигена для клеточных антигенспецифических тестов *in vitro* в Российской Федерации нет. Для постановки теста на основе реакции активации базофилов *in vitro* (аллергологический тест *in vitro*) и цитометрического анализа нами клинически апробировано и предложено использование в качестве аллергена (антигена) «бруцеллин», производства НПО «Микроген» [1]. Для оценки активации Т-лимфоцитов анализировали интенсивность антигениндуцированной экспрессии рецептора IL-2Ra (CD25), HLA-DR, маркера индукции апоптоза и его лиганда – CD 95 и CD 95L (CD178).

Было установлено, что значения CD3⁺CD25⁺ без активации у обследуемых контрольной группы имели средние значения $10,42 \pm 1,22$ %, после инкубации с 0,9% изотоническим раствором натрия хлорида – $10,31 \pm 1,09$ %, бруцеллином – $12,32 \pm 0,36$ %. Без активации средние фоновые значения CD3⁺CD25⁺ в группе больных с острой формой бруцеллеза, составили $15,22 \pm 0,98$ %, при стимуляции изотоническим раствором натрия хлорида – $13,31 \pm 0,72$ %. При стимуляции бруцеллином наблюдалось статистически значимое увеличение количества активированных CD3⁺CD25⁺, средние значения которых составляли $19,58 \pm 1,24$ %, в сравнении с фоновыми значениями и при активации изотоническим раствором натрия хлорида, коэффициент стимуляции в среднем (KC_{mean}) составил 32,5 % ($p \leq 0,05$) (рисунок 3).

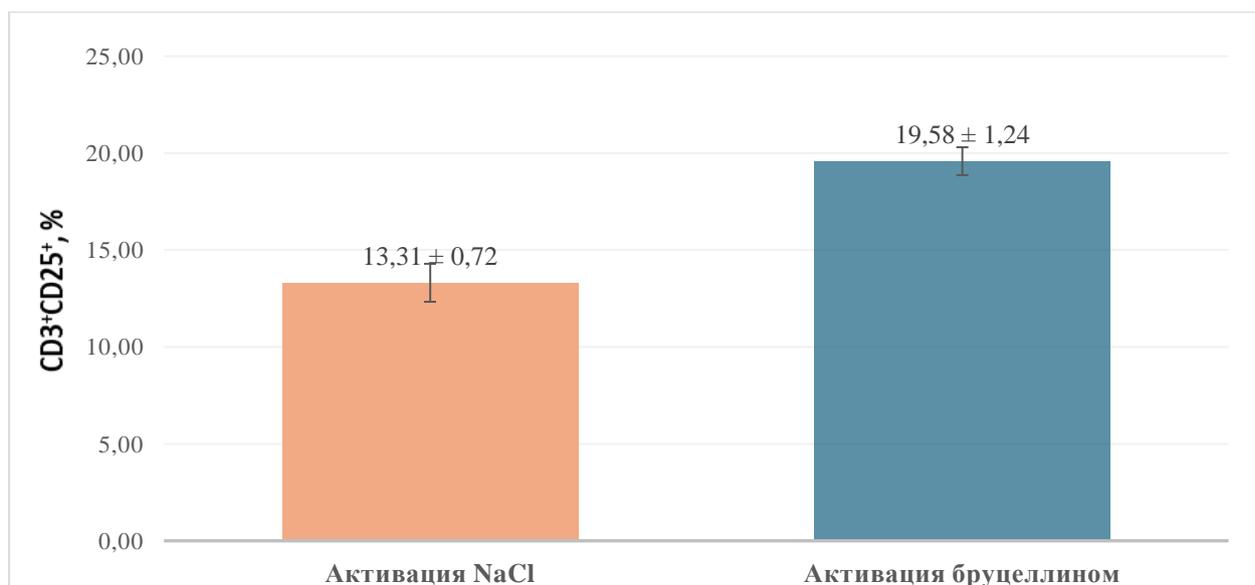


Рисунок 3 – Сравнительный анализ уровня CD3⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов у больных острым бруцеллёзом при активации изотоническим раствором натрия хлорида и бруцеллином.

Анализ полученных данных продемонстрировал, что у 77,8 % пациентов (28 человек) с острой формой бруцеллеза наблюдалось повышение доли активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор к интерлейкину-2 (IL-2), на величину, превышающую исходные (базовые) значения более чем на 10 %.

Средние уровни экспрессии Т-клеточных маркеров в ответ на антигенную стимуляцию в контрольной группе рецептора HLA-DR составили $23,75 \pm 2,41$ %, при инкубации с изотоническим раствором – $22,93 \pm 2,14$ %, бруцеллином – $26,15 \pm 1,12$ %. Средние фоновые значения экспрессии лимфоцитами HLA-DR у лиц с острой бруцеллезной инфекцией составили $33,84 \pm 2,71$ %, после инкубации со стерильным изотоническим раствором натрия хлорида – $36,12 \pm 2,07$ %, бруцеллином – $49,25 \pm 1,99$ %, $КС_{mean}$ – 26,6 %. У 58,3 % (21 человек) больных острым бруцеллезом отмечается увеличение более чем на 10 % доли пула клеток (рисунок 4).

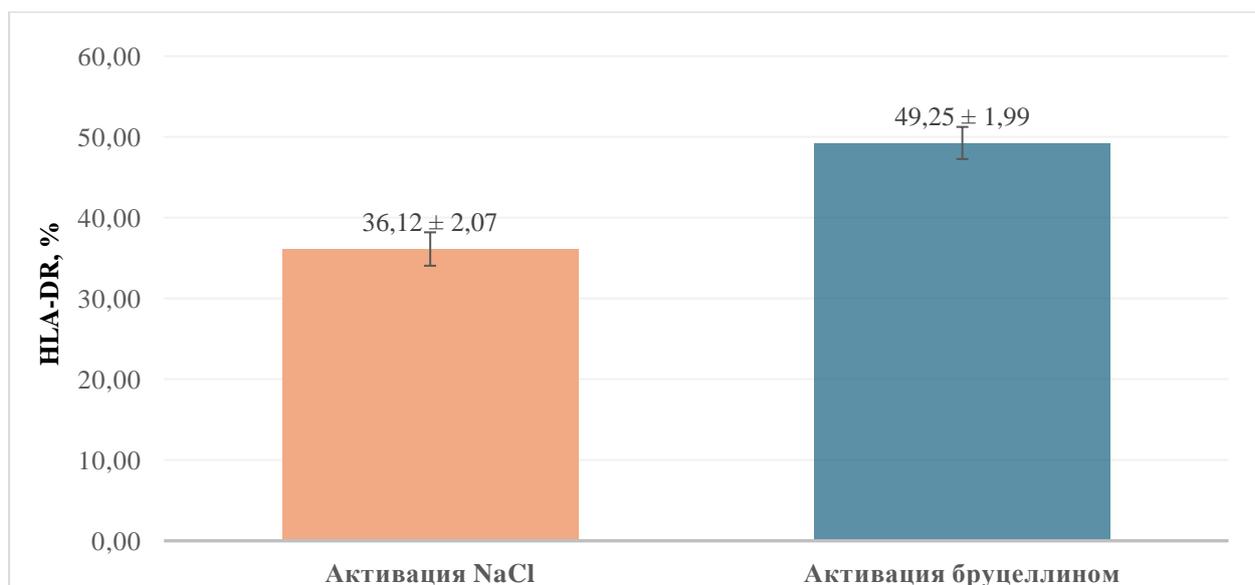


Рисунок 4 – Сравнительный анализ уровня HLA-DR Т-лимфоцитов у больных острым бруцеллёзом при активации изотоническим раствором натрия хлорида и бруцеллином.

Исследование фоновой и антигениндуцированной экспрессии Т-клетками апоптозного антигена 1 (CD95) позволило установить, что у лиц, неиммунных к возбудителю бруцеллеза, фоновое количество $CD3^+CD95^+$ в среднем составило $11,03 \pm 1,12$ %, после стимуляции смешанной культуры лейкоцитов изотоническим раствором натрия хлорида – $10,87 \pm 0,92$ %, бруцеллином – $11,05 \pm 0,77$ %. У больных острым бруцеллезом фоновые значения $CD3^+CD95^+$ составили в среднем – $21,92 \pm 2,12$ %, при стимуляции изотоническим раствором натрия хлорида – $22,88 \pm 2,16$ %, при антигенной стимуляции доля $CD95^+$ -позитивных лимфоцитов статистически значимо увеличилась в среднем до $33,51 \pm 2,15$ %, KC_{mean} – $31,7$ % ($p \leq 0,05$). Анализ показал, что у 80,5 % (29 человек) обследуемых с острым бруцеллезом наблюдалось антигениндуцированное увеличение более чем на 10 % доли лимфоцитов $CD3^+CD95^+$ (рисунок 5).

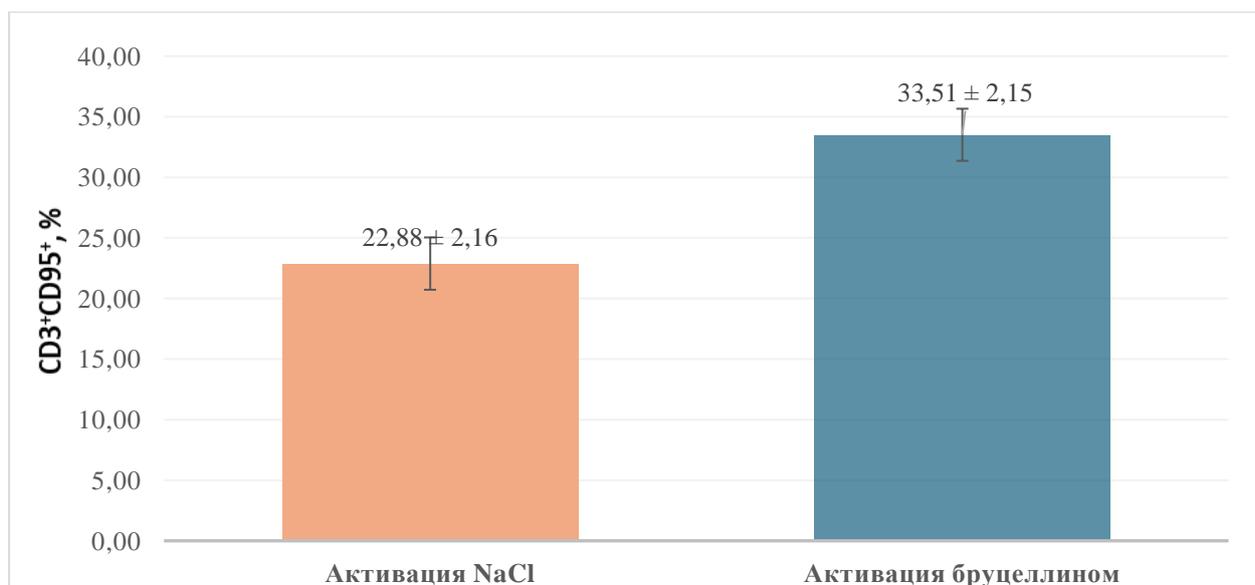


Рисунок 5 – Сравнительный анализ уровня CD3⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов у больных острым бруцеллёзом при активации изотоническим раствором натрия хлорида и бруцеллином.

Оценка антигенспецифической активности Т-клеток *ex vivo* на основании интенсивности экспрессии лиганда Fas (FasL) у клеток, несущих маркер CD95, выявил, что среднее фоновое значение CD 178⁺ в контрольной группе составил в среднем $0,61 \pm 0,11$ %, при инкубации с 0,9% изотоническим раствором натрия хлорида – $0,58 \pm 0,13$ %, после активации бруцеллином – $0,63 \pm 0,08$ %. В группе больных с диагнозом «острый бруцеллез» фоновое значение интенсивности экспрессии CD95L составило в среднем $1,18 \pm 0,13$ %, после инкубации смешанной культуры лейкоцитов со стерильным изотоническим раствором – $1,21 \pm 0,12$ %. Антигенная стимуляция с использованием бруцеллина привела к значимому росту популяции CD3⁺CD95L⁺ Т-лимфоцитов – более чем в два раза, в среднем до $2,23 \pm 0,22$ % ($KC_{\text{mean}} - 45,2$ %; $p \leq 0,05$). У подавляющего большинства больных острым бруцеллезом (86,1 %, n=31) выявлено увеличение доли активированных CD3⁺CD95L⁺ лимфоцитов на 10 % и более по сравнению с исходным уровнем (рисунок 6).

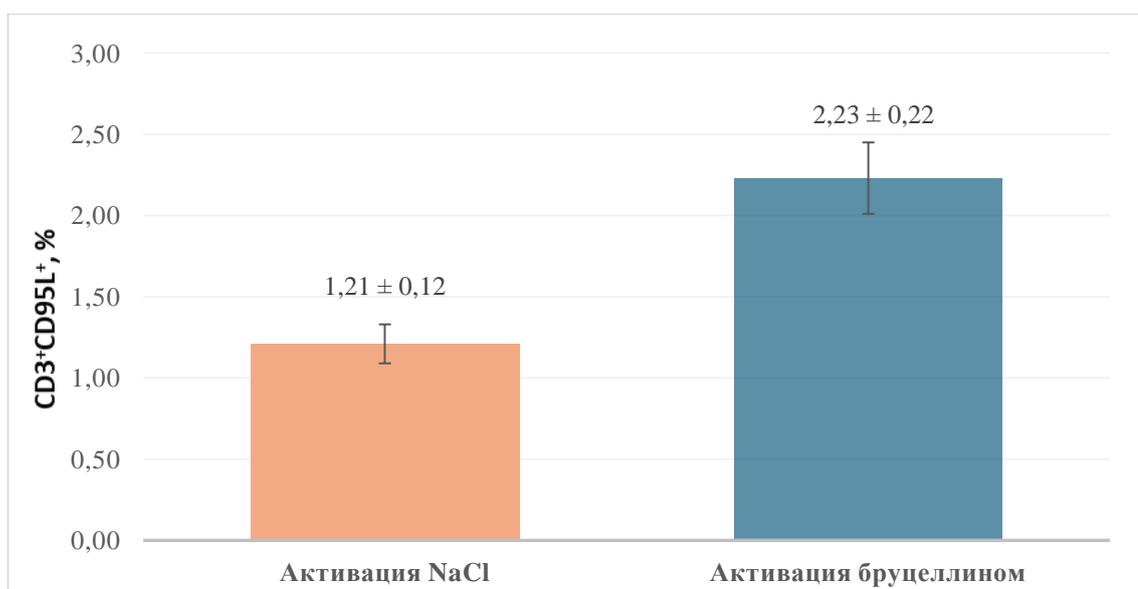


Рисунок 6 – Сравнительный анализ уровня CD3⁺CD95L⁺ Т-лимфоцитов у больных острым бруцеллезом при активации изотоническим раствором натрия хлорида и бруцеллином.

Таким образом, у 97,2 % (35 человек) обследуемых с острым бруцеллезом наблюдалось увеличение не менее, чем на 10 % интенсивности экспрессии хотя бы одного из изученных рецепторов активации (CD25, HLA-DR, CD95, CD95L). Средние значения КС варьировали от 26,61 % до 45,18 %. Вместе с тем, анализ *in vitro* антиген-стимулированной экспрессии активированных CD3⁺CD25⁺ выявил наиболее высокие значения. Также, отмечены высокие значения антигензависимой активации, о чем свидетельствует усиленная антигеном экспрессия FasL (CD178), принадлежащего семейству фактора некроза опухоли (TNF), который наиболее активно транслируется активированными цитотоксическими Т-клетками, что отражает, так называемую негативную активацию, при которой активированные клетки могут массово подвергаться индуцированному апоптозу.

Таким образом, результаты проведенных исследований указывают на реальную возможность и очевидную перспективу применения анализа антигензависимой активации Т-клеток в условиях *ex vivo* для выявления Т-клеточной иммунопревалентности (специфического клеточного иммунного ответа), что можно использовать для выявления (и/или верификации) у человека острой бруцеллезной инфекции.

Кроме того, анализ состояния антигенной активности Т-клеток и динамики количества клеточного пула праймированных CD3-лимфоцитов может позволить реализовать комплексный подход для оценки иммунологической реактивности, которая ассоциирована не только с формированием клеточной сенсibilизации (как диагностический маркер), но и с активностью иммунитета, в том числе его защитных (протективных) свойств.

3.1.2 Изучение возможности и перспективы применения технологии проточной цитофлуориметрии и клеточного антигенспецифического теста

При разработке методов постановки клеточных антигенспецифических тестов *in vitro* с высокими аналитическими характеристиками, особенно критичным является поиск активирующего антигена (комплекса антигенов), который бы обеспечивал оптимальный уровень активации TCR в *ex vivo* условиях с минимальным перекрестным эффектом.

Были проведены экспериментальные исследования по выявлению специфической активности коммерческого «Бруцеллина» в отношении *in vitro* стимуляции Т-лимфоцитов. Об активации судили на основании увеличения доли Т-лимфоцитов, экспрессирующих активационные молекулы CD69, CD25, MHC-II и CD95 после инкубации с антигеном. Обследование проводили на 90 самцах аутбредных белых мышах, иммунизированных штаммом *B. abortus* 19ВА. Контролем служили лабораторные животные, которым вводили стерильный изотонический раствор натрия хлорида в объеме, аналогичном вакцине. На 7, 14, 21 и 30 сутки после иммунизации производили забор крови.

Исследования на контрольных лабораторных белых мышах продемонстрировали, что коммерческий «Бруцеллин» не обладает неспецифическим стимулирующим эффектом на Т-лимфоциты и не вызывает неспецифической активации лимфоцитов в условиях *in vitro*. Уровень экспрессии маркеров активации Т-клеток не продемонстрировал статистически значимых различий после инкубации с изотоническим раствором натрия хлорида и

бруцеллином. После активации 0,9% изотоническим раствором натрия хлорида уровень экспрессии маркера CD69 составил в среднем $11,18 \pm 1,48$ %, CD25 – $2,89 \pm 0,22$ %, CD95 – $2,18 \pm 0,47$ % и МНС-II – $19,38 \pm 1,52$ %, при стимуляции бруцеллином эти показатели составляли $11,20 \pm 1,39$ %, $3,08 \pm 0,48$ %, $2,27 \pm 0,42$ %, и $19,95 \pm 1,23$ % соответственно (таблица 1).

Таблица 1 – Количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации при *in vitro* воздействии изотонического раствора хлорида натрия и бруцеллина у биомоделей, иммунизированных *Brucella abortus* 19 ВА

Сроки наблюдения	Исследуемые маркеры активации Т-лимфоцитов							
	CD3 ⁺ CD69 ⁺ NaCl (0.9%)	CD3 ⁺ CD69 ⁺ бруцелл ин	CD3 ⁺ CD25 ⁺ NaCl (0.9%)	CD3 ⁺ CD25 ⁺ бруцелл ин	CD3 ⁺ CD95 ⁺ NaCl (0.9%)	CD3 ⁺ CD95 ⁺ бруцелл ин	CD3 ⁺ МНС-II ⁺ NaCl (0.9%)	CD3 ⁺ МНС-II ⁺ бруцеллин
до иммуни- зации	11,18 ± 1,48	11,20 ± 1,39	2,89 ± 0,22	3,08 ± 0,48	2,18 ± 0,47	2,27 ± 0,42	19,38 ± 1,52	19,95 ± 1,23
7 сутки	21,47 ± 1,23	23,25 ± 1,98	2,99 ± 0,85	3,21 ± 0,27	9,25 ± 2,89	10,24 ± 2,51	27,98 ± 1,88	28,97 ± 1,83
14 сутки	25,69 ± 2,47	26,82 ± 2,71	2,74 ± 0,51	3,31 ± 0,24	10,25 ± 0,98	10,83 ± 2,72	26,35 ± 2,47	27,08 ± 1,74
21 сутки	12,47 ± 1,38	13,52 ± 1,52	2,02 ± 0,35	2,12 ± 0,28	9,87 ± 0,99	10,08 ± 1,24	26,04 ± 1,54	27,58 ± 1,92
30 сутки	15,81 ± 1,54	17,35 ± 1,14	3,65± 0,68	3,98 ± 0,75	6,89 ± 1,06	7,13 ± 1,44	25,27 ± 1,25	26,35 ± 1,587

При исследовании маркеров активации лимфоцитов после иммунизации белых мышей с использованием в качестве стимулятора *in vitro* коммерческого антигена бруцеллина не было установлено значимого повышения уровня лимфоцитов, экспрессирующих CD69⁺, CD25⁺, CD95⁺ и МНС-II во все сроки наблюдения (рисунок 7).

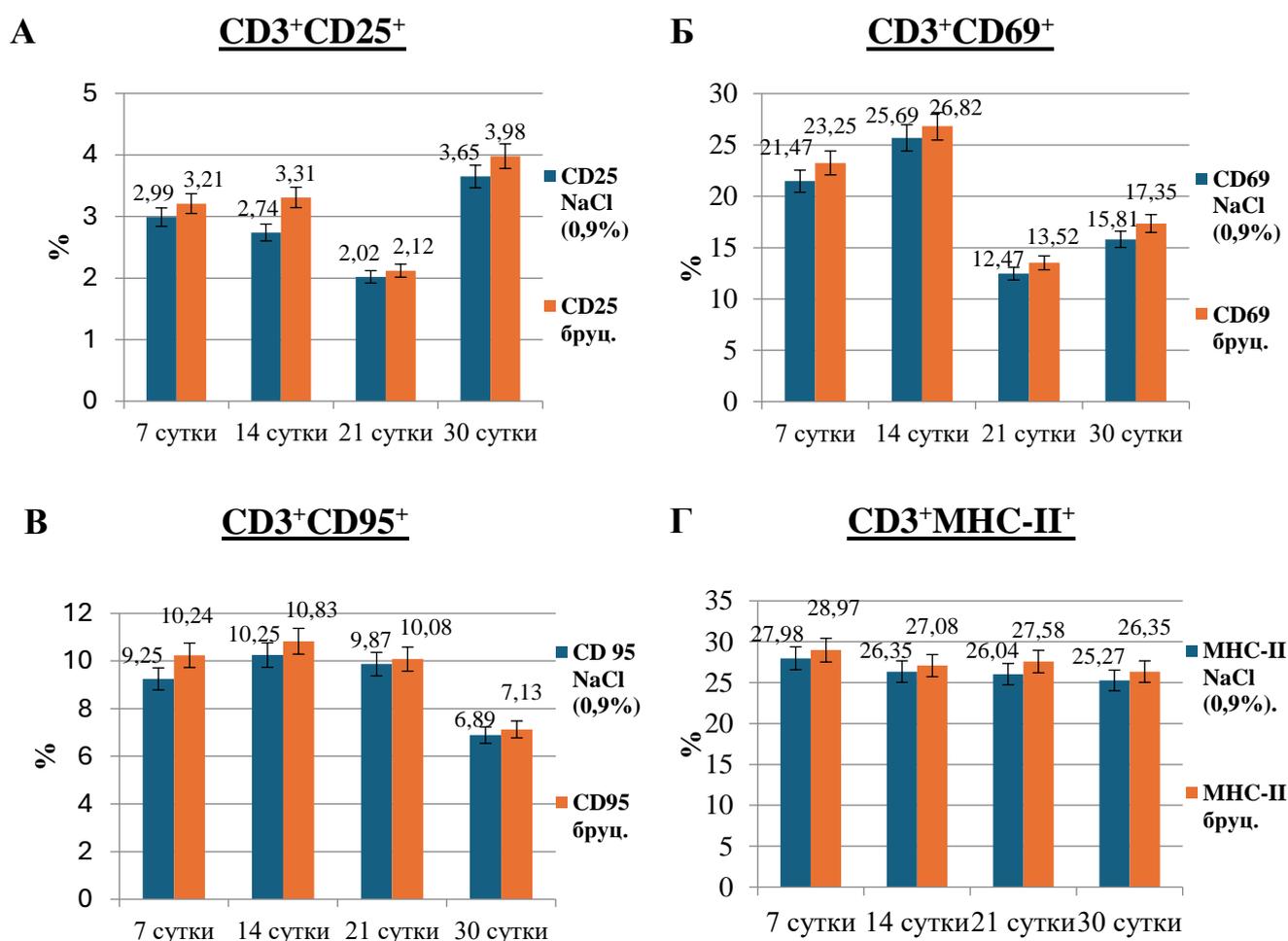


Рисунок 7 – Количество CD3⁺CD25⁺(А), CD3⁺CD69⁺(Б), CD3⁺CD95⁺ (В) и CD3⁺МНС-II⁺ (Г) лимфоцитов, у биомоделей, иммунизированных *Brucella abortus* 19 ВА (значения фоновые и после антигенной активации).

Анализ представленных результатов свидетельствует о низкой антиген-специфической активности бруцеллина в отношении стимуляции Т-лимфоцитов при *in vitro*-исследованиях. Вероятно, это связано с тем, что препарат представляет собой белковый комплекс продуктов жизнедеятельности бруцелл с низким содержанием антигенных пептидов с активными центрами и/или эпитопов (антигенсвязывающих субъединиц), связывающихся с TCR.

Таким образом, применение аллергена бруцеллезного бруцеллина в качестве стимулирующего агента для клеточного антигенспецифического теста не

позволяет в полной мере исследовать активность специфического Т-клеточного иммунитета к возбудителю бруцеллеза.

Известно, что Т-клеточный рецептор состоит из димеров TCR и CD3, взаимодействие между субъединицами Т-рецептора внутри димеров CD3 и контакт этих димеров с гетеродимером TCR могут быть пусковым механизмом, который будет инициировать активацию. Можно предположить, что присутствие TCR в кластерах влияет на стабильность комплекса антиген-эпитоп-рецептор и интенсивность сигнализации TCR, соответственно более интенсивную активацию.

Учитывая особенности взаимодействия TCR с антигеном, очевидно, что предпочтительнее использовать коктейль антигенов, из которых выраженное преимущество будут иметь везикулы/пептиды внешней мембраны, и что позволит обеспечить одновременное взаимодействие с несколькими активными специфическими центрами и, соответственно, инициировать активацию нескольких сигнальных путей, то есть воздействовать на Т-клетку комплексно.

В связи с вышеизложенным наши дальнейшие исследования были направлены на поиск высокоактивного специфического комплекса антигенов (антигенного препарата), обеспечивающих интенсивную селективную активацию Т-лимфоцитов в условиях *in vitro*.

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

3.1.3.1 Изучение качественных показателей экспериментальных серий различных образцов антигенного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса

Методический подход, использованный при разработке комплексного бруцеллезного антигенного препарата, был направлен на получение кроме компонентов S- LPS бруцелл (А- и М-антигенные детерминанты), других белков/пептидов наружной мембраны (липопротеины, ковалентно связанные с

пептидогликаном – OMP, везикулы – OMV и другие PAMPs), а также олигопептиды ABC-transporter periplasmic и комплексы эффекторных белков системы секреции IV типа, и других факторов патогенности, которые будут обладать комплементарностью с бруцелла-специфическими TCR [170].

Антигенный препарат получали из посевных культур *Brucella abortus* 19 BA IV поколения согласно способу, описанному в патенте РФ № 2708561 «Способ получения бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro*». Подробная методика представлена в разделе «Материалы и методы» и МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей».

Для стандартизации в ходе экспериментов было проведено изучение физико-химических свойств и антиген-активирующего потенциала *in vitro* экспериментальных серий трех различных АБПК: АБПК №1, АБПК №2 и АБПК №3.

Анализ спектров поглощения раствора АБПК №1 выявил характерные максимумы на длинах волн 218 и 260 нм, сопровождаемые выраженным минимумом в области 235–238 нм. Максимум поглощения АБПК №2 фиксировали при 216 и 262 нм, локальный минимум при 236-239 нм, а максимум поглощения АБПК №3 при 213 и 259 нм локальным минимумом 235-238 нм. Таким образом, было установлено совпадение спектров поглощения растворов экспериментальных серий различных образцов АБПК.

Результаты исследований экспериментальных серий трех различных АБПК свидетельствовал о присутствии примесей нуклеиновых кислот и белковых компонентов, так для образцов АБПК №1 – $A_{(260/280)} 1,86 \pm 0,05$, $A_{(260/230)} 0,84 \pm 0,06$ и $A_{(260/280)} 1,85 \pm 0,05$, $A_{(260/230)} 1,01 \pm 0,05$, АБПК №2 – $A_{(260/280)} 1,84 \pm 0,06$, $A_{(260/230)} 0,87 \pm 0,07$ и $A_{(260/280)} 1,87 \pm 0,04$, $A_{(260/230)} 1,03 \pm 0,05$ и $A_{(260/280)} 1,85 \pm 0,05$, $A_{(260/230)} 0,85 \pm 0,05$ и $A_{(260/280)} 1,86 \pm 0,05$, $A_{(260/230)} 1,02 \pm 0,05$, для АБПК №2. Полученные данные указывают, что в образцах АБПК содержится относительно малое количество нуклеиновых кислот по сравнению с концентрацией белков. Аналогичными являются результатами специфичной флуориметрии: в образцах

АБПК №1 концентрация белка составила $934,28 \pm 4,97$ мкг/мл, АБПК №2 – $919,38 \pm 3,74$ и АБПК №3 – $746,18 \pm 5,22$ мкг/мл; содержание ДНК – $100,13 \pm 2,12$ мкг/мл, $110,03 \pm 2,26$ мкг/мл, и $11,09 \pm 0,03$ мкг/мл, соответственно. Наличие ДНК в препаратах АБПК №3 существенно ниже, чем в других образцах. При дальнейшем изучении экспериментальных серий АБПК было отмечено, что антигенный комплекс №3 обладал более выраженным активирующим потенциалом и большей специфичностью, соответственно был более комплементарен молекулам TCR.

Результаты исследования методом капиллярного электрофореза образцов АБПК №1 и №2 были схожи по изучаемым параметрам, в каждом из которых содержалось шесть белков (молекулярная масса от 9,25 до 45,72 кДа) преимущественно низкомолекулярных (до 14 кДа). Исследования показали, что гораздо гетерогенным по составу и содержанию белков (молекулярная масса от 10,89 до 112,52 кДа) с преобладанием субфракции белков молекулярной массой 25-33 кДа (преимущественно 33 кДа) оказались серии образца АБПК №3.

Можно предположить, что в составе серии образца АБПК №3 преобладают белки наружной мембраны (OMP), имеющие молекулярную массу 31-34 кДа и 25-27 кДа и относящиеся к пориновым белкам группы 2 и 3 соответственно.

Известно, что пориновые белки Omp2a и Omp2b кодируются генами с высокой степенью (более 85%) гомологии omp2a и omp2b соответственно, OMP группы 3 кодируются генами omp25 и omp31 [131]. Указанные OMP, относятся к иммуногенным белкам, инициируют *in vitro* выраженную пролиферацию Т-клеток ($CD4^+$, $CD8^+$) и индукцию синтеза IFN- γ , IL2, IL6 и др. [206, 292].

Кроме того, доказана эффективность включения различных OMP в качестве компонентов для субъединичных вакцин против бруцеллёза, что свидетельствует о их рецептор-опосредованной иммунологической активности. Также, известна способность OMP обеспечивать *in vivo* индукцию экспрессии антигена CD45 для клеток CD4, которая необходима для формирования иммунологической памяти и генерирует антигенспецифический вторичный сигнал для активации Т и В-клеток [186, 239].

3.1.3.2 Сравнительный анализ специфичности и специфической активности различных экспериментальных серий антигенного бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса в клеточных тестах *in vitro*

Для оценки специфической активности серий АБПК: №1, №2 и №3 осуществляли постановку клеточных антигенспецифических тестов. По результатам исследования нами определен наиболее перспективный антигенный комплекс для использования при оценке антигенреактивности Т-лимфоцитов *in vitro*.

Проведение антигенспецифического теста осуществлялось в соответствии с утвержденными методическими рекомендациями МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей» [89].

Были проведены эксперименты с использованием лабораторных биомоделей (аутбредные белые мыши, $n=30$), неиммунных к бруцеллам. В качестве сравнительного контроля антигена использован стерильный изотонический раствор натрия хлорида. Взятие проб крови осуществляли на 21 сутки после иммунизации штаммом *B. abortus* 19ВА в дозе $3,4 \times 10^8$ - $4,6 \times 10^8$ живых микробных клеток в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Проводили исследование интенсивности экспрессии CD3-лимфоцитами «ранних» активационных молекул – CD69 и CD25 после инкубации с антигеном.

У неиммунных к возбудителю бруцеллеза лабораторных животных при выявлении неспецифического действия АБПК наблюдалась статистически значимая спонтанная активация *in vitro* Т-лимфоцитов при использовании в качестве специфического антигена образцов АБПК №1 и №2 (таблица 2). Значение уровня *ex vivo* экспрессии CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺CD69⁺ при стимуляции АБПК №1 в клеточных тестах составила в среднем $5,12 \pm 0,39$ % ($KC_{\text{mean}} - 50,8$ %) и $35,66 \pm 2,01$ % ($KC_{\text{mean}} - 39,6$ %). Аналогичная тенденция отмечена при применении в качестве специфического стимулирующего агента АБПК №2, который вызвал

неспецифическую *ex vivo* активацию Т-лимфоцитов: $CD3^+CD25^+$ – $4,85 \pm 0,26$ % (KC_{mean} – 48,04 %), $CD3^+CD69^+$ – $28,92 \pm 1,74$ % (KC_{mean} – 25,5 %).

Таблица 2 – Анализ результатов изучения интенсивности фоновой и антигенной активации *in vitro* лимфоцитов у биомоделей, неиммунных к возбудителю бруцеллеза, при использовании серий АБПК №1, №2, №3

Антигенный комплекс	Специфическая активность АБПК в КАСТ-тесте	
	Интенсивность антигениндуцированной экспрессии CD3-лимфоцитами маркера CD 25, %	Интенсивность антигениндуцированной экспрессии CD3-лимфоцитами маркера CD 69, %
АБПК №1	$5,12 \pm 0,39^*$	$35,66 \pm 2,01^*$
АБПК №2	$4,85 \pm 0,26^*$	$28,92 \pm 1,74^*$
АБПК №3	$2,77 \pm 0,35$	$22,12 \pm 1,35$
NaCl (0,9%) (контроль)	$2,52 \pm 1,73$	$21,55 \pm 1,41$

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

Результаты исследования указывают на неспецифическое действие АБПК №1 и №2, соответственно, на непригодность этих антигенных комплексов для постановки клеточного антигенспецифического теста с целью оценки антигенреактивности лимфоцитов.

Вместе с тем значения интенсивности активации CD3 клеток при стимуляции АБПК №3 не имели статистически значимой разницы в сравнении с контролем (антигенная активация $CD3^+CD25^+$ – $2,77 \pm 0,35\%$, KC_{mean} – 9,02 %, $CD3^+CD69^+$ – $22,12 \pm 1,35\%$, KC_{mean} – 2,89 %, что указывает на перспективу его дальнейшего изучения на предмет возможности применения в качестве специфического антигена для клеточного теста.

В дальнейшем были проведены исследования по изучению специфической активности и специфичности АБПК №3. По результатам исследования было установлено, что выбранный антигенный комплекс вызывает специфическую активацию Т-клеток при стимуляции в условиях *ex vivo* (инкубация в смешанной культуре лейкоцитов). Результаты испытания АБПК №3 представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Анализ результатов оценки специфической активности АБПК №3

Антигенный комплекс	Специфическая активность АБПК в КАСТ-тесте	
	Интенсивность антигениндуцированной экспрессии CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	Интенсивность антигениндуцированной экспрессии CD3 ⁺ CD69 ⁺ , %
АБПК №3	8,86 ± 1,39*	47,15 ± 3,66*
NaCl (0,9%) (контроль)	3,88 ± 0,53	22,12 ± 2,03

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

Результаты исследования показали статистически значимое увеличение активности CD3⁺ Т-клеток при воздействии АБПК №3 в *ex vivo* тесте у экспериментальных животных, обладающих специфическим иммунитетом к бруцеллезной инфекции. Так, значения маркеров ранней активации CD 25 и CD 69 составляли в среднем $8,86 \pm 1,39$ (КС_{mean} – 84,3 %) и $47,15 \pm 3,66\%$ (КС_{mean} – 53,1 %) соответственно.

Учитывая, что основную антигенную нагрузку в составе АБПК несут белки наружной мембраны (OMP), представляется перспективным использование этого антигенного комплекса для *ex vivo*-активации Т-клеток через TCR с последующей оценкой клеточно-опосредованных адаптивных иммунных реакций.

3.1.3.3 Определение количества бруцеллезного полисахаридно-белкового комплекса в клеточных тестах, необходимого для специфической стимуляции клеток *ex vivo*

Для разработки эффективных методов лабораторной диагностики бруцеллеза и оценки специфического иммунитета, основанных на клеточных антигенспецифических тестах, возникла необходимость оптимизации методики постановки реакции активации лимфоцитов. В первую очередь необходимо было отработать время инкубации, оптимальную дозу антигена, которая по своим специфически стимулирующим характеристикам в условиях *in vitro* обеспечивала воспроизводимость результатов исследования.

Подбор оптимальной дозы экспериментального антигена производили эмпирическим путем. В экспериментах использовали объёмы 20, 50 и 100 мкл, что соответствует дозам АБПК 100, 250 и 500 мкг соответственно (концентрация белка в АБПК – 5000 мкг/мл) Изучение влияния дозы на специфичность АБПК при антигенной стимуляции Т-клеток *ex vivo* проводили на лабораторных биомоделях (аутбредные белые мыши, n=30), неиммунных к бруцеллам. Результаты оценивали по интенсивности экспрессии CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD95⁺ и CD3⁺МНС-II⁺ (таблица 4).

Таблица 4 – Уровни экспрессии маркеров активации в крови биомоделей, неиммунных к возбудителю бруцеллеза, при стимуляции *ex vivo* Т-лимфоцитов разными дозами АБПК

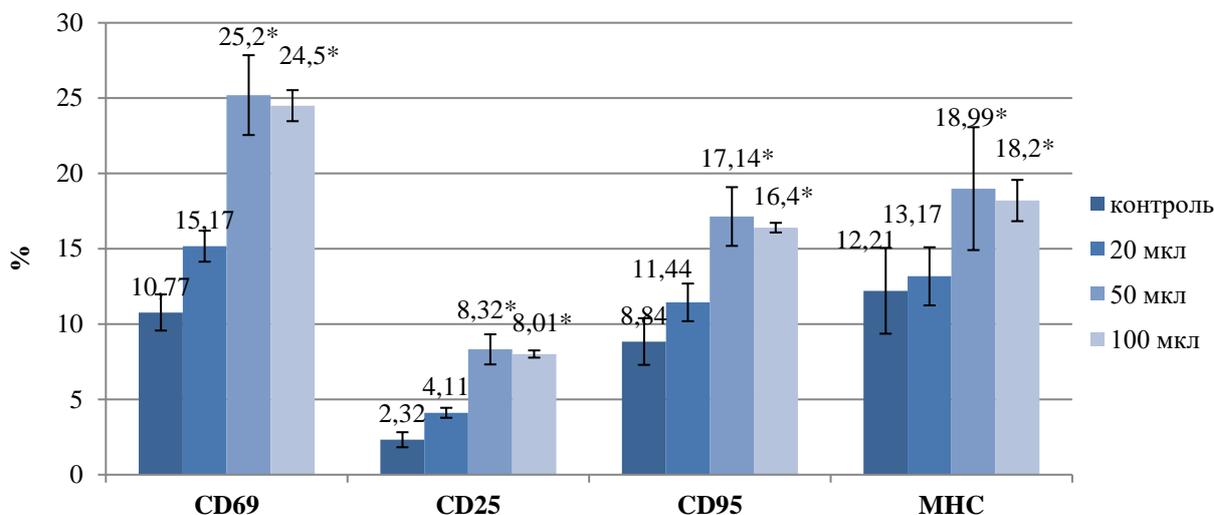
Маркеры активации	NaCl (0,9%) (контроль)	Дозы АБПК (при концентрации белка 5 мг\мл)		
		20 мкл	50 мкл	100 мкл
CD69	10,22 ± 2,23	11,57 ± 2,13	11,97 ± 2,48	11,03±1,06
CD25	2,47 ± 0,46	2,35 ± 0,74	2,97 ± 0,51	2,85±0,13
CD95	2,12 ± 0,44	2,48 ± 0,34	2,38 ± 0,37	2,84±0,19
МНС-II	20,32 ± 1,63	20,35 ± 0,95	21,45 ± 1,30	21,02±1,32

* – в сравнении с контролем разница значений статистически значима при p≤0,05

Результаты исследования не выявили достоверных отличий в уровнях экспрессии активационных молекул CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD95⁺ и CD3⁺МНС-II⁺ между пробами, стимулированными 0,9 % физиологическим раствором и антигенным бруцеллезным полисахаридно-белковым комплексом в различных дозировках. Это свидетельствует о том, что разработанный антигенный комплекс в объемах 20, 50, 100 мкл (концентрациях АБПК 100, 250 и 500 мкг соответственно) не оказывает *in vitro* неспецифическое стимулирующее действие на CD3-лимфоциты.

По уровню индуцированной экспрессии Т-лимфоцитами маркеров активации CD69, CD25, CD95 и МНС-II у вакцинированных белых мышей проводили подбор оптимальной дозы АБПК. Забор крови осуществляли на 21 сутки после

иммунизации штаммом *B. abortus* 19ВА в дозе $3,4 \times 10^8$ - $4,6 \times 10^8$ живых микробных клеток в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида (рисунок 8).



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

Рисунок 8 – Значения маркеров активации лимфоцитов в крови у биомоделлей, иммунных к возбудителю бруцеллеза, при стимуляции клеток разными дозами АБПК.

Анализ специфической активации лимфоцитов АБПК показал, что статистически значимое увеличение количества активированных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы $CD3^+CD69^+$, $CD3^+CD25^+$, $CD3^+CD95^+$ и МНС-II отмечается при инкубации с АБПК объемом 50 мкл и 100 мкл, при этом различия в уровне интенсивности антигениндуцированной активации между указанными дозами не было установлено, когда как объем 20 мкл статистически значимого отличия в сравнении с изотонического раствора натрия хлорида не имеет. В контрольных пробах средние значения уровня экспрессии активированных $CD3^+CD69^+$ были равны $10,77 \pm 1,20$ %, $CD3^+CD25^+$ – $2,32 \pm 0,50$ %, $CD3^+CD95^+$ – $8,84 \pm 1,55$ % и $CD3^+МНС-II^+$ – $12,21 \pm 2,85$ %. При стимуляции АБПК объемом 20 мкл уровень специфической активации был незначительным (разница не имела статистической значимости), количество $CD3^+CD69^+$ составило в среднем $15,17 \pm 1,03$ % ($KC_{mean} - 29,3$ %), $CD3^+CD25^+$ – $3,11 \pm 0,33$ % ($KC_{mean} - 25,4$ %), $CD3^+CD95^+$ – $11,44 \pm 1,25$ % ($KC_{mean} - 22,7$ %) и $CD3^+МНС-II^+$ – $13,17 \pm 1,93$ % ($KC_{mean} - 7,29$ %).

При инкубации с АБПК объемами 50 мкл и 100 мкл смешанной культуры лейкоцитов иммунных к возбудителю бруцеллёза биомоделей наблюдался статистически существенный рост количества активированных Т-клеток. Так, доля пула лимфоцитов, экспрессирующих активационные молекулы, при стимуляции АБПК в объеме 50 мкл составила в среднем $CD3^+CD69^+$ $25,20 \pm 2,65\%$ ($KC_{mean} - 57,46\%$), $CD3^+CD25^+$ $8,32 \pm 1,00\%$ ($KC_{mean} - 72,12\%$), $CD3^+CD95^+$ $17,14 \pm 1,95\%$ ($KC_{mean} - 48,42\%$) и $CD3^+MHC-II^+$ $18,99 \pm 4,08\%$ ($KC_{mean} - 35,70\%$). Так как отсутствует достоверная разница между 50 мкл и 100 мкл АБПК, то 50 мкл (250 мкг) для специфической *in vitro* стимуляции CD3-лимфоцитов при проведении клеточного антигенспецифического теста является достаточным объемом (таблица 5).

Таблица 5 – Уровни экспрессии маркеров активации в крови у биомоделей, иммунных к возбудителю бруцеллеза, при стимуляции *ex vivo* Т-лимфоцитов разными дозами АБПК

Маркеры активации	NaCl (0,9%) (контроль)	Дозы АБПК (при концентрации белка 5 мг\мл)		
		20 мкл	50 мкл	100 мкл
CD69	$10,72 \pm 1,20$	$15,17 \pm 1,03$	$25,20 \pm 2,65^*$	$24,05 \pm 1,03^*$
CD25	$2,32 \pm 0,50$	$3,11 \pm 0,33$	$8,32 \pm 1,00^*$	$8,01 \pm 0,24^*$
CD95	$8,84 \pm 1,55$	$11,44 \pm 1,25$	$17,14 \pm 1,95^*$	$16,4 \pm 0,32^*$
MHC-II	$12,21 \pm 2,85$	$13,17 \pm 1,93$	$18,74 \pm 2,84^*$	$18,37 \pm 1,37^*$

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

Процентное содержание активированных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы $CD3^+CD69^+$, $CD3^+CD25^+$, $CD3^+CD95^+$ и MHCII, после инкубации с АБПК (50 мкл) в течение 24, 48 и 72 ч в крови у биомоделей, иммунных к возбудителю бруцеллеза, представлено на рисунке 9. Полученные результаты установили, что оптимальное время инкубации – 24 ч.

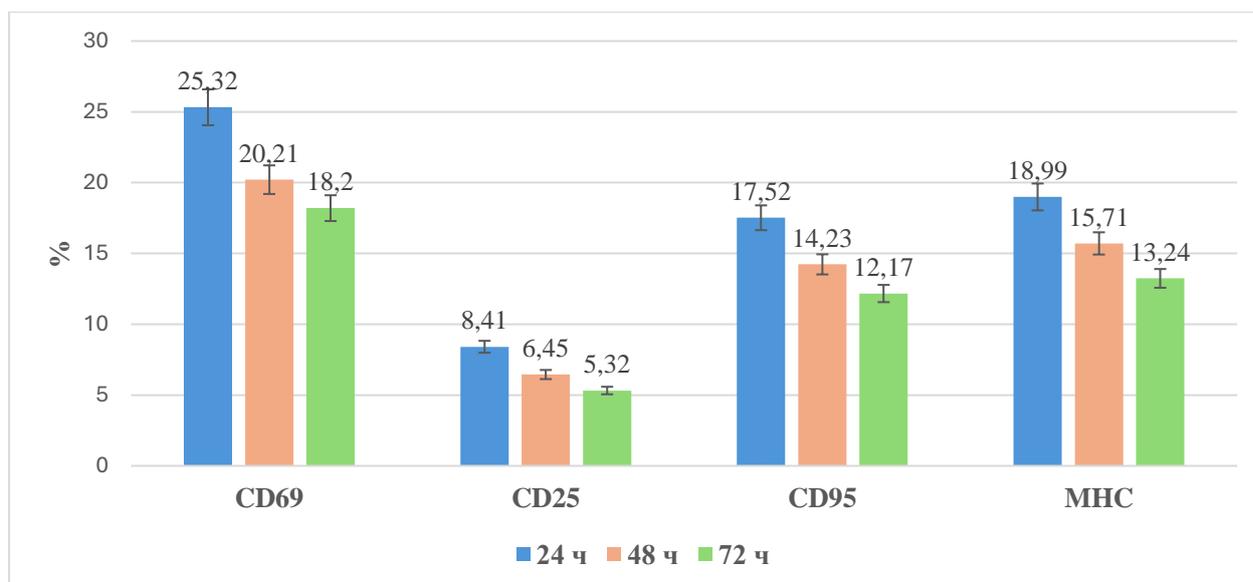


Рисунок 9 – Уровни экспрессии маркеров активации лимфоцитов в крови у биомоделей, иммунных к возбудителю бруцеллеза, при стимуляции клеток АБПК через 24, 48 и 72 ч.

В ходе проведенных исследований были определены оптимальные условия стимуляции: время инкубации (24 часа) и концентрация АБПК в реакционной смеси, обеспечивающие достаточную чувствительность TCR и запуск антиген-специфической сигнализации в Т-лимфоцитах с последующей экспрессией ряда маркерных молекул, что позволяет унифицировать учет реакции и проводить мультиплексную оценку реакции в одной постановке.

3.1.3.4 Сравнительная оценка специфической активности бруцеллина и АБПК в клеточных антигенспецифических тестах *in vitro*

С целью достоверной оценки специфической активности нового антигена, была поставлена задача провести сравнение активирующего потенциала АБПК и коммерческого аллергена бруцеллина для клеточного антигенспецифического теста *ex vivo* после иммунизации белых мышей ($n = 50$) вакцинным штаммом *Brucella abortus* 19 ВА ($4,6 \times 10^8$ ж.м.к. в 0,5 мл. 0,9% NaCl). Неиммунным к

бруцеллам животным (контрольная группа) вводили стерильный изотонический раствор натрия хлорида в аналогичном объеме

Обследования животных проводили перед вакцинацией и после на 7, 14, 21 и 30 сутки. Исследовали содержание пулов Т-клеток $CD3^+CD25^+$, $CD3^+CD69^+$, $CD3^+MCH-II^+$ и $CD3^+CD95^+$ в периферической крови до и после активации бруцеллином и АБПК.

Анализ результатов показал, что в контрольной группе фоновые значения количества клеток, экспрессирующих маркеры активации, не имели статистической разницы при стимуляции 0,9% NaCl, бруцеллином и АБПК, что указывает на отсутствие спонтанной неспецифической активации Т-клеток *ex vivo*. Фоновые значения $CD3^+CD25^+$ – $2,52 \pm 0,34$ %, $CD3^+CD69^+$ – $10,35 \pm 1,98$ %, $CD3^+MCH-II^+$ – $19,28 \pm 2,12$ %, и $CD3^+CD95^+$ – $2,26 \pm 0,18$ %. После инкубации с бруцеллином и АБПК доля активированных Т-клеток имела следующие средние значения: $CD3^+CD25^+$ – $2,47 \pm 0,52$ % и $2,56 \pm 0,47$ %, $CD3^+CD69^+$ – $11,05 \pm 1,77$ % и $10,52 \pm 1,51$ %, $CD3^+MCH-II^+$ – $17,71 \pm 1,54$ % и $18,06 \pm 2,01$ %, $CD3^+CD95^+$ – $1,50 \pm 0,15$ % и $1,59 \pm 0,14$ %, соответственно, статистически значимая разница между полученными результатами отсутствовала.

Исследование динамики субпопуляции активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$) в интервале с 7-х по 30-е сутки постиммунизации выявило незначительное, но регистрируемое увеличение их количества. Средний уровень фоновой экспрессии $CD25^+$ на Т-лимфоцитах на 7-е сутки составил – $3,11 \pm 0,22$ %, на 14 сутки – $3,86 \pm 0,28$ %, на 21 сутки – $3,17 \pm 0,18$ %, 30 сутки – $2,87 \pm 0,15$ %. После постановки КАСТ с бруцеллином количество активированных $CD25^+$ -позитивных Т-клеток при обследовании на 7 сутки после введения вакцинного штамма увеличилось в среднем до $4,12 \pm 0,66$ % ($KC_{mean} - 24,5$ %), на 14 сутки – $4,87 \pm 0,48$ % ($KC_{mean} - 20,7$ %), на 21 сутки – $4,55 \pm 0,49$ % ($KC_{mean} - 30,3$ %), 30 сутки – $3,82 \pm 1,15$ % ($KC_{mean} - 24,9$ %).

Инкубация смешанной культуры лейкоцитов со специфическим антигеном АБПК способствовало более выраженной *ex vivo* активации Т-клеток. Средние значения экспрессии $CD25$ на поверхности Т-лимфоцитов после стимуляции АБПК

достигало $8,34 \pm 0,32$ % ($KC_{\text{mean}} - 38,7$ %) на 7 сутки, на 14 сутки – $12,3 \pm 0,45$ % ($KC_{\text{mean}} - 52,3$ %), на 21 сутки – $13,9 \pm 0,81$ % ($KC_{\text{mean}} - 55,7$ %), на 30 сутки – $14,6 \pm 0,97$ % ($KC_{\text{mean}} - 58,1$ %) (рисунок 10).

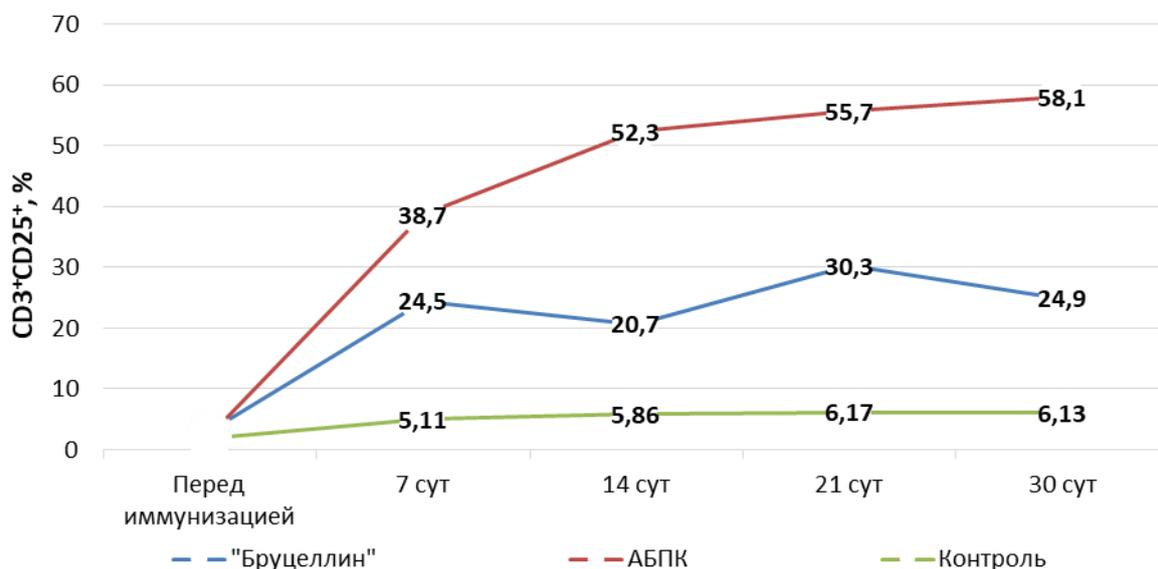


Рисунок 10 – Динамика значений КС Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$) у экспериментальных биомоделей в группах сравнения до и после иммунизации.

До иммунизации и в сроки после введения вакцинного штамма в контрольной группе значения $CD3^+CD69^+$ составил в среднем $10,4 \pm 0,9$ %, 7 сутки – $11,2 \pm 1,02$ %, 14 сутки – $12,5 \pm 0,93$ %, 21 сутки – $10,1 \pm 0,52$ %, 30 сутки – $12,3 \pm 0,69$ %.

При использовании в качестве антигена бруцеллина количество активированных $CD69^+$ - позитивных Т-клеток при обследовании на 7 сутки после введения вакцинного штамма увеличилось в среднем до $12,3 \pm 1,02$ % ($KC_{\text{mean}} - 15,8$ %), на 14 сутки – $14,4 \pm 1,33$ % ($KC_{\text{mean}} - 13,2$ %), на 21 сутки – $12,3 \pm 1,14$ % ($KC_{\text{mean}} - 17,9$ %), 30 сутки – $16,5 \pm 1,15$ % ($KC_{\text{mean}} - 24,5$ %). Стимуляция *ex vivo* АБПК Т-лимфоцитов способствовало росту средних значений $CD3^+CD69^+$: на 7 сутки до $18,7 \pm 1,11$ % ($KC_{\text{mean}} - 40,1$ %), на 14 сутки – $25,3 \pm 1,37$ % ($KC_{\text{mean}} - 50,6$ %), на 21 сутки – $26,1 \pm 1,74$ % ($KC_{\text{mean}} - 61,3$ %), 30 сутки – $27,2 \pm 2,15$ % ($KC_{\text{mean}} - 54,8$ %) (рисунок 11).

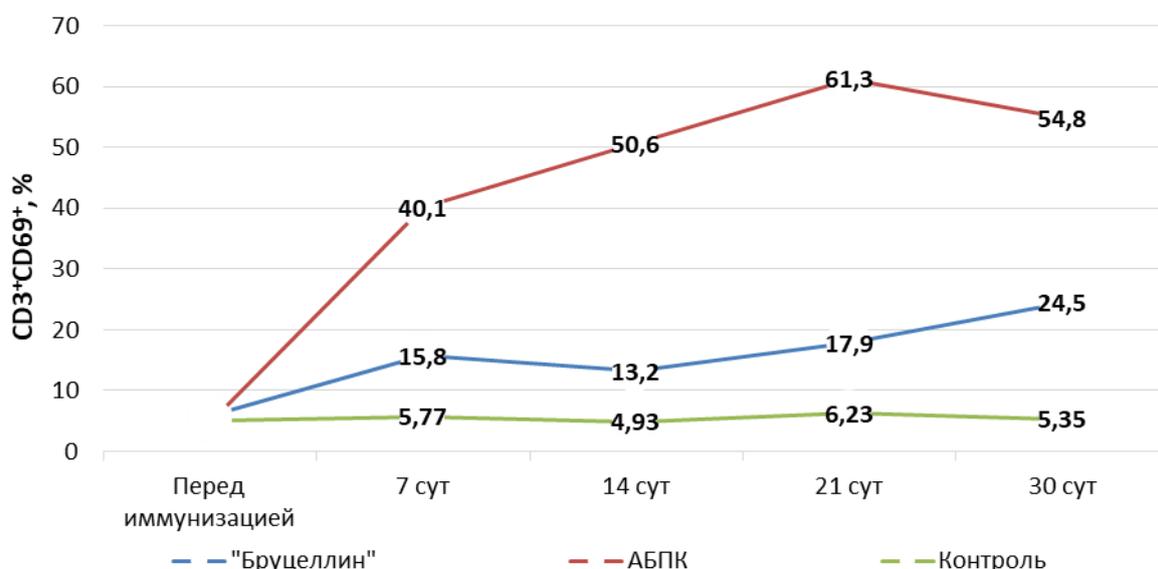


Рисунок 11– Динамика значений КС Т-лимфоцитов ($CD3^+CD69^+$) у экспериментальных биомоделей в группах сравнения до и после иммунизации.

Для комплексной оценки стимулирующего потенциала бруцеллина и разработанного нами антигенного комплекса АБПК изучена особенность антигениндуцированной экспрессии Т-клетками молекул МНС-II. В контрольной группе доля $CD3^+MHC-II^+$ до иммунизации составила в среднем $18,22 \pm 1,27$ %, в сроки после введения вакцинного штамма: 7 сутки – $16,4 \pm 1,92$ %, 14 сутки – $17,2 \pm 1,12$ %, 21 сутки – $18,2 \pm 1,21$ %, 30 сутки – $18,5 \pm 1,37$ %.

Применение в качестве антигена бруцеллина для постановки клеточного антигенспецифического теста, количество активированных МНС-II-позитивных Т-клеток, при обследовании на 7 сутки после введения штамма *B. abortus* 19 ВА, увеличилось в среднем до $19,6 \pm 1,31$ % ($KC_{mean} - 16,3$ %), на 14 сутки – $21,1 \pm 2,01$ % ($KC_{mean} - 18,5$ %), на 21 сутки – $22,8 \pm 2,27$ % ($KC_{mean} - 20,2$ %), 30 сутки – $23,9 \pm 1,97$ % ($KC_{mean} - 22,5$ %). Более выраженная *ex vivo* активация Т-клеток наблюдалась после стимуляции АБПК смешанной культуры лейкоцитов. Средние значения $CD3^+MHC-II^+$ достигали на 7 сутки $20,9 \pm 1,73$ % ($KC_{mean} - 21,6$ %), на 14 сутки – $21,9 \pm 1,56$ % ($KC_{mean} - 21,9$ %), на 21 сутки – $38,6 \pm 2,41$ % ($KC_{mean} - 52,9$ %), 30 сутки – $41,7 \pm 2,54$ % ($KC_{mean} - 55,5$ %) (рисунок 12).

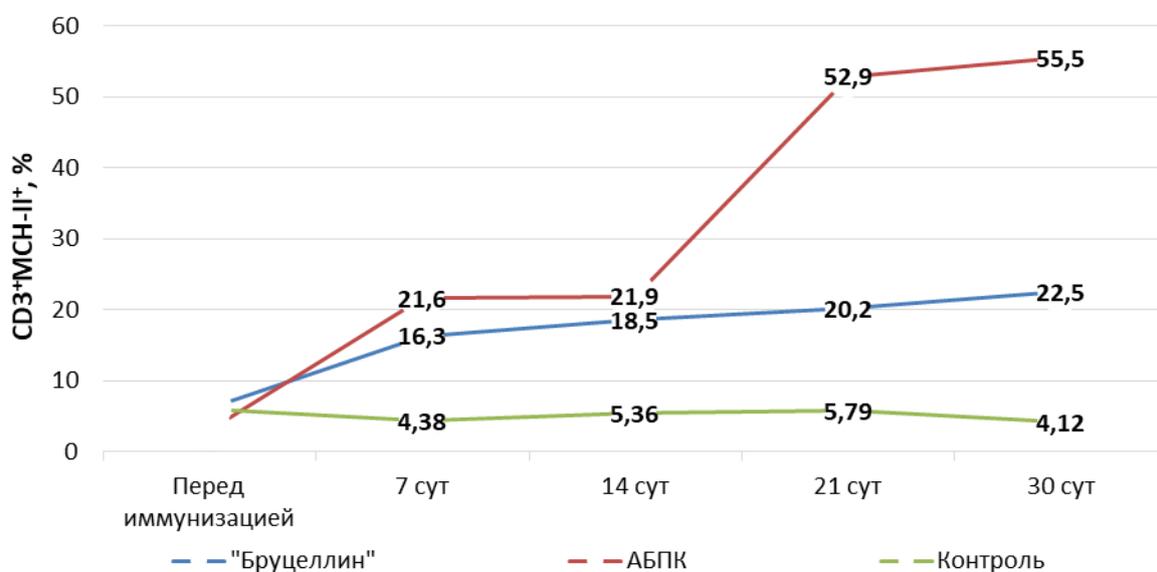


Рисунок 12 – Динамика значений КС Т-лимфоцитов ($CD3^+MCH-II^+$) у экспериментальных биомоделей в группах сравнения до и после иммунизации.

Уровень экспрессии $CD3^+CD95^+$ в группе контроля до иммунизации составлял в среднем $1,71 \pm 0,23$ %, в сроки после введения вакцинного штамма: 7 сутки – $2,33 \pm 0,22$ %, 14 сутки – $2,74 \pm 0,19$ %, 21 сутки – $2,87 \pm 0,23$ %, 30 сутки – $1,91 \pm 0,15$ %. Использование бруцеллина в качестве стимулирующего агента для постановки клеточного теста, количество активированных Fas-позитивных Т-клеток, при обследовании на 7 сутки после иммунизации, увеличилось в среднем до $3,05 \pm 0,25$ % ($КС_{mean} - 23,6$ %), на 14 сутки – $3,48 \pm 1,51$ % ($КС_{mean} - 21,3$ %), на 21 сутки – $4,36 \pm 2,13$ % ($КС_{mean} - 34,2$ %), 30 сутки – $2,82 \pm 1,21$ % ($КС_{mean} - 32,3$ %). Постановка КАСТ-теста с комплексным антигеном АБПК способствовало более выраженной *ex vivo* активации Т-клеток. Средние значения экспрессии $CD3^+CD95^+$ на 7 сутки достигали $3,68 \pm 0,55$ % ($КС_{mean} - 36,7$ %), на 14 сутки – $5,88 \pm 2,63$ % ($КС_{mean} - 53,4$ %), на 21 сутки – $5,96 \pm 2,13$ % ($КС_{mean} - 51,8$ %), 30 сутки – $4,21 \pm 1,94$ % ($КС_{mean} - 54,6$ %) (рисунок 13).

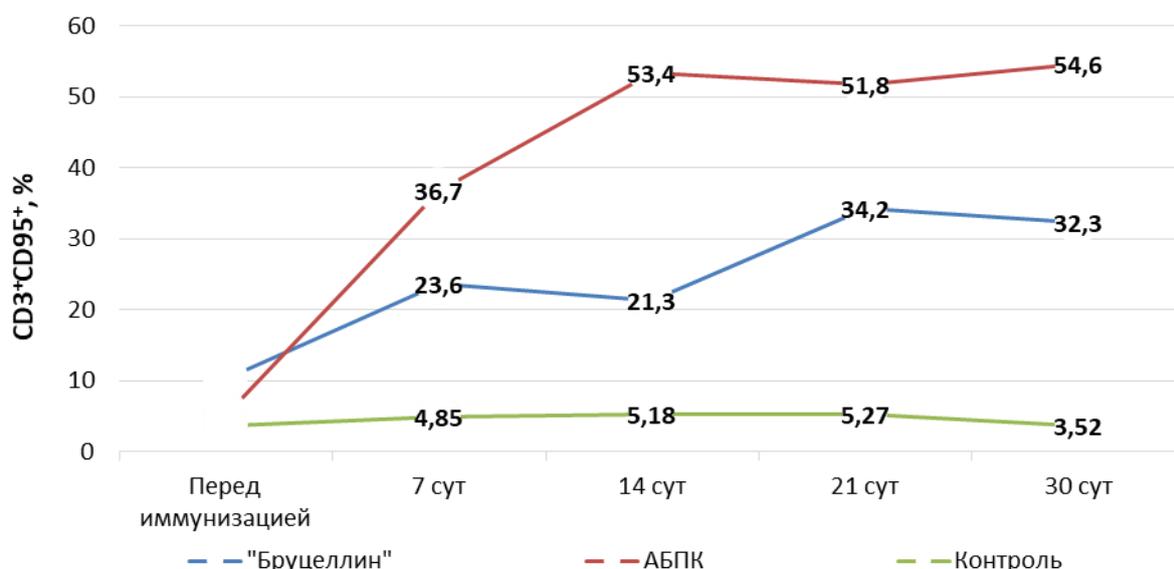


Рисунок 13 – Динамика значений коэффициента стимуляции Т-лимфоцитов ($CD3^+CD95^+$) у экспериментальных биомоделей в группах сравнения до и после иммунизации.

Таким образом, исследования показали, что разработанный нами антигенный белково-полисахаридный комплекс на основе вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА обладает достаточной антиген-стимулирующей *in vitro* активностью для применения в клеточном антигенспецифическом тесте. Комплексный антиген обеспечивает специфическую активацию Т-лимфоцитов у биомоделей, иммунных к возбудителю бруцеллеза. При этом сравнительное изучение АБПК и коммерческого аллергена бруцеллина показало, что специфическая *in vitro* активность разработанного нами комплексного антигена существенно выше. Использование АБПК для постановки клеточного антигенспецифического теста значительно повышает чувствительность теста и обеспечивает специфичность диагностической реакции. Разработанный бруцеллезный антигенный белково-полисахаридный комплекс может быть использован в качестве стимулирующего компонента клеточного антигенспецифического теста для диагностики бруцеллеза и исследования специфического иммунитета.

3.1.4 Изучение диагностической точности клеточного антигенспецифического теста *in vitro*

Изучение точности диагностического теста необходимо для определения (доказательства) клинической ценности результатов диагностического исследования, с позиций правильного выявления или исключения наличия лабораторных критериев для подтверждения нозологического статуса (факта заболевания), и для принятия решения о необходимости проведения дополнительного обследования, постановки окончательного или предварительного диагноза и проведения лечебно-профилактических мероприятий, прогнозирования защитных свойств иммунитета.

Диагностическая точность теста может быть представлена на определенном пороговом уровне с использованием основных критериев, таких как чувствительность и специфичность.

По результатам проведенных нами экспериментальных исследований с использованием биологических моделей и предварительных клинических испытаний клеточного антигенспецифического теста был определен пороговый уровень/значение (порог принятия решения), которые в дальнейшем стали основой для разработки методических рекомендаций МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей» [89]. При значении КС от 0 до 50 %, реакция считается отрицательной, при значении равным 50 % и более – положительная реакция (пороговое значение).

Для оценки специфичности клеточного антигенспецифического теста – метода, детектирующего антиген-специфическую активацию Т-лимфоцитов в *ex vivo* условиях – у 43 пациентов с лабораторно верифицированным острым бруцеллезом проанализирована динамика экспрессии маркеров активации CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺CD71⁺ на Т-клетках в сравнении с контрольными значениями. Экспрессию активационных маркеров индуцировали различными бактериальными антигенами, применяемыми для выявления специфической

сенсibilизации с диагностическими целями и для предвакцинального обследования. В качестве стимуляторов использовали антраксин, тулярин, туберкулин и бруцеллезный полисахаридно-белковый комплекс (АБПК). В контрольной группе в качестве раствора для инкубации применяли стерильный изотонический раствор натрия хлорида (50 мкл).

Анализ полученных данных показал отсутствие статистически значимого роста активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD69, CD25, CD71, при стимуляции различными бактериальными антигенами. Так, при стимуляции Т-лимфоцитов антраксином количество CD3⁺CD69⁺ составило в среднем 11,33±1,53% (КC_{mean} – 20,8 %), CD3⁺CD25⁺ – 9,92 ± 1,69% (КC_{mean} – 23,6 %), CD3⁺CD71⁺ – 7,05 ± 1,24% (КC_{mean} – 22,7 %); тулярином – CD3⁺CD69⁺ – 10,41 ± 1,58% (КC_{mean} – 13,8 %), CD3⁺CD25⁺ – 8,65 ± 1,81% (КC_{mean} – 12,4 %), CD3⁺CD71⁺ – 6,98 ± 0,51% (КC_{mean} – 12,3 %); туберкулином — CD3⁺CD69⁺ – 9,96 ± 1,23% (КC_{mean} – 9,9 %), CD3⁺CD25⁺ – 7,92 ± 0,87% (КC_{mean} – 12,4 %), CD3⁺CD71⁺ – 6,35 ± 1,58% (КC_{mean} – 4,3 %)(таблица 6). Полученные значения были близки к контрольным, что является слабой неспецифической реакцией Т-клеток на данные антигены.

Таблица 6 – Значения маркеров активации лимфоцитов в крови больных острым бруцеллезом при стимуляции клеток различными бактериальными антигенами *ex vivo*

Антигены Маркеры активации	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 разницa значений статистически значима при $p \leq 0,05$

Специфическая активация Т-лимфоцитов *in vitro* наблюдалась только при использовании в качестве антигена АБПК. Так, значения количества активированных CD3-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CD3⁺CD69⁺

составило $19,54 \pm 1,58\%$ ($KC_{\text{mean}} - 54,1 \%$), $CD3^+CD25^+ - 16,21 \pm 0,96\%$ ($KC_{\text{mean}} - 54,1 \%$), $CD3^+CD71^+ - 16,21 \pm 0,96\%$ ($KC_{\text{mean}} - 51,8 \%$) (рисунок 14).

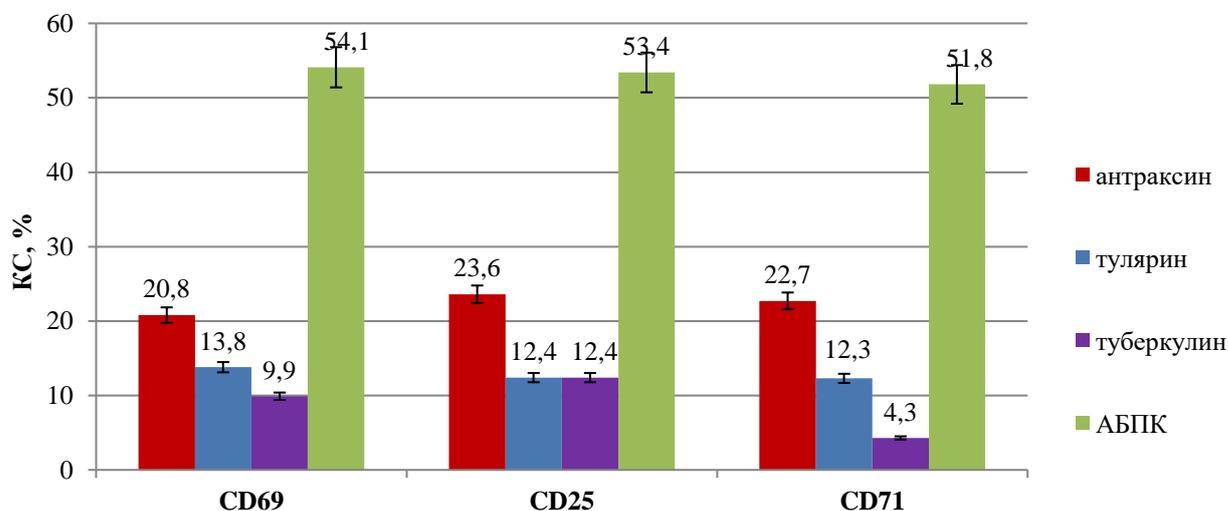


Рисунок 14 – Средние значения КС маркеров активации лимфоцитов в крови у больных бруцеллезом, при стимуляции CD3-лимфоцитов разными антигенами.

Клиническую информативность антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки антигенреактивности Т-лимфоцитов при бруцеллезной инфекции определяли по основным информативным показателям – диагностическая чувствительность, специфичность. По результатам клинических исследований рассчитывали диагностическую точность методического подхода [14].

У лиц, неиммунных к бруцеллезу, изучали диагностическую специфичность клеточного антигенспецифического теста. Для исключения заболевания проводили комплексное обследование людей на бруцеллез с применением иммунологических реакций: реакции Хеддельсона, Райта и ИФА на наличие IgM, IgA, IgG и аллерготеста *in vitro* (тест активации базофилов) в соответствии с МУ 3.1/4.2.4145-25 «Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика бруцеллёза и геномный мониторинг бруцелл» [93].

Постановку, учет и оценку результатов клеточного антигенспецифического теста осуществляли в соответствии с МР 3.1.0207-20 [89]. Исследовали уровень интенсивности экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов CD3⁺CD25⁺.

Из 210 обследованных (в т. ч. беременные – 18 и обследованные с аллергией в анамнезе – 42), правильный отрицательный результат клеточного антигенспецифического теста с АБПК получен у 197 обследованных, ложноположительную реакцию регистрировали у 14 обследованных, в том числе у 2 беременных. Среди обследованных выделялась группа пациентов (n = 42) с лабораторно подтверждёнными инфекционными заболеваниями: туляремия (n = 8), сибирская язва (n = 5) и боррелиоз (n = 29). Во всех случаях исследование дало отрицательный результат, что может указывать на отсутствие перекрестной реактивности при наличии гетерологичных инфекционных агентов. По результатам исследования диагностическая специфичность теста составила 93,7 %.

Диагностическую чувствительность оценивали по доле положительных результатов – определяемых как значения коэффициента стимуляции (КС) выше 50 % – среди лиц с верифицированным клинически и лабораторно диагнозом «острый бруцеллез». (до 6 недель после заболевания) – 212 человек и активный «хронический бруцеллез» – 96 заболевших. Из 212 больных со среднетяжелым течением острого бруцеллеза у 202 обследованных получен положительный результат клеточного антигенспецифического теста (значения КС составили более 50 %), в 10 случаях результат теста был ложноотрицательным. Соответственно чувствительность метода для диагностики острого бруцеллеза – 95,3 %. Из 96 больных с диагнозом «хронический бруцеллез» (обследуемые болели бруцеллезом более 1 года – менее 2 лет) у 87 обследованных получен положительный результат, в 9 случаях результат клеточного антигенспецифического теста был ложноотрицательным. Соответственно чувствительность метода для диагностики (выявления) хронической бруцеллезной инфекции составила – 91,7 %.

Точность (показатель диагностической эффективности) рассчитывали, учитывая сумму истинно положительных и истинно отрицательных результатов теста среди всех обследованных пациентов [14]. В результате чего при

обследовании 518 человек получено 486 истинно правильных результатов в ходе применения данного метода исследования. Показатель диагностической эффективности составил 93,8 %.

При обследовании 62 человек, вакцинированных против бруцеллеза живой бруцеллезной вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19ВА, у всех (100 %) через 30 дней после иммунизации зафиксирован положительный результат клеточного антигенспецифического теста.

Таким образом, сравнительный анализ интенсивности экспрессии активационных маркеров CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺CD71⁺ на Т-лимфоцитах у пациентов с острым бруцеллезом при стимуляции бактериальными антигенами – антраксином, тулярином и туберкулином – не выявил признаков неспецифической активации Т-клеток в условиях *in vitro*. Только при использовании в качестве антигена АБПК наблюдалась специфическая активация Т-лимфоцитов *in vitro*, со средним значением коэффициента стимуляции, превышающим 50%. Учитывая вышеизложенное, предложенный методический подход клеточных антигенспецифических тестов обладает специфичностью – 93,7%, чувствительностью для диагностики острого бруцеллеза – 95,3%, для выявления хронического бруцеллеза – 91,7 % и диагностической точностью – 93,8 %.

3.2 Изучение особенностей *ex vivo* активации Т-лимфоцитов и иммуновоспалительных реакций в динамике развития острой бруцеллезной инфекции

3.2.1 Анализ активации Т-лимфоцитов в динамике развития острой бруцеллезной инфекции

Исследований по изучению особенностей изменения специфической антиген-зависимой Т-клеточной реактивности при развитии бруцеллезной инфекции в современной доступной научной литературе нет.

Эксперименты проводили на белых мышах (n=60), инфицированных вирулентным штаммом *Brucella melitensis* 16М в высокой дозе 10^6 ж.м.к. На 7, 14, 21 и 30 сутки после заражения отбирали кровь для цитофлюорометрических исследований. Для оценки иммунореактивного состояния Т-клеток изучали спонтанную (фоновую) и антиген-индуцированную экспрессию рецепторов активации CD25, CD69, CD71 и апоптоза CD95 основными субпопуляциями Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺ - Т-хелперами, CD3⁺CD8⁺ - Т-цитотоксическими). У всех инфицированных белых мышей из селезенки была выделена культура бруцелл, что указывает на развитие острой генерализованной бруцеллёзной инфекции.

Перед заражением фоновые значения количества активированных лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3⁺CD8⁺CD25⁺ составили в среднем $5,92 \pm 0,44$ % и $3,15 \pm 0,24$ %, при активации АБПК доля субпопуляций активированных Т-клеток практически не отличалась от фоновых значений (таблица 7). Через 7 дней после заражения биомоделей возбудителем бруцеллёза отмечалось статистически значимое увеличение количества CD3⁺CD4⁺CD25⁺ в среднем до $9,81 \pm 0,87$ (КC_{mean} – 39,6 %). Доля пула CD3⁺CD8⁺CD25⁺ после антигенной *ex vivo* активации составила в среднем $4,32 \pm 0,35$ (КC_{mean} – 27,1 %). В процессе развития бруцеллёзной инфекции на 14 день после заражения доля антигенреактивных Т-клеток статистически значимо увеличивалась: CD3⁺CD4⁺CD25⁺ в среднем до $23,7 \pm 1,71$ (КC_{mean} – 56,8 %), CD3⁺CD8⁺CD25⁺ – $16,1 \pm 1,11$ (КC_{mean} – 48,6 %). На 21 сутки после инфицирования наблюдалась некоторая стабилизация количества антигенреактивных Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы к IL-2, которое составило в среднем $32,1 \pm 2,03$ (КC_{mean} – 51,1 %) и $16,87 \pm 0,82$ (КC_{mean} – 54,1 %) соответственно. К 30 суткам отмечалось некоторое увеличение цитотоксического ответа Т-клеток при стимуляции *in vitro* АБПК. Средние значения CD3⁺CD8⁺CD25⁺ практически не изменились и были на уровне $31,5 \pm 1,13$ % (КC_{mean} – 50,2 %), доля CD3⁺CD8⁺CD25⁺ после активации АБПК увеличилась в среднем до $37,5 \pm 2,25$ %, при этом коэффициент стимуляции достиг наибольших значений, в сравнении со

всеми более ранними сроками исследования, составив 58,1 % (таблица 7, рисунок 15).

Таблица 7 – Средние значения и КС активированных *ex vivo* лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3⁺CD8⁺CD25⁺ у лабораторных животных до и после заражения *Brucella melitensis* 16М

Субпопуляции CD3 ⁺ -лимфоцитов	До заражения	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%)	5,92 ± 0,44	9,81 ± 0,87	23,7 ± 1,71	32,1 ± 2,03	31,5 ± 1,13
КС (%)	3,01	39,6	56,8	51,1	50,2
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ (%)	3,15 ± 0,24	4,32 ± 0,35	16,1 ± 1,11	16,87 ± 0,82	37,5 ± 2,25
КС (%)	2,64	27,1	48,6	54,1	58,1

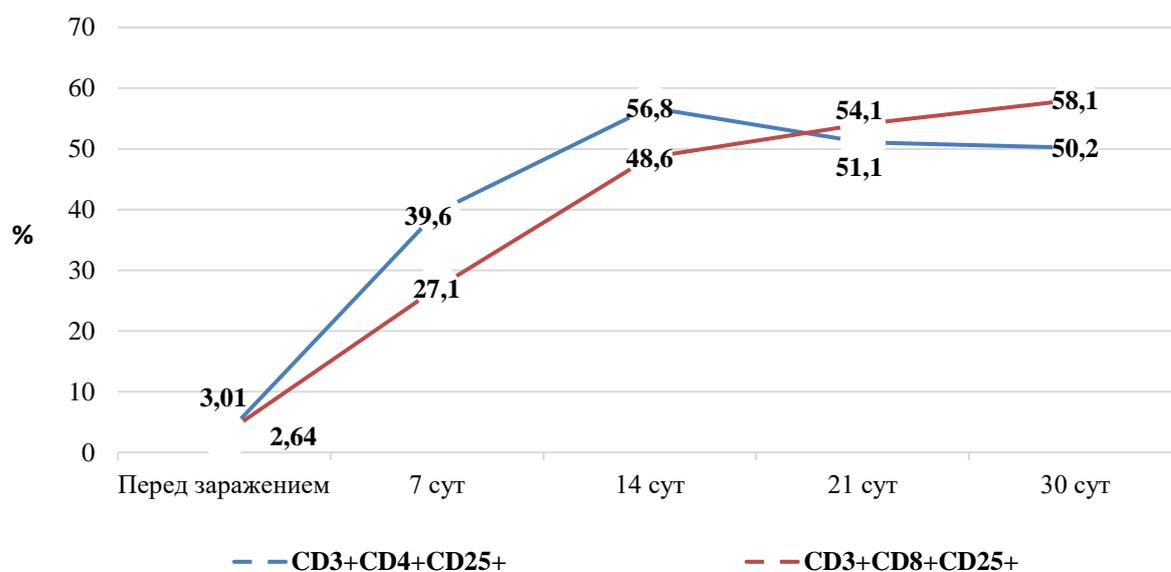


Рисунок 15 – Изменения значений КС активированных *ex vivo* лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD25⁺ и CD3⁺CD8⁺CD25⁺ у лабораторных животных до и после заражения *Brucella melitensis* 16М.

До заражения количество CD3⁺CD4⁺CD69⁺ и CD3⁺CD8⁺CD69⁺ у биомоделей составило в среднем 9,47 ± 1,04 и 5,63 ± 0,42, соответственно. На 7 день после инфицирования *Brucella melitensis* было отмечено резкое повышение содержания антигенреактивных CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺, экспрессирующих маркер ранней активации CD69 – 25,2 ± 2,11 % (КС_{mean} – 50,2 %) и 13,3 ± 1,24 % (КС_{mean} – 48,1 %).

Через 14 суток после заражения доля антигенреактивных Т-клеток $CD3^+CD4^+CD69^+$ статистически значимо увеличивалась в среднем до $41,1 \pm 3,12$ ($KC_{mean} - 53,4 \%$), $CD3^+CD8^+CD69^+$ – $15,7 \pm 1,62$ ($KC_{mean} - 51,9 \%$). Через 21 день после заражения отмечена реакция, схожая с динамикой антиген-индуцированной экспрессии Т-лимфоцитами рецептора ИЛ-2, количество антигенреактивных $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, экспрессирующих маркер пролиферации составило в среднем $38,5 \pm 3,19$ ($KC_{mean} - 50,7 \%$) и $17,2 \pm 1,24$ ($KC_{mean} - 52,3 \%$), соответственно (таблица 7). На 30 сутки после инфицирования наблюдалось небольшое снижение активированных $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов – $33,9 \pm 1,96 \%$ ($KC_{mean} - 41,1 \%$) и увеличение доли антигенреактивных $CD3^+CD8^+$, экспрессирующих рецепторы пролиферации Т-клеток. Так, после активации АБПК интенсивность экспрессии увеличилась в среднем до $17,9 \pm 1,19 \%$, при этом коэффициент стимуляции достиг наибольших значений, в сравнении со всеми сроками исследования, составив $53,2 \%$ (таблица 8, рисунок 16).

Таблица 8 – Средние значения и КС активированных *ex vivo* лимфоцитов $CD3^+CD4^+CD69^+$, $CD3^+CD8^+CD69^+$ у лабораторных животных до и после заражения *Brucella melitensis* 16М

Субпопуляции $CD3^+$ -лимфоцитов	До заражения	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
$CD3^+CD4^+CD69^+(\%)$	$9,47 \pm 1,04$	$25,2 \pm 2,11$	$41,1 \pm 3,12$	$38,5 \pm 3,19$	$33,9 \pm 1,96$
КС(%)	3,01	50,2	53,4	50,7	41,1
$CD3^+CD8^+CD69^+(\%)$	$5,63 \pm 0,42$	$13,3 \pm 1,24$	$15,7 \pm 1,62$	$17,2 \pm 1,24$	$17,9 \pm 1,19$
КС (%)	2,64	48,1	51,9	52,3	53,2

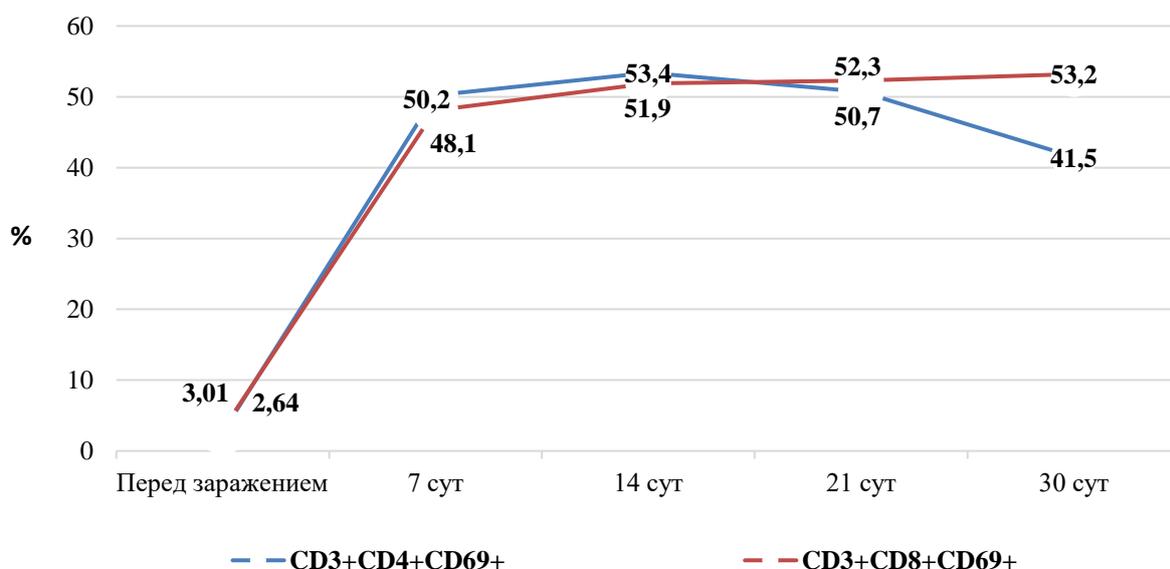


Рисунок 16 – Изменения значений КС активированных *ex vivo* лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD69⁺, CD3⁺CD8⁺CD69⁺ у лабораторных животных до и после заражения *Brucella melitensis* 16M.

Интенсивность экспрессии рецептора трансферрина 1 (TfR1, CD71) прямо пропорциональна метаболической активности (усвоение железа) клеток и отражает уровень функциональной активности исследуемых соматических клеток [96].

Фоновые значения количества активированных лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD71⁺ и CD3⁺CD8⁺CD71⁺ составили в среднем $4,14 \pm 0,32$ % и $2,85 \pm 0,18$ %, при активации АБПК доля субпопуляций активированных Т-клеток практически не отличалась от фоновых значений. Установлено статистически значимое повышение доли антигенспецифических Т-хелперов, несущих маркер TfR1, уже на 7-й день после инфицирования биомоделей бруцеллами до $11,72 \pm 1,25$ % (КС_{mean} – 64,8 %) и среди доли Т-цитотоксических в среднем до $7,82 \pm 0,63$ % (КС_{mean} – 63,5 %). На 14 сутки после инфицирования возбудителем бруцеллёза у биомоделей доля антигенреактивных клеток CD3⁺CD4⁺, экспрессирующих рецептор трансферрина 1 оставалась на высоком уровне, составив в среднем $9,51 \pm 1,03$ % (КС_{mean} – 54,8 %), CD3⁺CD8⁺ – $6,04 \pm 0,53$ % (КС_{mean} – 52,5 %). Через 21 день после заражения отмечалось существенное снижение интенсивности антиген-индуцированной экспрессии Т-клетками маркера CD71 до уровня контрольных

значений. Количество антигенреактивных $CD3^+CD4^+CD71^+$ составило в среднем $5,21 \pm 0,32$ % ($KC_{mean} - 37,1$ %) и $CD3^+CD8^+CD71^+$ – $3,47 \pm 0,20$ % ($KC_{mean} - 40,8$ %). К 30-м суткам сохранялась тенденция к снижению как фоновой, так и антиген-индуцированной экспрессии мембранного белка TfR1 на Т-лимфоцитах, количество антигенреактивных CD71-позитивных Т-хелперов составило в среднем $3,96 \pm 0,34$ % ($KC_{mean} - 19,2$ %), доля $CD3^+CD8^+CD71^+$ после активации АБПК составила в среднем $2,44 \pm 0,17$ %, коэффициент стимуляции снизился до 23,3 % (таблица 9, рисунок 17).

Таблица 9 – Средние значения и КС активированных *ex vivo* лимфоцитов $CD3^+CD4^+CD71^+$, $CD3^+CD8^+CD71^+$ у лабораторных животных до и после заражения *Brucella melitensis* 16М

Субпопуляции CD3-лимфоцитов	До заражения	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
$CD3^+CD4^+CD71^+$ (%)	$4,14 \pm 0,32$	$11,72 \pm 1,25$	$9,51 \pm 1,03$	$5,21 \pm 0,32$	$3,96 \pm 0,34$
КС(%)	3,38	64,8	54,8	37,1	19,2
$CD3^+CD8^+CD71^+$ (%)	$2,85 \pm 0,18$	$7,82 \pm 0,63$	$6,04 \pm 0,53$	$3,47 \pm 0,20$	$2,44 \pm 0,17$
КС (%)	3,93	63,5	52,5	40,8	23,3

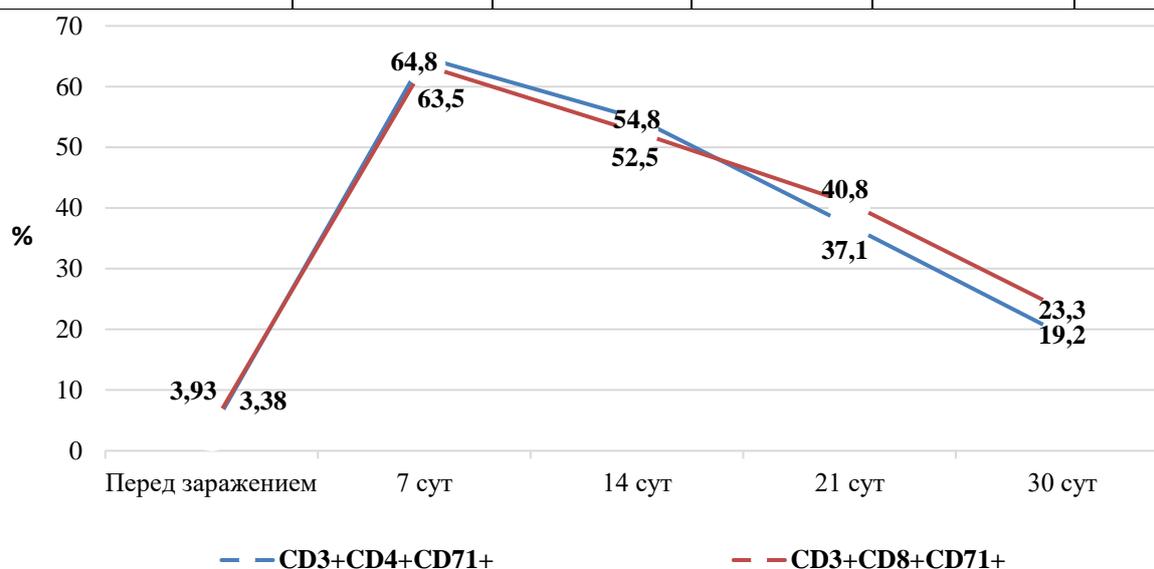


Рисунок 17 – Изменения значений КС активированных *ex vivo* лимфоцитов $CD3^+CD4^+CD71^+$ и $CD3^+CD8^+CD71^+$ у лабораторных животных до и после заражения *Brucella melitensis* 16М.

Фоновые значения интенсивности экспрессии АРО-1 субпопуляциями Т-клеток составили в среднем, $CD3^+CD4^+CD95^+$ – $0,37 \pm 0,05$ %, $CD3^+CD8^+CD71^+$ – $1,95 \pm 0,11$ %. Анализ динамики экспрессии Fas-рецептора (CD95) на активированных Т-лимфоцитах в ходе развития бруцеллёзной инфекции показал, что на 7-е сутки после инфицирования наблюдалось двукратное повышение доли антиген-реактивных Fas⁺-клеток среди $CD3^+CD4^+$ Т-лимфоцитов – $3,01 \pm 0,26$ % (КС_{mean} – 51,2 %) и $CD3^+CD8^+$ – $6,12 \pm 0,51$ % (КС_{mean} – 57,5 %). Через 14 суток после заражения доля антигенреактивных Т-клеток $CD3^+CD4^+CD95^+$ статистически значимо увеличивалась в среднем до $7,81 \pm 0,92$ (КС_{mean} – 53,34 %), $CD3^+CD8^+CD95^+$ – $10,3 \pm 1,62$ (КС_{mean} – 54,8 %). На 21 сутки после заражения отмечено снижение интенсивности фоновой и антигениндуцированной экспрессии (активации) Fas-рецептора Т-клетками, количество $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, экспрессирующих маркер апоптоза АРО1 составило в среднем $3,57 \pm 0,18$ (КС_{mean} – 35,2 %) и $4,61 \pm 0,23$ (КС_{mean} – 39,1 %), соответственно. Через 30 дней после инфицирования отмечено дальнейшее снижение экспрессии рецептора апоптоза CD95 субпопуляциями Т-клеток $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов – $2,17 \pm 0,15$ % (КС_{mean} – 19,2 %) и $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов – $4,64 \pm 0,36$ % (КС_{mean} – 23,3 %) (таблица 10, рисунок 18).

Таблица 10 – Средние значения и КС активированных *ex vivo* лимфоцитов $CD3^+CD4^+CD95^+$, $CD3^+CD8^+CD95^+$ у лабораторных животных до и после заражения *Brucella melitensis* 16М

Субпопуляции CD3-лимфоцитов	До заражения	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
$CD3^+CD4^+CD95^+$ (%)	$0,37 \pm 0,05$	$3,01 \pm 0,26$	$7,81 \pm 0,92$	$3,57 \pm 0,18$	$2,17 \pm 0,15$
КС(%)	2,32	51,2	53,34	35,2	19,2
$CD3^+CD8^+CD95^+$ (%)	$1,95 \pm 0,11$	$6,12 \pm 0,51$	$10,3 \pm 1,62$	$4,61 \pm 0,23$	$4,64 \pm 0,36$
КС (%)	1,18	57,5	54,8	39,1	23,3

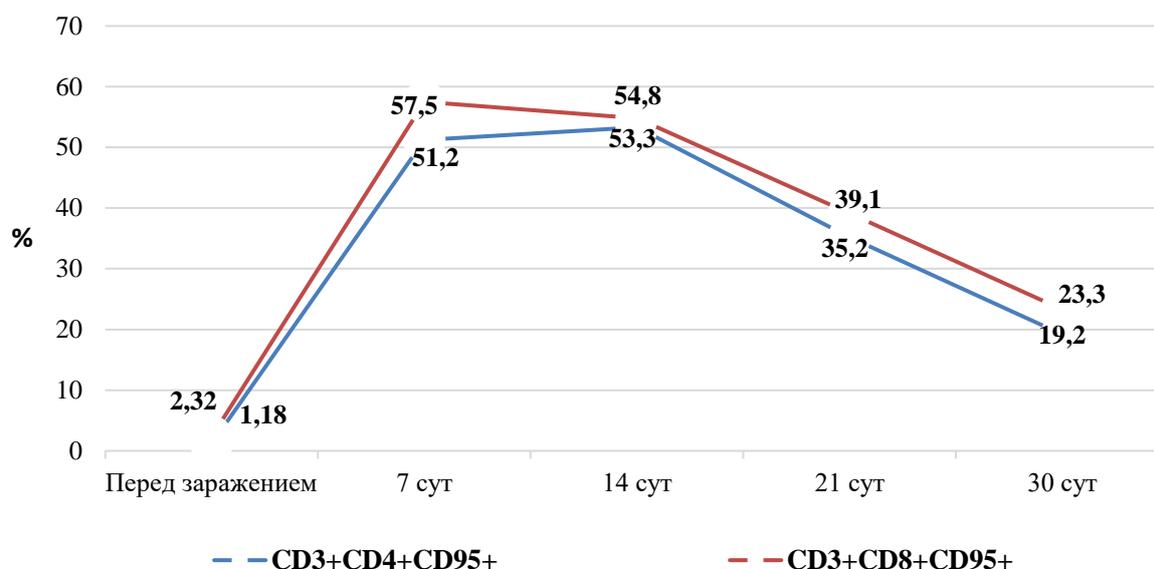


Рисунок 18 – Изменения значений КС активированных *ex vivo* лимфоцитов $CD3^+CD4^+CD95^+$ и $CD3^+CD8^+CD95^+$ у лабораторных животных до и после заражения *Brucella melitensis* 16М.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали возможность применения клеточного антигенспецифического теста с разработанным антигеном АБПК для исследования особенности изменения антигенреактивности субпопуляций Т-лимфоцитов. Специфическая активация и выраженная антигенреактивность CD3- популяций отмечалась преимущественно на 14 сутки после инфицирования, что отражает общие закономерности острого инфекционного бруцеллезного процесса. Обращает на себя внимание поляризация Т-клеточного иммунного ответа в сторону усиления цитотоксической реакции лимфоцитов в ответ на *ex vivo* активацию в более отдаленные сроки после инфицирования (21 и 30 сутки), что связано с формированием активного цитотоксического иммунного ответа на внутриклеточную инфекцию. Сохранение выраженной антигенреактивности Т-клеток отражает развитие острой бактериальной инфекции с генерализацией. Некоторое снижение антигенной активации $CD3^+CD4^+$ -лимфоцитов можно связать с ослаблением иммунореактивности на фоне интенсивной диссеминации возбудителя, что является отражением иммуносупрессивного действия бруцелл на организм

хозяина, которое влечет за собой ингибирование ведущего звена иммунологической защиты от бруцеллезной инфекции.

Учитывая, что цитотоксические Т-лимфоциты ($CD3^+CD8^+$) относят к потенциально основным эффекторам, выполняющим ведущие функции иммунологического контроля бруцеллеза при формировании нестерильного, а позже и стерильного инфекционного иммунитета, разработанный методический подход (с АБПК) позволит оценить функциональное состояние CTL в отношении к возбудителю бруцеллеза.

3.2.2 Изучение особенностей динамики антигениндуцированной экспрессии маркеров активации Т-лимфоцитов при остром бруцеллезе в условиях повторного инфицирования

Учитывая определяющую роль Th-1 иммунного ответа в иммунологической защите от бруцелл, представляется крайне актуальным анализ специфической активации Т-лимфоцитов *in vitro* при остром бруцеллезе в условиях повторного инфицирования. Результаты подобных исследований в отечественной и зарубежной научной литературе отсутствуют.

Кроме того, к настоящему времени не разработано алгоритма дифференциации рецидива при бруцеллезе, в частности обусловленного несвоевременной или неадекватной этиотропной терапией, или повторного инфицирования, что имеет важнейшее эпидемиологическое значение и может указывать на сохранение активного эпизоотического очага с эпидемическими проявлениями.

В качестве биомodelей использовали 120 белых мышей, зараженных патогенным штаммом *Brucella abortus* 544 в дозе 1×10^6 ж.м.к., путем подкожного введения в паховую область. Забор крови проводили на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й день после инфицирования по 12 особей на каждый срок исследования. На 30 сутки осуществляли повторное заражение оставшихся 60 белых мышей, моделируя в эксперименте реинфицирование при наличии острой бруцеллезной инфекции.

Повторно инфицированным биомоделям кровь отбирали в те же сроки – на 7, 14, 21 и 28 сутки после реинфицирования. В контрольную группу вошли 20 интактных мышей. Состояние Т-клеточного иммунного ответа оценивали по уровню как фоновой, так и антиген-индуцированной экспрессии активационных маркеров CD25, CD69 и MHC-II.

Медианные значения КС антигенреактивных $CD3^+CD25^+$ лимфоцитов на 7 сутки после заражения составили 17,9 % ($3,9 \div 55,1$ %), средние значения составили $7,2 \pm 2,14$ %. Отмечается увеличение численности антигенреактивных $CD3^+CD25^+$ лимфоцитов в среднем до $11,8 \pm 0,66$ % на 14 сутки, при этом интенсивность активации пула клеток увеличилась в 2,5 раза – Me КС = 46,1 % ($42,6 \div 60,2$ %). На 21 сутки после инфицирования тенденция к увеличению доли премированных Т-лимфоцитов сохранилась, количество антигенреактивных $CD3^+CD25^+$ составило в среднем $16,3 \pm 2,5$ %, при этом КС увеличился до $Me = 63,7$ % ($53,9 \div 80,01$ %). На 28 сутки после заражения биомоделей возбудителем бруцеллеза отмечено сохранение относительно высокого уровня КС доли Т-лимфоцитов, отвечающих активацией на антиген – $Me = 46,5$ % ($24,5 \div 31,5$ %) (рисунок 19).

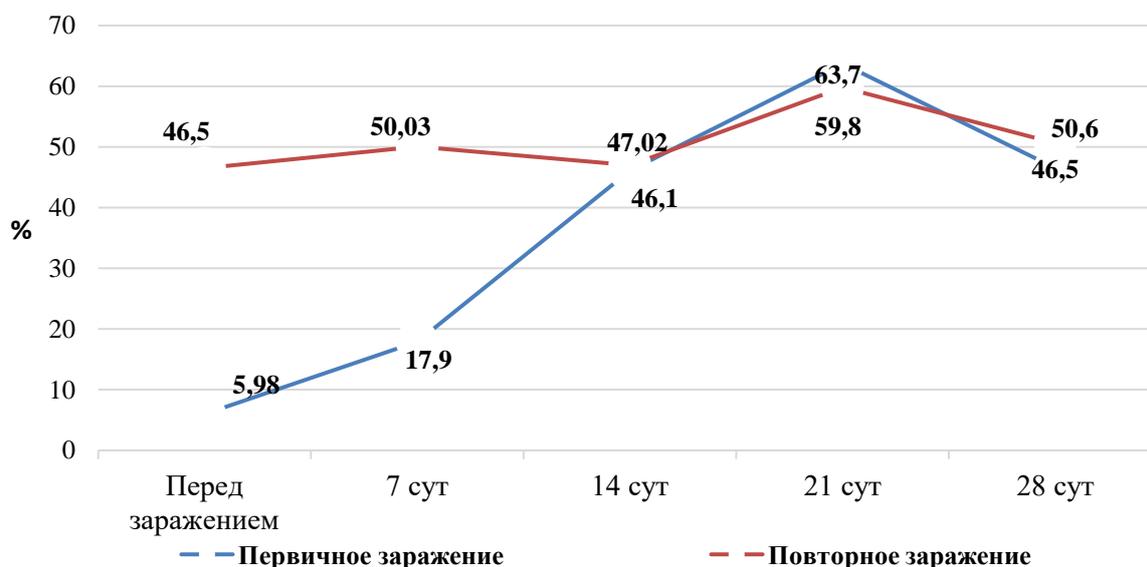


Рисунок 19 – Динамика значений коэффициента стимуляции активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD25^+$) у биомоделей после первичного и повторного заражения возбудителем бруцеллеза.

При повторном инфицировании мышей, больных острым бруцеллезом, количество антигенреактивных $CD3^+CD25^+$ – лимфоцитов находилось примерно на одном уровне – в среднем $17,5 \pm 0,87$ % ($Me=18,5$ %). На 7-е сутки после повторного инфицирования медианное значение коэффициента антигенной стимуляции популяции сенсibilизированных $CD3^+CD25^+$ лимфоцитов составило 50,03 % ($20,1 \div 60,7$ %), 14 сутки – $Me=47,02$ % ($29,8 \div 58,06$ %), 21 сутки – $Me=59,8$ % ($53,1 \div 69,2$ %), 28 сутки – $Me=50,6$ % ($44,1 \div 62,3$ %).

При активации Т-лимфоцитов индуцируется экспрессия на клеточной поверхности антигена CD69, который отражает пролиферативную активность (эффекторную готовность) лимфоцитов и в большой степени обеспечивает локализацию (поддержание депо) Т-клеток в лимфоидных органах для иммунологического премирования и специфической селекции [45].

Анализ динамики экспрессии раннего активационного маркера CD69 на Т-лимфоцитах выявил следующую картину. На 7-е сутки медиана коэффициента стимуляции $CD3^+CD69^+$ -клеток составила 23,4 % ($2,15 \div 53,8$ %). К 14-м суткам отмечался рост активности до 51,94 % ($41,7 \div 63,7$ %). Максимальная активация сохранялась на 21-е сутки: медиана КС – 50,3 % ($33,1 \div 75,98$ %), после чего к 28-м суткам наблюдалось снижение показателя до 48,2 %.

В условиях повторного инфицирования возбудителем бруцеллеза, фоновое количество активированных $CD3^+CD69^+$ лимфоцитов составило в среднем по всем срокам исследования $5,43 \pm 0,58$ % $Me=5,28$ %. При этом можно отметить повышение пролиферативного и костимулирующего потенциала Т-клеточной активности, на что указывает увеличение коэффициента стимуляции. Так, на 7 сутки после повторного заражения биомоделей штаммом *B. abortus* 544 отмечается двукратное увеличение КС $CD3^+CD69^+$ – $Me = 53,6$ % ($38,1 \div 59,9$ %). На 14 и 21 сутки после инфицирования наблюдается дальнейшее существенное усиление ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию бруцеллезным антигеном – Me КС составила 62,6 % ($27,1 \div 69,3$ %) и 70,01 % ($50,1 \div 74,6$ %). На 28 сутки после повторного инфицирования биомоделей бруцеллами отмечено сохранение высокого уровня

КС пула антигенреактивных Т-лимфоцитов – $Me = 50,1 \%$ ($48,1 \div 50,24 \%$) (рисунок 20).

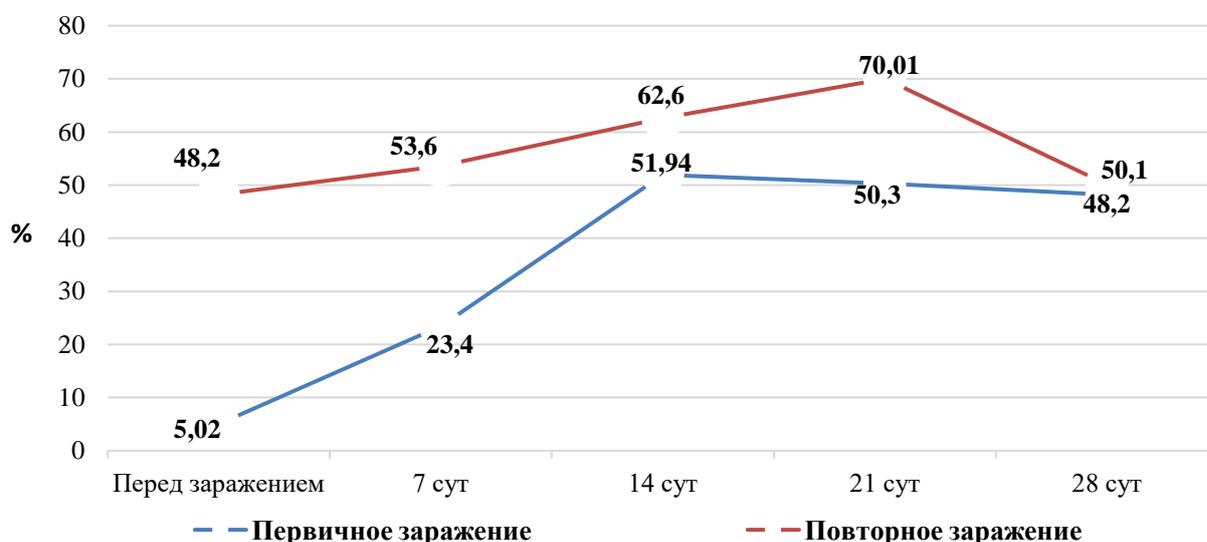


Рисунок 20 – Динамика значений КС активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+CD69^+$) у биомоделей после первичного и повторного заражения возбудителем бруцеллеза.

В динамике развития острой бруцеллезной инфекции у биомоделей после инфицирования *B. abortus* 544 выявлен постепенный рост интенсивности активации Т-клеток при *in vitro* воздействии бруцеллезным антигенным комплексом. На 7 и 14 сутки после заражения медианные значения КС $CD3^+MHC-II^+$ были между собой достаточно близки и составили 20,9 % ($6,89 \div 36,8 \%$) и 27,4 % ($19,4 \div 47,7\%$) соответственно. На 21 и 28 сутки коэффициент антигенной стимуляции пула сенсibilизированных $MHC-II^+$ Т-клеток увеличился почти в два раза – $Me = 47,5 \%$ ($23,5 \div 82,8 \%$) и $Me = 53,02 \%$ ($29,6 \div 85,8 \%$) соответственно.

После повторного заражения лабораторных мышей патогенным штаммом бруцелл во все сроки наблюдения отмечается постепенное увеличение доли $MHC-II$ -позитивных Т-клеток, проявляющих активность в отношении бруцеллезного антигена. Значения КС пула сенсibilизированных $CD3^+MHC-II^+$ на 7, 14, 21 и 28 сутки после повторного инфицирования составили – $Me = 62,6 \%$ ($46,2 \div 78,8 \%$),

$Me = 64,8 \%$ ($43,4 \div 91,3 \%$), $Me = 70,2 \%$ ($56,4 \div 79,1 \%$) и $Me = 76,9 \%$ ($74,2 \div 78,9 \%$) соответственно (рисунок 21).

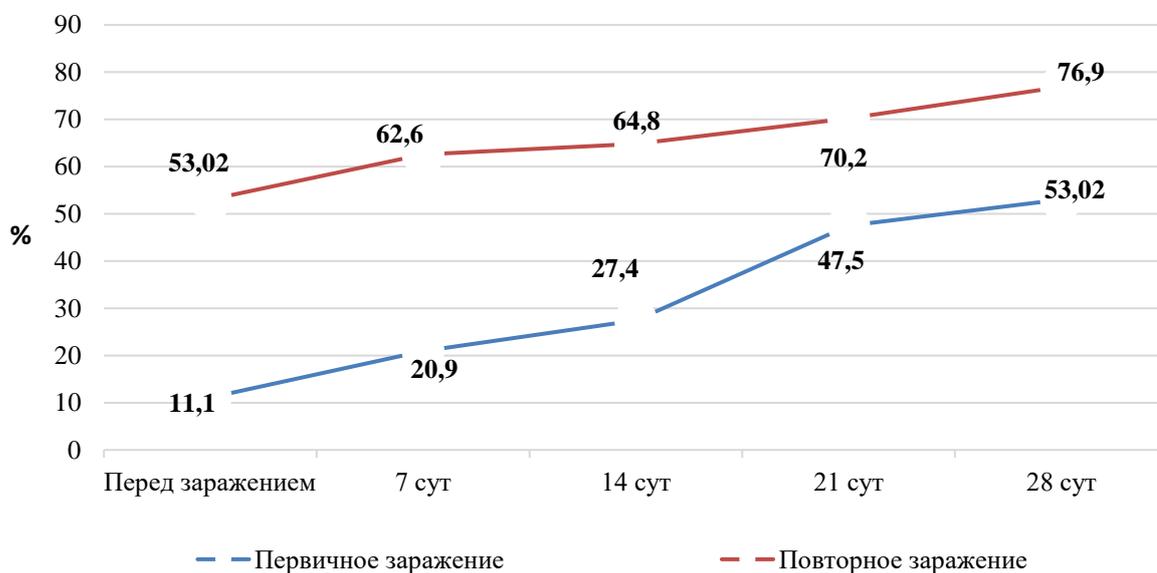


Рисунок 21 – Динамика КС стимуляции активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+MHC-II^+$) у биомоделей после первичного и повторного заражения возбудителем бруцеллеза.

При моделировании повторного заражения на фоне течения острого бруцеллеза, отмечено поддержание на том же уровне ($CD3^+CD25^+$) или постепенный подъем ($CD3^+CD69^+$, $CD3^+MHC-II^+$) пула антигенреактивных $CD3^+$ -клеток, что подтверждает особенности вторичного иммунного ответа.

Представленные данные могут быть использованы для анализа и сопоставления общих, специфических иммуновоспалительных реакций при комплексной диагностике бруцеллеза и верификации диагноза, а также для разработки алгоритма установления случаев реинфицирования бруцеллами, которые могут возникать в 8-11 % случаев в эпизоотических очагах бруцеллёза.

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

Для бруцеллеза у людей характерно достаточно длительное и рецидивирующее течение с формированием мультисистемной воспалительной реакции. В связи с формированием фагоцитарной дисфункции (незавершенность фагоцитоза) возбудитель длительно циркулирует внутри макрофагов, что инициирует медленное развитие ответной иммунной реакции. На фоне иммунорегуляторного дисбаланса Th1- и Th2 – комплексных иммунных ответов формируются условия для бактериемии и образования метастатических очагов бактерий (локализованные инфильтраты) в органах [248].

На фоне септического процесса, обусловленного в том числе эндотоксином и другими продуктами жизнедеятельности бактерий, возникает в организме прогрессирующее системное воспаление, при котором, с одной стороны, индуктором, а с другой, лимитирующим фактором является состояние иммунитета, в том числе адаптивного [190].

В процессе фагоцитоза лейкоциты кроме удаления генетически чужеродных структур, участвуют в синтезе биологически активных веществ, регулирующих иммунно-воспалительные процессы. Анализ маркеров метаболической и функциональной активности лейкоцитов - катионные белки, миелопероксидаза, сукцинатдегидрогеназа, кислая фосфатаза, состояние кислородзависимого механизма бактерицидности фагоцитов, необходим для оценки формирования адаптивного иммунитета [40, 74].

Показано, что лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) позволяет характеризовать степень эндогенной интоксикации и остроту воспаления [4].

Проводили исследования на инфицированных подкожно патогенным штаммом *Brucella melitensis* С-565 в дозе 10^6 ж.м.к. аутбредных белых мышах (n=60), в качестве контроля служили интактные мыши. Забор крови проводили на 7, 14, 21 и 30 сутки после инфицирования (по 12 особей). Определяли общее

количество лейкоцитов и лейкограмму, рассчитывали ЛИИ. В лейкоцитах крови цитохимически выявляли МПО, лизосомальные КБ, КФ и СДГ, интенсивность «метаболического взрыва» в нейтрофилах оценивали с помощью НСТ-теста. Для оценки функциональной активности Т-лимфоцитов исследовали как спонтанную (фоновую), так и антиген-стимулированную экспрессию ключевых активационных маркеров – CD25, CD69, CD71 и CD95.

У инфицированных белых мышей выявлено закономерное повышение общего количества лейкоцитов (лейкоцитоз) во все сроки исследования, при этом максимальные значения были зафиксированы на 14 сутки ($14,3 \pm 1,25 \times 10^9/\text{л}$) и 30 сутки ($13,8 \pm 1,18 \times 10^9/\text{л}$) после инфицирования (таблица 11). Повышение значений лейкоцитарного индекса интоксикации на 14 сутки и сохранение высоких значений показателя до 30 дня после заражения возбудителем бруцеллеза отражает формирование бактериемии (фазы первичной и вторичной генерализации) и эндотоксинемии (преимущественное за счет действия эндотоксина – ЛПС бактерий).

Таблица 11 – Значения энзимоцитохимических показателей и бактерицидных систем фагоцитов в динамике развития острой бруцеллезной инфекции у биомоделей

Сутки	Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	НСТ-тест, %	СДГ, ед	КФ, ед	КБ, ед	МПО, ед	АФК в ПМЯЛ
7	$7,32 \pm 0,95$	$26,60 \pm 2,54$	$7,17 \pm 1,80$	$1,07 \pm 0,11$	$1,13 \pm 0,05$	$0,81 \pm 0,04$	$2,35 \pm 0,42$
14	$14,30 \pm 1,25$	$24,40 \pm 2,54$	$5,21 \pm 0,06$	$1,87 \pm 0,06$	$0,70 \pm 0,06$	$0,50 \pm 0,07$	$5,78 \pm 1,39$
21	$10,98 \pm 2,19$	$13,17 \pm 1,49$	$5,93 \pm 0,08$	$1,56 \pm 0,12$	$0,78 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,34$
30	$13,80 \pm 1,18$	$10,60 \pm 0,40$	$6,46 \pm 0,80$	$0,81 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,09$	0,0
контроль	$7,59 \pm 0,17$	$9,13 \pm 0,93$	$7,28 \pm 0,57$	$0,72 \pm 0,008$	$0,55 \pm 0,04$	$0,81 \pm 0,04$	0,0

В этот период развития бруцеллезной инфекции у человека, как правило, начинает проявляться и прогрессирует клиническая симптоматика острой инфекции.

Анализ изменения значений энзимохимических показателей и бактерицидного потенциала фагоцитов позволил установить повышение значений НСТ-теста, особенно выраженное увеличение кислородзависимого бактерицидного потенциала нейтрофилов было отмечено на более ранних сроках после заражения на 7 сутки ($26,6 \pm 2,54$ Ед.) и 14 день ($24,4 \pm 2,54$ Ед.), что связано с активной реакцией фагоцитов на инвазию возбудителя и отражает высокую интенсивность воспалительной реакции. Угнетение активности МПО ПМЯЛ, снижение уровня активности СДГ, уровень лизосомальных КБ и активность КФ указывают на развитие иммуновоспалительного процесса после инфицирования лабораторных животных патогенным штаммом. При переходе инфекционного процесса в стадию формирования нестерильного адаптивного иммунитета на 30 сутки наблюдения значения цитологических показателей приближались к нормальным значениям.

Кроме того, к важным цитологическим показателям, отражающим интенсивность (остроту) иммуновоспалительной реакции, относят наличие признаков «респираторного взрыва» в цитоплазме ПМЯЛ, который развивается в клетках при фагоцитозе и активных межклеточных медиаторных кооперациях, в том числе обусловленных реакцией на патоген [200]. В процессе развития бруцеллезного процесса отмечаются существенное увеличение количества фагоцитов с повышенным синтезом активных форм кислорода в начальный период развития инфекции. Наиболее высокие количества ПМЯЛ, находящихся в состоянии «респираторного взрыва», было выявлено на 7 сутки ($2,35 \pm 0,15$) и 14 сутки ($5,78 \pm 0,25$), что отражает эффекторную роль нейтрофилов в реакциях острого воспаления.

Показательна динамика активности продукции иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли (TNF) и интерлейкина 6 (IL-6) при развитии острого бруцеллезного процесса, которая коррелирует с интенсивностью воспалительного процесса, обусловленного угнетением Th1-иммунитета, и связана с развитием Т-клеточной анергии, вызванной воздействием бруцелл. Наиболее высокие значения TNF были

зарегистрированы на 14 день ($146,5 \pm 8,28$ пг/мл) и 21 сутки ($100,3 \pm 5,13$ пг/мл) после заражения. Наибольшие значения цитокина IL-6 отмечены на 30 сутки ($35,4 \pm 2,82$ пг/мл), что очевидно ассоциировано с интенсивным развитием эндотоксикации на фоне бактериемии и генерализации инфекции. Кроме того, повышенную продукцию IL-6 через месяц после заражения можно связать с интенсивным формированием нестерильного адаптивного иммунитета и активным праймингом с пролиферацией лимфоцитов (таблица 12).

Таблица 12 – Значения концентрации цитокинов в динамике развития острой бруцеллезной инфекции у биомоделей

Сутки	TNF, нг/мл	Прокальцитонин, пкг/мл	IL-6, пкг/мл	IL-10, пкг/мл
7	$52,55 \pm 7,23$	$0,40 \pm 0,30$	$8,62 \pm 2,39$	$5,17 \pm 0,39$
14	$146,5 \pm 47,15$	$1,79 \pm 0,12$	$9,30 \pm 3,15$	$0,72 \pm 0,18$
21	$100,35 \pm 47,65$	$1,27 \pm 0,10$	$18,21 \pm 2,54$	$1,92 \pm 0,14$
30	$42,0 \pm 8,54$	$0,11 \pm 0,09$	$35,4 \pm 2,82$	$10,1 \pm 0,73$
контроль	$20,15 \pm 2,18$	$0,01 \pm 0,0$	$1,22 \pm 1,52$	$0,01 \pm 0,0$

Анализ динамики уровня противовоспалительного цитокина IL-10 выявил повышение его продукции на 7-е сутки после заражения ($5,17 \pm 0,39$ пг/мл), что, вероятно, связано с активацией факторов вирулентности бруцелл в ранней стадии инфекции и направлено на модуляцию иммунного ответа, подавлением экспрессии CD4 Th1 цитокинов и рецепторов МНС класса II. Наиболее высокий уровень IL-10 был отмечен на 30 день исследования после заражения ($10,1 \pm 0,73$ пг/мл), что также обусловлено генерализацией инфекции и ассоциировано с ингибированием клеток ММС.

Вызывают интерес данные об изменении концентрации маркера септического воспаления прокальцитонина (ПКТ), увеличение которого также характерно и для системной воспалительной реакции. Пиковые значения ПКТ

были отмечены на 14 сутки ($1,79 \pm 0,12$ нг/мл) и 21 сутки ($1,27 \pm 0,10$ нг/мл) после инфицирования, что очень тесно коррелирует с динамикой значения TNF ($r = 0,984$) и, вероятно, связано бактериемией и формированием метастатических очагов инфекции.

Анализ связи динамики значений коэффициента стимуляции пула антигенреактивных $CD3^+CD25^+$ и значений показателей, отражающих интенсивность иммуновоспалительных реакций, позволил установить сильную прямую «функциональную» корреляцию с изменением количества лейкоцитов (выраженность лейкоцитоза) ($r = 0,955$; $p < 0,05$), лейкоцитарного индекса интоксикации ($r = 0,968$; $p < 0,05$), а также умеренную связь с динамикой активности кислой фосфатазы фагоцитов ($r = 0,553$; $p < 0,05$), прокальцитонина ($r = 0,554$; $p < 0,05$) и более слабую корреляцию с TNF в сыворотке крови ($r = 0,399$; $p < 0,05$). Кроме того, была отмечена сильная обратно-пропорциональная связь интенсивности антигенной стимуляции Т-клеток, экспрессирующих рецепторы к IL2, с динамиком активности СДГ нейтрофилов ($r = -0,878$; $p < 0,05$), бактерицидной активности фагоцитов за счет усиления окислительных реакций ($r = -0,710$; $p < 0,05$), а также умеренная отрицательная зависимость со значениями КБ ($r = -0,668$; $p < 0,05$) и активности МПО ($r = -0,548$; $p < 0,05$) нейтрофилов. Регрессионный анализ выявил высокий уровень взаимосвязи между интенсивностью антигенспецифической *ex vivo* активации $CD3^+CD25^+$ и динамикой значений лейкоцитов ($R^2 = 0,912$), ЛИИ ($R^2 = 0,938$) и СДГ фагоцитов ($R^2 = 0,770$) (таблица 13).

Таблица 13 – Анализ корреляции и зависимости динамики интенсивности состояния антигенреактивности CD3⁺CD25⁺ *ex vivo* и энзимоцитологических, иммунорегуляторных, биохимических показателей

Показатели	Коэффициент стимуляции CD3 ⁺ CD25 ⁺	
	<i>r</i>	<i>R</i> ²
Лейкоциты	0,955***	0,912***
ЛИИ	0,968***	0,938
НСТ-тест	-0,710**	0,504*
АФК в нейтрофилах («респираторный взрыв»)	-0,066	0,004
КБ	-0,668**	0,446*
МПО	-0,548*	0,299
СДГ	-0,878***	0,770**
КФ	0,553*	0,306
TNF	0,399	0,159
IL-6	0,204	0,041
IL-10	-0,051	0,002
Прокальцитонин	0,554*	0,307

*Примечание. Шкала Е.П. Голубкова для коэффициента корреляции Пирсона (по модулю): 0,00–0,20 – отсутствует; 0,21–0,40 – очень слабая; * – 0,41–0,60 – слабая; ** – 0,61–0,80 – умеренная; *** – >0,80 – сильная.*

Результаты расчета коэффициента корреляции по Спирмену показали, что между динамикой пула антигенреактивных CD3⁺CD69⁺ отмечена высокая степень прямой связи только со значениями концентраций провоспалительного цитокина TNFα ($r=0,957$; $p < 0,05$) и содержанием прокальцитонина ($r=0,910$; $p < 0,05$) в сыворотке крови. Умеренная положительная связь отмечается с такими показателями, как количество фагоцитов с активными формами кислорода («респираторный взрыв») ($r= 0,664$; $p < 0,05$), значениями ЛИИ ($r=0,443$; $p < 0,05$) и, слабее, бактерицидной активности фагоцитов в НСТ-тесте ($r=0,340$; $p < 0,05$) (таблица 14).

Таблица 14 – Анализ корреляции и зависимости динамики интенсивности состояния антигенреактивности $CD3^+CD69^+ ex vivo$ и энзимоцитологических, иммунорегуляторных, биохимических показателей

Показатели	Коэффициент стимуляции $CD3^+CD69^+$	
	r	R^2
Лейкоциты	0,234	0,055
ЛИИ	0,443*	0,196
НСТ-тест	0,340	0,115
АФК в нейтрофилах («респираторный взрыв»)	0,664**	0,441*
КБ	0,227	0,051
МПО	-0,835***	0,698**
СДГ	0,261	0,068
КФ	-0,615**	0,378
TNF	0,957***	0,915***
IL-6	-0,903***	0,816***
IL-10	-0,986***	0,972***
Прокальцитонин	0,910***	0,828***

Примечание. Шкала Е.П. Голубкова для коэффициента корреляции Пирсона (по модулю): 0,00–0,20 – отсутствует; 0,21–0,40 – очень слабая; * – 0,41–0,60 – слабая; ** – 0,61–0,80 – умеренная; *** – >0,80 – сильная.

Обратно пропорциональная (отрицательная) связь интенсивности антигенной стимуляции Т-клеток, экспрессирующих маркер наиболее ранней активации и готовности к дифференциации $CD3^+$ -лимфоцитов ($CD69$), была выявлена с изменением значений концентраций цитокинов IL-6 ($r=-0,903$; $p < 0,05$) и IL-10 ($r=-0,986$; $p < 0,05$), динамики активности миелопероксидазы ($r=-0,835$) и кислой фосфатазы ($r=-0,615$; $p < 0,05$) фагоцитов. Регрессионный анализ связей между исследуемыми показателями позволил установить наличие высокой зависимости (возможной функциональной связи) интенсивности антигенспецифической *ex vivo* активации $CD3^+CD69^+$ с динамикой концентраций IL-10 ($R^2=0,972$), провоспалительных цитокинов TNF ($R^2=0,915$), IL-6 ($R^2=0,816$) и

прокальцитонина ($R^2=0,828$), с динамикой изменения которого была выявлена очень тесная положительная корреляция.

Большой интерес вызывают данные, представленные в таблице 15, по изучению тесноты связи динамикой пула антигенреактивных Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы трансферина (CD71), высокие показатели экспрессии которого отмечаются среди пула функционально высоко метаболически активных клеток, отражает повышенную активность митохондрий, усиленный синтез ДНК, пролиферацию и рост.

Таблица 15 – Анализ корреляции и зависимости динамики интенсивности состояния антигенреактивности $CD3^+CD71^+$ *ex vivo* и энзимцитологических, иммунорегуляторных, биохимических показателей

Показатели	Коэффициент стимуляции $CD3^+CD71^+$	
	<i>r</i>	R^2
Лейкоциты	-0,635**	0,404
ЛИИ	-0,585*	0,343
НСТ-тест	0,950***	0,902***
АФК в нейтрофилах («респираторный взрыв»)	0,635**	0,403
КБ	0,868***	0,754**
МПО	-0,140	0,019
СДГ	0,973***	0,947***
КФ	-0,820***	0,672**
TNF	0,313**	0,097
IL-6	-0,794**	0,631**
IL-10	-0,594*	0,353
Прокальцитонин	0,141	0,020

Примечание. Шкала Е.П. Голубкова для коэффициента корреляции Пирсона (по модулю): 0,00–0,20 – отсутствует; 0,21–0,40 – очень слабая; * – 0,41–0,60 – слабая; ** – 0,61–0,80 – умеренная; *** – >0,80 – сильная.

Схожая тенденция отмечена при изучении тесноты связи динамики пула антигенреактивных CD3⁺CD95⁺ и изучаемых показателей (таблица 16).

Таблица 16 – Анализ корреляции и зависимости динамики интенсивности состояния антигенреактивности CD3⁺CD95⁺ *ex vivo* и энзимцитологических, иммунорегуляторных, биохимических показателей

Показатели	Коэффициент стимуляции CD3 ⁺ CD95 ⁺	
	<i>r</i>	<i>R</i> ²
Лейкоциты	-0,449*	0,202
ЛИИ	-0,404	0,163
НСТ-тест	0,940***	0,884***
АФК в нейтрофилах («респираторный взрыв»)	0,775**	0,601*
КБ	0,864***	0,746**
МПО	-0,357	0,127
СДГ	0,898***	0,806***
КФ	-0,791**	0,625**
TNF	0,508*	0,258
IL-6	-0,892***	0,797**
IL-10	-0,725**	0,526*
Прокальцитонин	0,350	0,123

*Примечание. Шкала Е.П. Голубкова для коэффициента корреляции Пирсона (по модулю): 0,00–0,20 – отсутствует; 0,21–0,40 – очень слабая; * – 0,41–0,60 – слабая; ** – 0,61–0,80 – умеренная; *** – >0,80 – сильная.*

Таким образом, по результатам исследования были изучены особенности корреляции и зависимости динамики интенсивности состояния антигенреактивности Т-лимфоцитов *ex vivo* (по коэффициентам антигенной стимуляции пулов клеток CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺, CD3⁺CD95⁺) и некоторых энзимцитологических, иммунорегуляторных, биохимических показателей, характеризующих и ассоциированных с иммуновоспалительными реакциями, и их интенсивностью, в динамике развития острой бруцеллезной

инфекции. Проанализированный комплекс показателей отражает относительно высокую интенсивность эндогенной интоксикации и воспаления, а также формирование иммунорегуляторного дисбаланса.

Анализ статистической зависимости между изучаемыми переменными показал наличие высокой степени связи увеличения доли клеток CD3⁺CD25⁺ и выраженности лейкоцитоза, а также уровня эндогенной интоксикации и остроты воспаления (по результатам исследования лейкоцитарного индекса интоксикации) у экспериментальных биомоделей. Также, исследования показали высокую связь повышения антигениндуцированной экспрессии Т-лимфоцитами рецептора к IL-2 и снижения активности сукцинатдегидрогеназы и НСТ-теста фагоцитов, что свидетельствует об ослаблении окислительного потенциала лейкоцитов, отражая снижение уровня интоксикации и интенсивности воспаления.

Проведенные исследования имеют важное клиническое значение, особенно с учетом того, что у больных с острой бруцеллезной инфекцией сохраняется риск формирования высокоинтенсивной системной реакции иммунной системы по типу «цитокинового шторма». Это обусловлено преимущественно нейтрофильными и макрофагальными факторами (регуляция гена S100A8/A9), кроме того, взаимодействие активированных макрофагов и моноцитов с рецептор-активированными эндотелиальными клетками, что как правило происходит при I-II фазах развития острого бруцеллёза [259, 275].

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

В мире, в целом, бруцеллез официально регистрируется (выявляется) в соотношении 1:10-1:26 (на один зарегистрированный случай приходится 10-26 незарегистрированных). При этом, в странах длительно неблагополучных по бруцеллезу доля не выявленных случаев бруцеллезной инфекции выше, чем в государствах, относительно благополучных по этой инфекции [62].

В иммунопатогенетическом аспекте к принципиальной разнице острой и хронической бруцеллезной инфекции (первичной, вторичной) можно отнести формирование при остром бруцеллезе бактериемии, ингибирование естественной резистентности (преимущественно фагоцитарных факторов), поляризации иммунного ответа в сторону антителогенеза, формирования преимущественно Th2-иммунного ответа, или, при хронизации – ингибирование созревания дендритных клеток, формирование гиперчувствительности замедленного типа, иммуносупрессия и замедление адаптивного иммунного ответа в отношении патогена с развитием внутриклеточного персистирования инфекции [12, 20, 21, 113, 116, 220, 276]. В популяциях иммунных клеток (преимущественно лимфоцитов и моноцитов) периферической крови в разных фазах заболевания происходит смена иммунологической реактивности, что подтверждается тесной связью между стадией/формой заболевания и иммунным ответом хозяина. Выявление этих изменений могут способствовать лучшему пониманию патогенных и защитных иммунных реакций при бруцеллезе и иметь важное значение для профилактики инфекции.

Материал лиц, больных бруцеллезом (n=98), был взят после госпитализации в инфекционное отделение ГБУЗ СК Городская клиническая больница №2 г. Ставрополя и установления окончательного диагноза, с диагнозами «острый бруцеллез» (n=55), «хронический бруцеллез» (n=43).

У пациентов с диагнозом «острый бруцеллез» при *in vitro*-стимуляции бруцеллезным антигенным препаратом наблюдалось двукратное повышение интенсивности активации Т-лимфоцитов по сравнению с фоновыми значениями. Фоновые значения CD3⁺CD25⁺ составили 8,37±1,45%, CD3⁺CD69⁺ – 9,02 ± 1,42 %, CD3⁺CD71⁺ – 5,44 ± 1,11%. После инкубации с АБПК доля активированных Т-клеток имела следующие средние значения: CD3⁺CD25⁺ – 17,52 ± 2,31% (Me КС – 52,38 %), CD3⁺CD69⁺ – 20,87 ± 2,14% (Me КС – 54,63 %) и CD3⁺CD71⁺ – 12,03 ± 1,72% (Me КС – 50,31%) (таблица 17).

Таблица 17 – Значения активированных субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺ у больных с диагнозом «острый бруцеллез»

Маркеры активации	Фоновые значения	После инкубации с АБПК
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (%)	8,37 ± 1,45	17,52 ± 2,31
CD3 ⁺ CD69 ⁺ (%)	9,02 ± 1,42	20,87 ± 2,14
CD3 ⁺ CD71 ⁺ (%)	5,44 ± 1,11	12,03 ± 1,72

При изучении амбулаторных карт больных с диагнозом «хронический бруцеллез» у 14 человек (первая группа) наблюдались ярко выраженные признаки подострого и хронического бруцеллеза, а также симптомы обострения инфекционного процесса. В данной группе больных наблюдались максимально высокие показатели интенсивности антигениндуцированной экспрессии маркеров CD25, CD69, CD71 на поверхности CD3-лимфоцитов ($p \leq 0,05$) при *in vitro* стимулировании АБПК. При этом контрольные значения CD3⁺CD25⁺ в среднем составили 8,71 ± 1,23 %, CD3⁺CD69⁺ – 10,28 ± 2,13 %, CD3⁺CD71⁺ – 6,37 ± 1,87%. После инкубации с АБПК доля активированных Т-клеток имела следующие средние значения: CD3⁺CD25⁺ – 19,36 ± 1,82 % (*Me* КС – 53,89 %), CD3⁺CD69⁺ – 23,93 ± 2,12 % (*Me* КС – 56,92 %), и CD3⁺CD71⁺ – 15,32 ± 2,58 % (*Me* КС – 60,15 %) (таблица 18).

Таблица 18 – Значения активированных субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺ у больных с диагнозом «хронический бруцеллез»

Маркеры активации	Фоновые значения	После инкубации с АБПК	
		1 группа (n=14)	2 группа (n=29)
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (%)	8,71 ± 1,23	19,36 ± 1,82	14,49 ± 1,24
CD3 ⁺ CD69 ⁺ (%)	10,28 ± 2,13	23,93 ± 2,12	17,81 ± 2,14
CD3 ⁺ CD71 ⁺ (%)	6,37 ± 1,87	15,32 ± 2,58	10,89 ± 1,58

Указанное обострение у больных с активной хронической формой бруцеллеза обусловлено рецидивирующим характером инфекционного процесса, сопровождающимся метастатической диссеминацией *Brucella* spp. из вторичных очагов и повторным антигенным стимулированием иммунной системы, что приводит к усилению воспалительного и иммунного ответа.

Как видно из таблицы 18 у лиц из второй группы больных хроническим бруцеллезом уровень средних значений экспрессии активационных молекул Т-лимфоцитами, стимулированных АБПК, также превышал контрольные значения. Однако, медианные значения КС активированных бруцеллезным антигеном субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺CD25⁺ (38,69 %), CD3⁺CD69⁺ (41,42 %), CD3⁺CD71⁺ (41,19 %) не превышали 50 % в отличие от других групп (таблица 19).

Таблица 19 – Медианные значения коэффициента стимуляции 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» (n=55)	Больные с диагнозом «хронический бруцеллез»	
		1 группа (n=14)	2 группа (n=29)
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

Также были проведены исследования для выявления тесноты связи значений результатов иммунно-диагностических реакций и пула антигенреактивных клеток Т-клеток у больных острым бруцеллезом. Было установлено, что у пациентов с выражено положительной реакцией Хеддельсона отмечалась несколько более высокая средняя экспрессия активационных маркеров на Т-лимфоцитах после стимуляции АБПК по сравнению со средними значениями в когорте с острым течением бруцеллеза (статистически не значимо при доверительном интервале 95 %), составив в среднем по CD3⁺CD25⁺ – 17,56 ± 1,85 % (Me КС =53,4 %),

CD3⁺CD69⁺ – 25,47 ± 2,84 % (*Me* КС =61,8 %), CD3⁺CD71⁺ – 14,22± 2,35 % (*Me* КС =60,1 %). У пациентов с положительной реакцией Хеддельсона средние значения CD3⁺CD25⁺ регистрировались в диапазоне 16,06 ± 2,52 % (*Me* КС =47,5%), CD3⁺CD69⁺ – 23,12 ± 2,71 % (*Me* КС =57,9 %), CD3⁺CD71⁺ – 12,35 ± 1,97 % (*Me* КС =54,1 %). Корреляционный анализ выявил отсутствие прямой зависимости уровня титра антител в реакции Райта и значениями интенсивности антигениндуцированной экспрессии маркеров CD25, CD69, CD71 на поверхности CD3-лимфоцитов. При этом было выявлено, что у больных с титром антител 1:100 медианные значения КС выше (CD3⁺CD25⁺*Me* КС = 49,2 %, CD3⁺CD69⁺ *Me* КС =52,3 %, CD3⁺CD71⁺ *Me* КС = 53,2 %), чем у лиц с антителами в титре 1:200 и выше (CD3⁺CD25⁺*Me* КС = 46,3 %, CD3⁺CD69⁺ *Me* КС =51,2 %, CD3⁺CD71⁺ *Me* КС =49,3 %). Анализ корреляции показал наличие слабой прямой связи значений коэффициента позитивности специфических иммуноглобулинов IgA и антигениндуцированной экспрессии CD3⁺CD25⁺ ($r = 0,285$), CD3⁺CD69⁺ ($r = 0,296$), CD3⁺CD71⁺ ($r = 0,273$) и умеренной прямой связи значений коэффициента позитивности специфических иммуноглобулинов IgG и экспрессии CD3⁺CD25⁺ ($r = 0,428$), CD3⁺CD69⁺ ($r = 0,483$), CD3⁺CD71⁺ ($r = 0,459$) (таблица 20).

Таблица 20 – Корреляционный анализ интенсивности антигенспецифической реактивности Т-лимфоцитов и уровня специфических антител

Показатели	CD3 ⁺ CD25 ⁺		CD3 ⁺ CD69 ⁺		CD3 ⁺ CD71 ⁺	
	<i>r</i>	<i>R</i> ²	<i>r</i>	<i>R</i> ²	<i>r</i>	<i>R</i> ²
Острый бруцеллез						
IgA	0,285	0,070	0,296	0,051	0,273	0,019
IgM	-0,401	0,131	-0,397	0,101	-0,421	0,011
IgG	0,428	0,223	0,483	0,109	0,459	0,023
Хронический бруцеллез						
IgA	-0,214	0,037	-0,251	0,054	-0,234	0,025
IgM	0,085	0,033	0,092	0,097	0,071	0,096
IgG	0,195	0,072	0,222	0,088	0,271	0,074

При этом была выявлена умеренная обратно пропорциональная корреляция относительно содержания IgM – CD3⁺CD25⁺ ($r = -0,401$), CD3⁺CD69⁺ ($r = -0,397$), CD3⁺CD71⁺ ($r = -0,421$). Кроме того, регрессионный анализ выявил отсутствие у больных острым бруцеллезом тесной зависимости значений КП IgA, IgM, IgG и интенсивности экспрессии, стимулированной антигеном АБПК, *in vitro* экспрессии CD25 ($R^2_{IgA} = 0,070$, $R^2_{IgM} = 0,131$, $R^2_{IgG} = 0,223$), CD69 ($R^2_{IgA} = 0,051$, $R^2_{IgM} = 0,101$, $R^2_{IgG} = 0,109$) и CD71 ($R^2_{IgA} = 0,019$, $R^2_{IgM} = 0,011$, $R^2_{IgG} = 0,023$).

У пациентов с хронической формой бруцеллеза была оценена корреляция между титрами антител в реакции Райта и объемом антиген-индуцированного пула CD3⁺ Т-лимфоцитов, служащего показателем специфической клеточной иммунной реактивности. Было показано, что у лиц с резко положительной и положительной реакцией Райта, средние значения интенсивности антигениндуцированной экспрессии маркеров CD25, CD69, CD71 не сильно отличались от средних значений первой и второй группы больных, но были немного выше: в первой группе – CD3⁺CD25⁺ – $19,57 \pm 1,39$ % ($Me_{KC} = 54,1$ %), CD3⁺CD69⁺ – $24,54 \pm 2,22$ % ($Me_{KC} = 57,4$ %), CD3⁺CD71⁺ – $16,74 \pm 2,43$ % ($Me_{KC} = 61,8$ %) и во второй группе – CD3⁺CD25⁺ – $14,65 \pm 1,25$ % ($Me_{KC} = 39,4$ %), CD3⁺CD69⁺ – $18,11 \pm 2,47$ % ($Me_{KC} = 42,3$ %), CD3⁺CD71⁺ – $11,07 \pm 2,03$ % ($Me_{KC} = 42,2$ %). Среди обследованных хронически больных только у 5 человек первой группы регистрировалось наличие антител в титре 1:50 (сомнительная реакция), уровень антигениндуцированной *ex vivo* антигенреактивности Т-лимфоцитов не отличался от данных по всей группе. Изучение корреляции значений коэффициента позитивности специфических иммуноглобулинов и антигениндуцированной экспрессии CD3⁺CD25⁺ ($r = 0,085$), CD3⁺CD69⁺ ($r = 0,092$), CD3⁺CD71⁺ ($r = 0,071$) показало отсутствие корреляции с содержанием IgM, наличие слабой прямой связи с КП IgG – CD3⁺CD25⁺ ($r = 0,195$), CD3⁺CD69⁺ ($r = 0,222$), CD3⁺CD71⁺ ($r = 0,271$) и слабой обратно пропорциональной корреляции с КП IgA – CD3⁺CD25⁺ ($r = -0,214$), CD3⁺CD69⁺ ($r = -0,251$), CD3⁺CD71⁺ ($r = -0,234$) ($r = -0,243$). Анализ степени взаимосвязи продукции специфических иммуноглобулинов и *ex vivo* интенсивности антигенной активации Т-лимфоцитов указал на отсутствие детерминированности этих показателей у

больных хроническим бруцеллёзом CD25 ($R^2_{IgA} = 0,037$, $R^2_{IgM} = 0,033$, $R^2_{IgG} = 0,072$), CD69 ($R^2_{IgA} = 0,054$, $R^2_{IgM} = 0,097$, $R^2_{IgG} = 0,088$) и CD71 ($R^2_{IgA} = 0,025$, $R^2_{IgM} = 0,096$, $R^2_{IgG} = 0,074$).

Таким образом, наиболее высокие значения *ex vivo* 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⁺ – 50-60 %) и уровень регуляции был выше, чем у больных с хроническим бруцеллезом в состоянии ремиссии. При этом, было обнаружено, что у лиц с хроническим бруцеллезом без рецидивирующего течения выявлен больший 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, видимо, цитотоксического эффекта. Корреляционный анализ не выявил статистически выраженной зависимости величины титра антител в реакции агглютинации 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 антителогенеза и антигенреактивностью *ex vivo* Т-клеток не выявлено, что подчёркивает ограниченную информативность серологических методов в оценке клеточного иммунитета при бруцеллезе.

3.3 Анализ механизмов формирования и активации специфического иммунитета к бруцеллезу с использованием клеточного антигенспецифического *in vitro* теста

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

При иммунном ответе на проникновение бруцелл инициируется активный синтез Th1-цитокинов и поляризация иммунной реакции в сторону усиления клеточных факторов иммунитета, что имеет определяющую роль в локализации и устранении инфекции [262].

С учетом современных данных об особенностях формирования и функционирования иммунитета против бруцеллезной инфекции, а также известных молекулярных механизмов защиты, среди которых ведущая роль отводится специфической активности Т-клеток [109, 189, 274], целесообразно подробно изучить вопрос методической возможности и перспектив оценки протективной иммунологической защиты на основе анализа *ex vivo* антигенреактивности CD3-лимфоцитов.

Экспериментальные исследования проводили с использованием белых лабораторных мышей в количестве 300 особей, вакцинированных штаммом *Brucella abortus* 19ВА в разных дозах: 10^3 ж. м. к. (первая группа), 10^5 ж. м. к. (вторая группа) и 10^8 ж. м. к. (третья группа) в 0,5 мл стерильного 0,9% раствора NaCl. Контрольной группе вводили изотонический раствор натрия хлорида в аналогичном объеме. Обследования животных проводили перед иммунизацией и на 7, 14, 30, 60 и 90 день после по 10 особей, у которых цитометрически с использованием клеточного антигенспецифического теста определяли долю в популяции Т-клеток, которые экспрессируют рецепторы к IL-2, МНС-II и их число после активации АБПК. Для объективной оценки степени активации рассчитывали коэффициент стимуляции. Инфицирование белых мышей проводили через 3

месяца после иммунизации (по 15 животных на группу), вирулентным референтным штаммом *Brucella melitensis* 16-М в дозе 10^3 ж. м. к. в объеме 0,5 мл стерильного изотонического раствора (0,9% NaCl). [80]. Проводили бактериологическое исследование биоматериала в соответствии с МУ 3.1/4.2.4145-25 [93] на 21 сутки после заражения. По результатам бактериологических исследований были рассчитаны индексы инфицированности (ИИ) организма экспериментальных животных возбудителем бруцеллеза и интенсивности обсеменения внутренних органов (ИИОВО) [38, 70].

Методики вычисления индексов подробно описаны в главе «Материалы и методы». Полученные данные обрабатывали статистическими методами, определяли уровень корреляции по методу Пирсона и проводили регрессионный анализ связи значений исследуемых показателей (использовали шкалу Е.П. Голубкова) [24].

По результатам исследования было установлено, перед вакцинацией значения количества активированных лимфоцитов $CD3^+CD25^+$, $CD3^+MHC-II^+$ при активации АБПК практически не отличалась от фоновых значений.

У животных экспериментальной группы №1 после введения вакцины (иммунизирующая доза *Brucella abortus* 19-ВА – 10^3 ж.м.к.) отмечали постепенное повышение численности популяции лимфоцитов $CD3^+CD25^+$ с 7-го до 30-го дня после вакцинации. При этом, после 30 суток было отмечено уменьшение количества антигенреактивных $CD25^+$ - позитивных Т-клеток до значений, в среднем незначительно отличающихся от контрольных. Расчет медианных значений коэффициента стимуляции пула $CD3^+CD25^+$ клеток, на 7 сутки после иммунизации составили в среднем $17,23 \pm 0,57$ % ($Me = 16,91$ %), на 14 день обследования было отмечено увеличение активности антигенной активации $CD3^+$ -клеток. Анализ медианы значений КС антигенреактивных $CD3^+CD25^+$ -лимфоцитов выявил несущественное увеличение до $22,35\%$ ($21,73 \pm 1,09$ %) на 14 сутки и до $28,43$ % ($29,35 \pm 1,28$ %) на 30 сутки после иммунизации, тогда как на 60, 90 сутки регистрировалось понижение КС Т-клеток: Me $17,97$ % ($17,98 \pm 1,49$ %) и $13,09$ % ($15,42 \pm 2,79$ %) соответственно.

На 7 сутки во второй группе иммунных биомоделей (иммунизирующая доза *Brucella abortus* 19ВА – 10^5 ж.м.к.) наблюдалось увеличение значения КС по CD3⁺CD25⁺-лимфоцитов более чем в 3 раза до $35,1 \pm 1,95$ % ($Me = 34,10$ %) по сравнению со значениями до вакцинации $11,01 \pm 0,89$ % ($Me = 10,12$ %). На 14 сутки выявлено специфическое усиление экспрессии CD25 рецептора в среднем до $41,12 \pm 1,35$ % ($Me = 39,85$ %), а начиная с 30 суток и далее на 60 и 90 сутки, регистрировалось постепенное снижение: $33,43 \pm 1,85$ % ($Me = 32,25$), $25,08 \pm 1,33$ % ($Me = 24,41$ %) и $26,02 \pm 1,78$ % ($Me = 25,63$ %) (таблица 21).

Таблица 21 – Значения КС активированных субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺CD25⁺ у экспериментальных биомоделей в группах сравнения

Группы мышей, иммунизированных разными дозами <i>Brucella abortus</i> 19-ВА	Значения КС CD3 ⁺ CD25 ⁺ -лимфоцитов (%)				
	7 сутки	14 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
№ 1 (1×10^3 ж.м.к.)	$17,23 \pm 0,57$	$21,73 \pm 1,09$	$29,35 \pm 1,28$	$17,98 \pm 1,49$	$15,42 \pm 2,79$
№ 2 (1×10^5 ж.м.к.)	$35,1 \pm 1,95$	$41,12 \pm 1,35$	$33,43 \pm 1,85$	$25,08 \pm 1,33$	$26,02 \pm 1,78$
№ 3 (1×10^8 ж.м.к.)	$52,14 \pm 1,98^*$	$58,03 \pm 2,47^*$	$54,83 \pm 1,72^*$	$50,02 \pm 1,30^*$	$49,78 \pm 1,63$
контроль	$10,01 \pm 0,23$	$11,01 \pm 0,89$	$10,29 \pm 0,75$	$10,04 \pm 0,59$	$9,81 \pm 0,74$

* – значение КС $\geq 50\%$

Наиболее выраженный пролиферативный ответ Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию АБПК был зарегистрирован у мышей группы №3, получавших максимальную дозу штамма *Brucella abortus* 19ВА – 1×10^8 ж.м.к, что превышало показатели других экспериментальных групп (рисунок 22). Уже на 7-е сутки после иммунизации наблюдалось более чем пятикратное увеличение коэффициента антигенной стимуляции CD3⁺-лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD25, и составил – $52,14 \pm 1,98$ % ($Me = 51,85$ %), на 14 сутки ещё незначительно выросли значения до $58,03 \pm 2,47$ % ($Me = 56,74$ %). КС через 30, 60 и 90 дней после

иммунизации имел следующие средние значения: $54,83 \pm 1,72$ % ($Me = 54,52$ %), $50,02 \pm 1,30$ % ($Me = 49,12$ %) и $49,78 \pm 1,63$ % ($Me = 50,71$ %) соответственно.

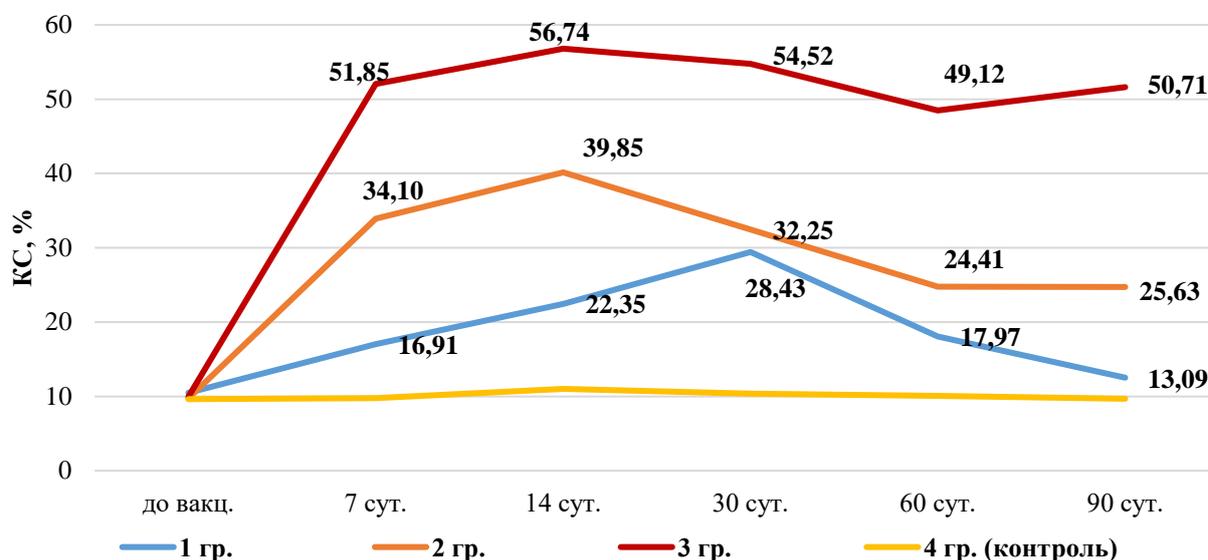


Рисунок 22 – Динамика значений КС $CD3^+CD25^+$ -лимфоцитов у биомоделей из групп сравнения с разной иммунизирующей дозой *Brucella abortus* 19 ВА.

При формировании протективного иммунитета у экспериментальных животных после введения вакцины против бруцеллеза во всех опытных группах наблюдался последовательный рост количества антигенреактивных молекул II класса главного комплекса гистосовместимости. Средние значение коэффициента антигенной стимуляции пула $CD3^+MHC-II^+$ -лимфоцитов в первой группе на седьмые сутки практически не имело разницы с контрольной группой – $Me = 12,82$ % ($13,02 \pm 0,54$ %) и составило $12,02$ % ($12,57 \pm 0,75$ %). Начиная с 14 суток наблюдался рост: КС Me составили $18,01$ % ($17,84 \pm 1,84$ %), на 30 сутки – $39,54$ % ($41,89 \pm 2,41$ %) и на 60 сутки до $44,98$ % ($44,72 \pm 1,58$ %) с дальнейшим понижением к 90 суткам до $34,76$ % ($34,85 \pm 1,31$ %).

Аналогичная тенденция динамики средних значений КС антигенреактивных $CD3^+MHC-II^+$ -клеток (таблица 22) отмечалась в группе №2 белых мышей (1×10^5 ж.м.к.), так на 7 сутки после иммунизации $Me = 14,65$ % ($14,75 \pm 1,02$ %), на 14

сутки – 22,15 % (22,12 ± 1,73 %), 30 сутки – 41,99 % (42,34 ± 1,81 %), 60 сутки – 47,12 % (46,98 ± 1,98 %), 90 сутки – 41,87 % (42,03 ± 2,17 %).

Таблица 22 – Значения КС активированных субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺МНС-II⁺, у экспериментальных биомоделей в группах сравнения

Группы мышей, иммунизированных разными дозами <i>Brucella abortus</i> 19-ВА	Значения КС CD3 ⁺ МНС-II ⁺ -лимфоцитов (%)				
	7 сутки	14 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
№ 1 (1×10 ³ ж.м.к.)	12,57±0,75	17,84±1,84	41,89±2,41	44,72±1,58	34,85±1,31
№ 2 (1×10 ⁵ ж.м.к.)	14,75±1,02	22,12±1,73	42,34±1,81	46,98±1,98	42,03±2,17
№ 3 (1×10 ⁸ ж.м.к.)	20,14±2,45	28,11±3,01	54,1 ±2,58*	50,17±1,05*	41,96±1,63
контроль	13,02±0,54	9,25±0,71	11,56±0,65	9,79±0,69	10,03±0,82

* – значение КС ≥ 50%

В группе №3 экспериментальных животных, вакцинированных дозой *Brucella abortus* 19-ВА (1×10⁸ ж.м.к.), регистрировались пиковые статистически значимые значения экспрессии молекул МНС-II Т-лимфоцитами, стимулированные АБПК – 20,14 ± 2,45 % (*Me* = 18,42 %) на 7 сутки, 28,11 ± 3,01 % (*Me* = 26,24%) на 14 сутки, 54,13 ± 2,58 % (*Me* = 57,04 %) на 30 сутки, 50,17 ± 1,05 % (*Me* = 50,22 %) на 60 сутки и 41,96 ± 1,63 % (*Me* = 42,95 %) на 90 сутки (рисунок 23).

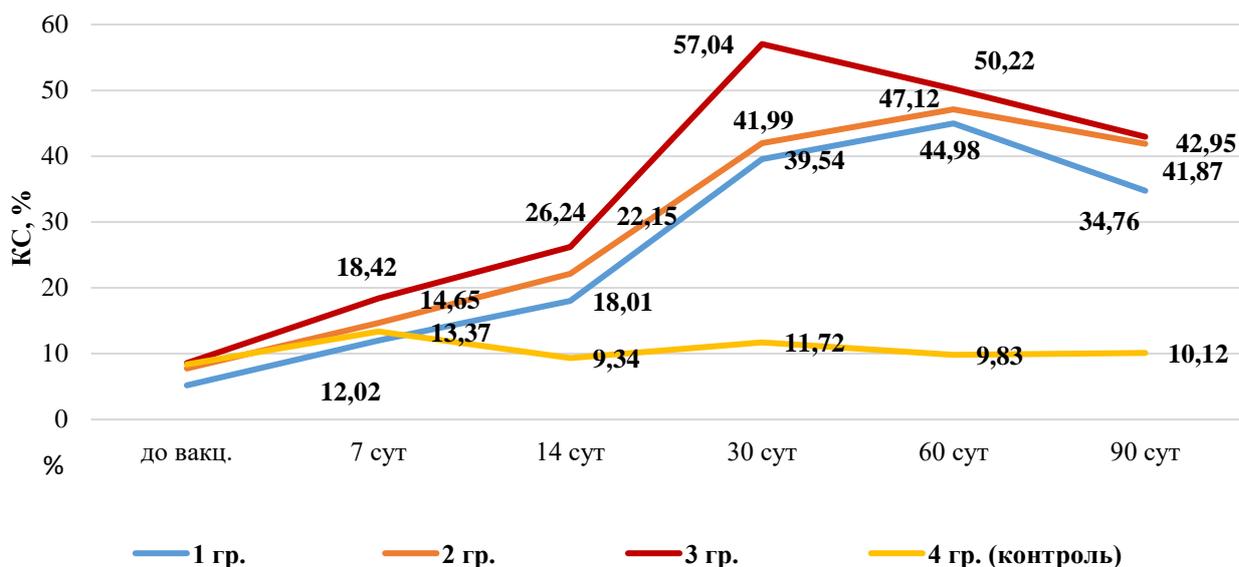


Рисунок 23 – Динамика значений КС CD3⁺МНС-II⁺-лимфоцитов у биомоделей из групп сравнения с разной иммунизирующей дозой *Brucella abortus* 19-ВА.

Таким образом, в группе №3 экспериментальных животных в наибольшей степени выражена динамика *ex vivo* реакции Т-лимфоцитов во все сроки наблюдения.

Корреляционный анализ показал наличие прямой пропорциональной зависимости между повышением КС активированных АБПК *ex vivo* лимфоцитов CD3⁺CD25⁺, CD3⁺МНС-II⁺ и повышением иммунизирующей дозы *Brucella abortus* 19 ВА. При этом, выявлена высокая коррелятивная зависимость динамики интенсивности антигенспецифической *ex vivo* активации CD3⁺CD25⁺: $r = 0,851$ на 7 сутки, $r = 0,812$ на 14 сутки, $r = 0,848$ на 30 сутки, $r = 0,941$ на 60 сутки и на 90 сутки – $r = 0,945$. Между интенсивностью антигенреактивности CD3⁺МНС-II⁺ и количеством вводимых ж.м.к. вакцинного штамма иммунизирующей дозы *Brucella abortus* 19-ВА значения корреляционной связи имели тенденцию к регрессии и на 7 сутки составили $r = 0,931$, на 14 сутки $r = 0,665$, на 30 сутки $r = 0,689$, на 60 сутки $r = 0,421$ и 90 сутки $r = 0,468$.

Перед иммунизацией белых мышей во всех экспериментальных группах не были обнаружены противобруцеллезные антитела. Во все сроки наблюдения после вакцинации средние значения геометрического титра противобруцеллезных антител (\log_2) при анализе сероконверсии имели схожие значения, особенно в

группах №2 и №3. Анализ динамики титров антител выявил пиковые значения к 14 суткам с последующим снижением к 90 суткам (таблица 23).

Таблица 23 – Значения СГТ антител против бруцеллеза, выявленные у иммунизированных *Brucella abortus* 19 ВА мышей в группах сравнения

Иммунизирующая доза <i>Brucella abortus</i> 19-ВА	СГТ противобруцеллезных антител (\log_2)				
	7 сутки	14 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
№ 1 (1×10^3 ж.м.к.)	2,419	4,419	3,618	3,525	3,145
№ 2 (1×10^5 ж.м.к.)	2,418	4,715	3,819	3,730	3,419
№ 3 (1×10^8 ж.м.к.)	2,648	4,725	3,836	3,741	3,420

Корреляционный анализ не показал выраженной зависимости в группах экспериментальных биомоделей связи между значениями титров антител и увеличением иммунизирующей дозы вакцинного штамма. Так, через 7 дней после иммунизации выявлена очень слабая степень корреляции – $r = 0,411$, в остальные сроки наблюдения корреляция не обнаружена: $r = 0,361$ (14 сутки), $r = 0,328$ (30 сутки), $r = 0,308$ (60 сутки) и $r = 0,371$ (90 сутки).

После заражения модельных животных штаммом *Brucella melitensis* 16-М у всех особей контрольной группы (100%) был выявлен бруцеллёз. При этом течение заболевания распределялось следующим образом: у четверти мышей (25%) отмечалась локализованная форма инфекции, у трех четвертей (75%) – генерализованная. ИИ составил 72,98%, а ИИОВО – 0,521 единиц.

У мышей опытной первой группы, результаты бактериологического анализа показали наличие бруцеллезной инфекции у 75% особей. Из них 55% случаев пришлось на регионарную форму болезни и 45% – на генерализованную. Уровень ИИ в этой группе снизился до 31,7%, а ИИОВО составил 0,204 единиц. В ходе исследования было зафиксировано развитие бруцеллезной инфекции у 42% особей, из группы №2 (80% – регионарная инфекция, 20% – генерализованная инфекция), ИИ – 22,74%, ИИОВО – 0,109 единиц. После заражения патогенным штаммом

бруцелл иммунизация мышей дозой *Brucella abortus* 19-ВА (1×10^8 ж.м.к.) обуславливала 100 % защиту животных из группы №3 (таблица 24).

Таблица 24 – Медианные значения КС активированных субпопуляций Т-лимфоцитов $CD3^+CD25^+$, $CD3^+$ МНС-II⁺, СГТ противобруцеллезных антител и показатели инфицированности, выявленные у иммунизированных *Brucella abortus* 19-ВА мышей в группах сравнения через 90 дней

Группы мышей, иммунизированных разными дозами <i>Brucella abortus</i> 19-ВА	СГТ (\log_2)	$CD3^+CD25^+$, %	$CD3^+$ МНС-II ⁺ , %	Процент заразившихся животных	ИИ, %	ИИОВО, ед
Контроль	0	10,01	10,12	100	72,98	0,521
№ 1 (1×10^3 ж.м.к.)	3,145	13,09	34,76	75	31,70	0,204
№ 2 (1×10^5 ж.м.к.)	3,419	25,63	41,87	41,7	22,74	0,109
№ 3 (1×10^8 ж.м.к.)	3,420	50,71	42,95	0	0	0

Опираясь на полученные результаты, корреляционный анализ выявил высокую степень обратно пропорциональной изменчивости между ростом значений КС антигенреактивных $CD3^+CD25^+$ - лимфоцитов и снижения процента инфицированных бруцеллами мышей ($r = -0,972$), индекса инфицированности ($r = -0,841$), интенсивностью обсеменения внутренних органов ($r = -0,781$) и прямую пропорциональную зависимость со значениями СГТ антител ($r = 0,642$) (рисунок 24).

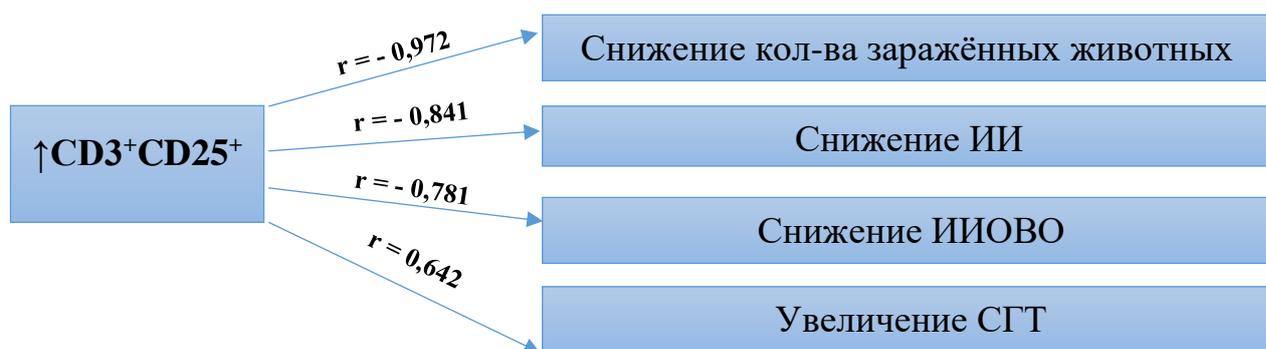


Рисунок 24 – Корреляционный анализ тесноты взаимосвязи роста КС антигенреактивного пула $CD3^+CD25^+$ -лимфоцитов со снижением количества инфицированных животных, ИИ, ИИОВО, увеличением уровня СГТ антител.

Аналогичные данные корреляционного анализа были получены при исследовании зависимости подъема средних значений КС популяции Т-клеток, экспрессирующих рецепторы к МНС-II, и снижения процента зараженных бруцеллами биомоделей ($r = -0,841$), ИИ ($r = -0,971$), интенсивностью обсеменения внутренних органов ($r = -0,979$). Кроме того, установлено отсутствие зависимости со значениями СГТ антител ($r = 0,211$) (рисунок 25).

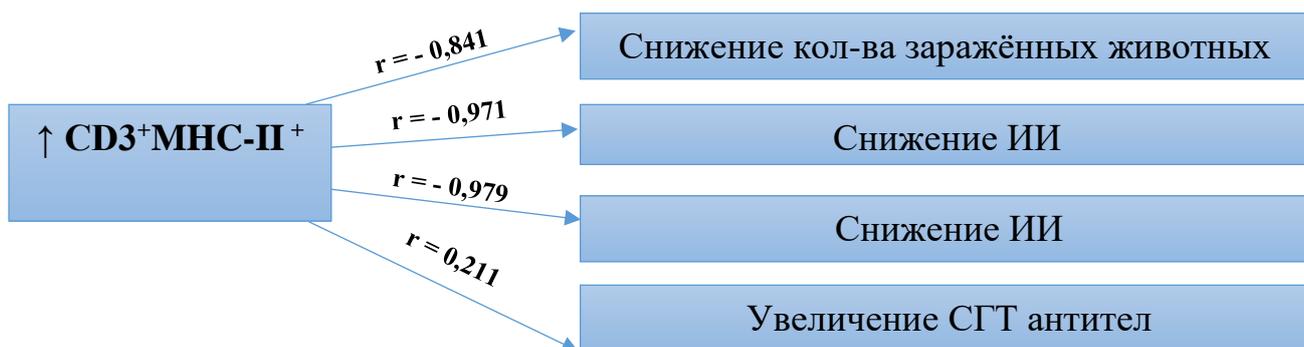


Рисунок 25 – Корреляционный анализ тесноты взаимосвязи роста КС антигенреактивного пула $CD3^+MHC-II^+$ со снижением количества инфицированных животных, ИИ, ИИОВО, увеличением уровня СГТ антител.

Вместе с тем корреляционный анализ выявил тесную обратную зависимость динамики средних значений геометрического титра антител и процента

инфицированных бруцеллами белых мышей ($r = -0,763$), ИИ ($r = -0,928$), ИИОВО ($r = -0,947$) (рисунок 26).

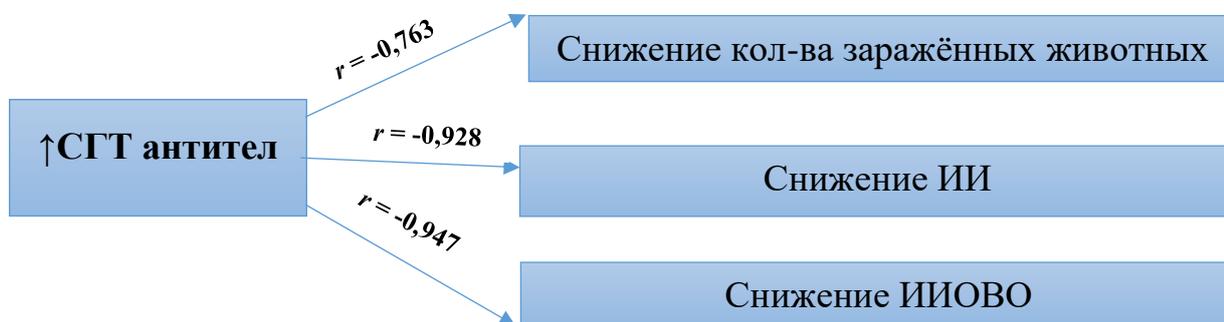


Рисунок 26 – Корреляционный анализ тесноты взаимосвязи роста уровня СГТ противобруцеллезных антител со снижением количества инфицированных животных, ИИ, ИИОВО.

Регрессионный анализ позволил выявить наличие высокой тесноты связи между повышением антигенреактивности Т-лимфоцитов у инфицированных лабораторных животных и исследуемыми показателями протективного иммунитета (количество зараженных мышей, ИИ, ИИОВО). Для популяции клеток $CD3^+CD25^+$ коэффициент детерминации составил $R^2 = 0,941$; $0,712$ и $0,629$ соответственно по каждому из параметров (рисунок 27).

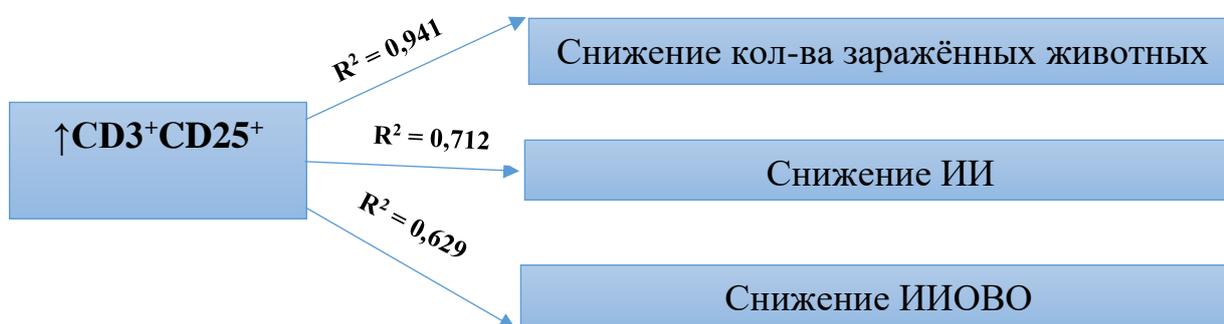


Рисунок 27 – Регрессионный анализ зависимости уровня $CD3^+CD25^+$ с количеством заразившихся бруцеллезом животных, ИИ, ИИОВО.

У субпопуляции $CD3^+MHC-II^+$ эти значения были равны $R^2 = 0,708$; $0,931$ и $0,969$ (рисунок 28).

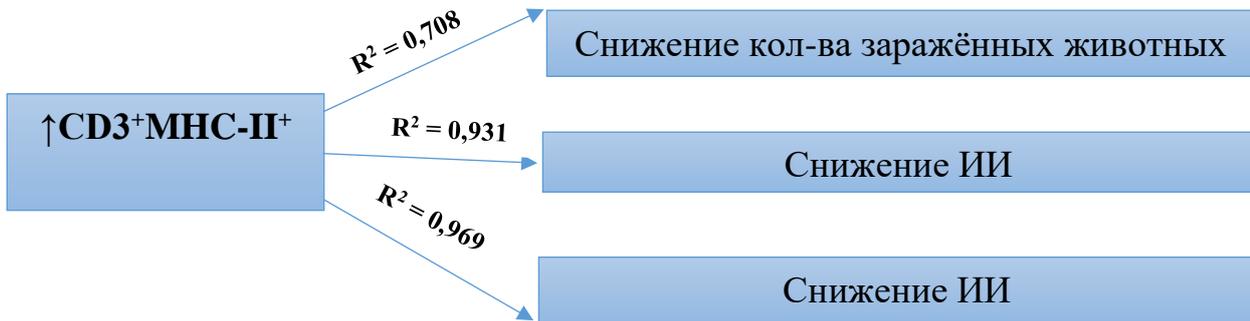


Рисунок 28 – Регрессионный анализ зависимости уровня $CD3^+MHC-II^+$ с количеством заразившихся бруцеллезом животных, ИИ, ИИОВО.

Вместе с тем, анализ показал умеренную степень взаимосвязи между средними величинами геометрического титра противобруцеллезных антител и показателями иммунологической защиты против данных патогенов: на устойчивость животных к заражению – $R^2 = 0,558$, ИИ составила $R^2 = 0,681$, ИИОВО – $R^2 = 0,673$ (рисунок 29).



Рисунок 29– Регрессионный анализ зависимости уровня средних значений геометрического титра противобруцеллезных антител с количеством заразившихся бруцеллезом животных, ИИ, ИИОВО.

Таким образом, проведенные нами исследования указали на сильную прямо пропорциональную зависимость между иммунизирующей дозой *Brucella abortus* 19 ВА и повышением интенсивности экспрессии маркера активации CD3⁺CD25⁺ и отсутствие тесной связи с уровнем СГТ противобруцеллезных антител ($R^2 = 0,342 \div 0,398$.) Статистически значимые самые высокие показатели пролиферативного ответа популяции CD3⁺CD25⁺- лимфоцитов на АБПК наблюдали после иммунизации мышей самой высокой дозой *Brucella abortus* 19-ВА – 10^8 ж.м.к. по сравнению с другими экспериментальными группами во все сроки проведения эксперимента.

Было выявлено, что, если при инфицировании иммунных биомоделей патогенным штаммом *Brucella melitensis* в дозе 1×10^3 ж.м.к. значения КС активированных АБПК *ex vivo* CD3⁺CD25⁺- лимфоцитов равны 50 % и более, обеспечивается 100% противобруцеллезная защита. Показано наличие тесной корреляции относительного количества антигенреактивных Т-клеток и протективных свойств иммунитета, обеспечивающий защиту от заражения белых мышей после вакцинации: $r = - 0,835 \div - 0,968$, $R^2 = 0,703 \div 0,970$.

Кроме того, анализ корреляции уровня СГТ антител и иммунологической защитой против бруцелл выявил слабо выраженную связь данных показателей, а также умеренную степень влияния СГТ на ИИ и ИИОВО после инфицирования *Brucella melitensis* 16-М иммунных к бруцеллезу белых мышей ($R^2 = 0,662 \div 0,683$).

Высокая степень корреляционной связи между динамикой антигенреактивности CD3- клеток и показателями протективного иммунитета указывает на возможность применения, разработанного клеточного антигенспецифического теста, в качестве прогностического критерия при оценке клеточного иммунитета против бруцелл.

3.3.2 Оценка иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза у человека на ранних сроках после иммунизации по показателям антигенреактивности Т-лимфоцитов

Согласно требованиям в соответствии с разделом XIII. «Профилактика бруцеллёза» СанПиН 3.3686-21 [76], контроль эффективности иммунизации («фактической привитости») необходимо проводить не позднее 30 дней после вакцинации, т.е. перед допуском к работам, связанным с рисками инфицирования возбудителем бруцеллеза. Вместе с тем, актуальным направлением является разработка методов, позволяющих оценивать эффективность вакцинации на более ранних сроках.

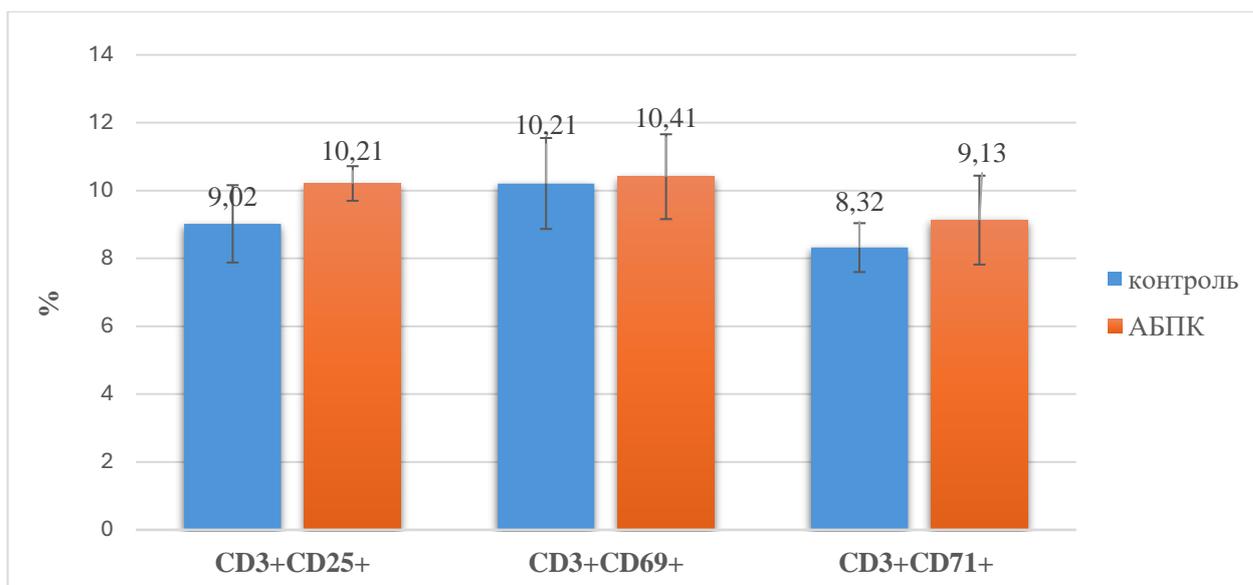
На основании экспериментальных данных, подтверждающих целесообразность использования разработанного клеточного антигенспецифического теста для оценки протективного иммунитета против бруцелл, в последующем исследовании нами была проведена оценка иммунологической эффективности вакцинации против бруцеллеза по эпидемиологическим показаниям с использованием штамма *Brucella abortus* 19 ВА в ранние периоды после иммунизации.

В исследовании приняли участие 62 добровольца, не имеющих специфического иммунитета к возбудителю бруцеллеза. Для оценки динамики клеточного иммунного ответа до и после вакцинации использовали метод проточной цитометрии в модификации клеточного антигенспецифического теста. Забор материала осуществлялся дважды: до иммунизации и через 14 дней после введения вакцины. Исследовали уровень фоновой и антиген-индуцированной экспрессии маркеров активации – CD25, CD69 и CD71 – как на общей популяции CD3⁺ лимфоцитов, так и на субпопуляции CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов.

На этапе исходного обследования, до иммунизации, активация периферических Т-лимфоцитов специфическими антигенами бруцелл (АБПК) не выявила статистически значимого отличия в относительном содержании

активированных Т-клеточных субпопуляций по сравнению с фоновыми значениями.

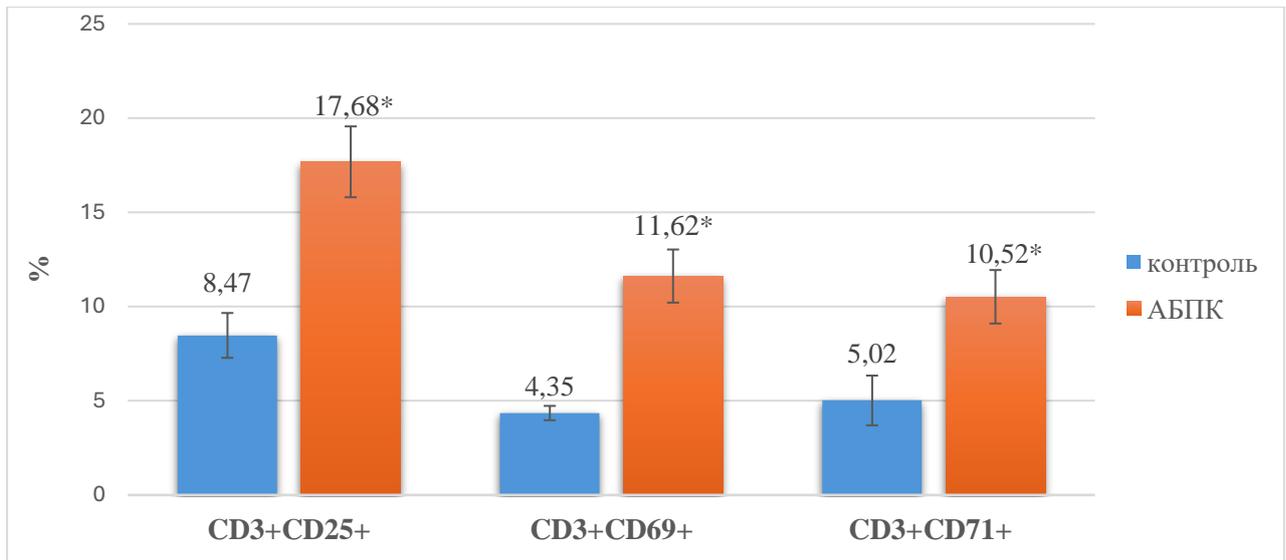
Фоновые значения пролиферативного ответа популяции Т-лимфоцитов перед вакцинацией составили в среднем: $CD3^+CD25^+$ – $9,02 \pm 1,14$ %, $CD3^+CD69^+$ – $10,21 \pm 1,34$ % и $CD3^+CD71^+$ – $8,32 \pm 0,72$ %, после активации АБПК: $10,21 \pm 0,51$ %, $10,41 \pm 1,25$ % и $9,13 \pm 1,31$ %, соответственно (рисунок 30).



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

Рисунок 30 – Анализ интенсивности фоновой и антигенной активации *in vitro* субпопуляций Т-лимфоцитов $CD3^+CD25^+$, $CD3^+CD69^+$, $CD3^+CD71^+$ в крови доноров перед иммунизацией.

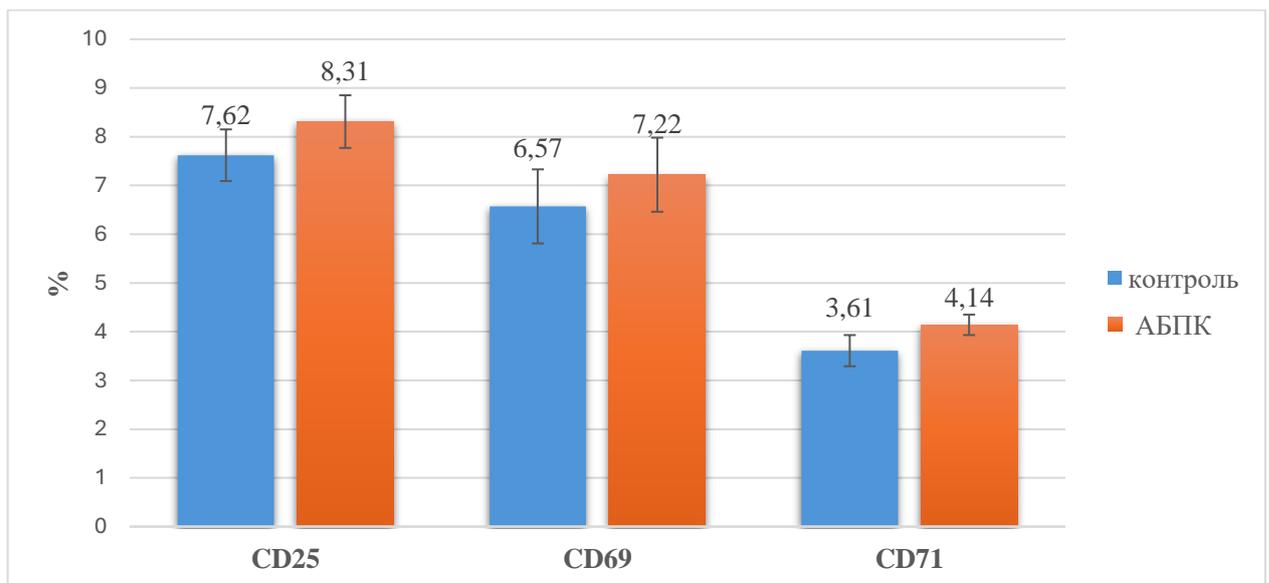
Через 14 дней после вакцинации людей показатели пролиферативного ответа популяции Т-лимфоцитов на АБПК *in vitro* увеличивались более, чем в два раза: $CD25$ – $17,68 \pm 1,88$ % ($p \leq 0,02$) по сравнению с контрольными значениями ($8,47 \pm 1,19$ %), $CD69$ – $11,62 \pm 1,41$ % ($p \leq 0,02$) (контроль – $4,35 \pm 0,38$ %) и $CD71$ – $10,52 \pm 1,42$ % ($p \leq 0,001$) (контроль – $5,02 \pm 1,32$ %), соответственно (рисунок 31).



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

Рисунок 31– Анализ интенсивности фоновой и антигенной активации *in vitro* субпопуляций Т-лимфоцитов CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺ в крови доноров на 14 сутки после иммунизации.

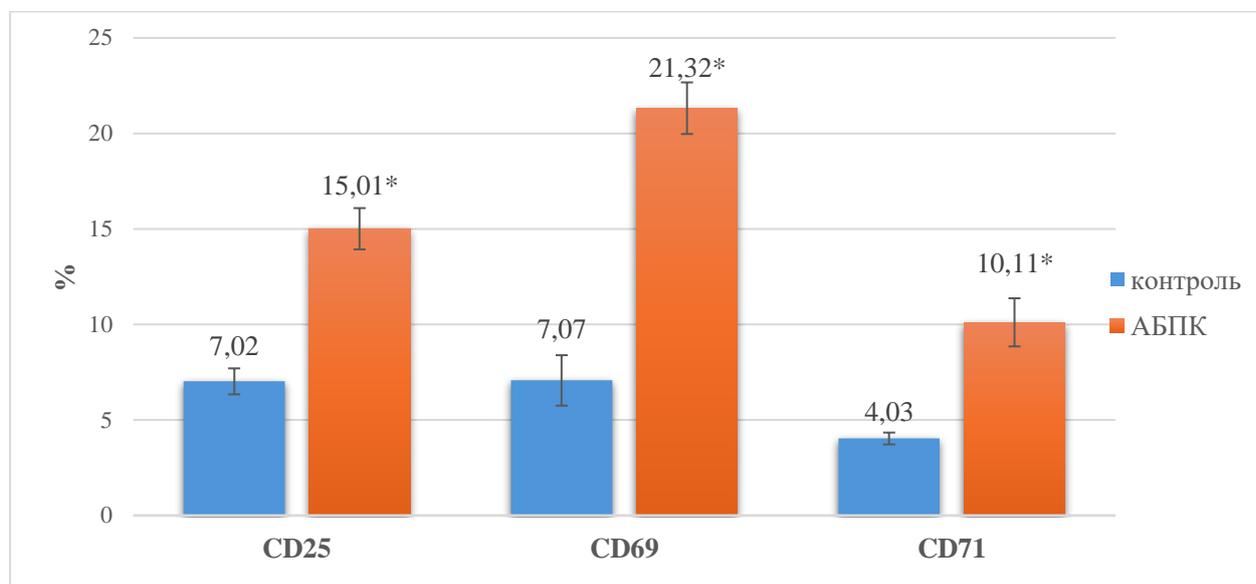
Перед вакцинацией доноров фоновые значения количества CD25 позитивных Т-хелперов в среднем составило $7,62 \pm 0,53$ %, при специфической активации лимфоцитов АБПК составило $8,31 \pm 0,54$ %; CD69 – $6,57 \pm 0,76$ % и $7,22 \pm 0,76$ %, CD71 – $3,61 \pm 0,32$ % и $4,14 \pm 0,21$ %, соответственно (рисунок 32).



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

Рисунок 32 – Процентное содержание CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD69⁺, CD3⁺CD4⁺CD71⁺-лимфоцитов цельной крови перед вакцинацией.

Аналогичное увеличение экспрессии антигенреактивных $CD3^+CD4^+CD25^+$, $CD3^+CD4^+CD69^+$, $CD3^+CD4^+CD71^+$ отмечалась и на поверхности Т-хелперов на 14 сутки после вакцинации (рисунок 33).



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

Рисунок 33 – Процентное содержание $CD3^+CD4^+CD25^+$, $CD3^+CD4^+CD69^+$, $CD3^+CD4^+CD71^+$ -лимфоцитов цельной крови на 14 сутки после иммунизации.

Были получены следующие данные: CD25 – $15,01 \pm 1,08$ % ($p \leq 0,001$) (контроль – $7,02 \pm 0,68$ %), CD69 – $21,32 \pm 1,35$ % ($p \leq 0,01$) (контроль – $7,07 \pm 1,32$ %), CD71 – $10,11 \pm 1,26$ % ($p \leq 0,001$) ($4,03 \pm 0,31$ %).

Значения коэффициента антигенной стимуляции, представленные в таблице 25, перед вакцинацией $CD3^+$ -лимфоцитов, экспрессирующих $CD25^+$ составило $11,66 \pm 1,92$ % ($Me = 10,85$ %), $CD3^+CD69^+$ – $1,92 \pm 0,84$ % ($Me = 1,87$ %), $CD3^+CD71^+$ – $8,87 \pm 1,76$ % ($Me = 8,24\%$). На 14 сутки после иммунизации доноров средние значение КС пула $CD3^+CD25^+$ составило $52,95 \pm 1,38$ % ($Me = 51,82$ %), $CD3^+CD69^+$ – $66,78 \pm 1,97$ % ($Me = 65,74$ %), $CD3^+CD71^+$ – $59,93 \pm 1,82$ % ($Me = 59,66$ %).

Таблица 25 – Показатели коэффициента стимуляции Т-лимфоцитов и Т-хелперов по данным КАСТ-теста до 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	52,95±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 $p \leq 0,05$

У обследуемых доноров на момент до вакцинации зарегистрированы следующие значения коэффициента стимуляции: для субпопуляции CD3⁺CD4⁺CD25⁺ показатель КС составил $8,30 \pm 1,73$ % ($Me = 8,21$ %), CD3⁺CD4⁺CD69⁺ – $9,00 \pm 1,23$ % ($Me = 8,92$ %), CD3⁺CD4⁺CD71⁺ – $12,80 \pm 1,72$ % ($Me = 12,02$ %). Анализ медианы значений КС антигенреактивных CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов выявил подъем значений на 14 суток: CD3⁺CD4⁺CD25⁺ – $53,18 \pm 1,32$ % ($Me = 52,12$ %), CD3⁺CD4⁺CD69⁺ – $66,78 \pm 2,03$ % ($Me = 65,74$ %), CD3⁺CD4⁺CD71⁺ – $60,09 \pm 1,72$ % ($Me = 61,02$ %) (рисунок 34).

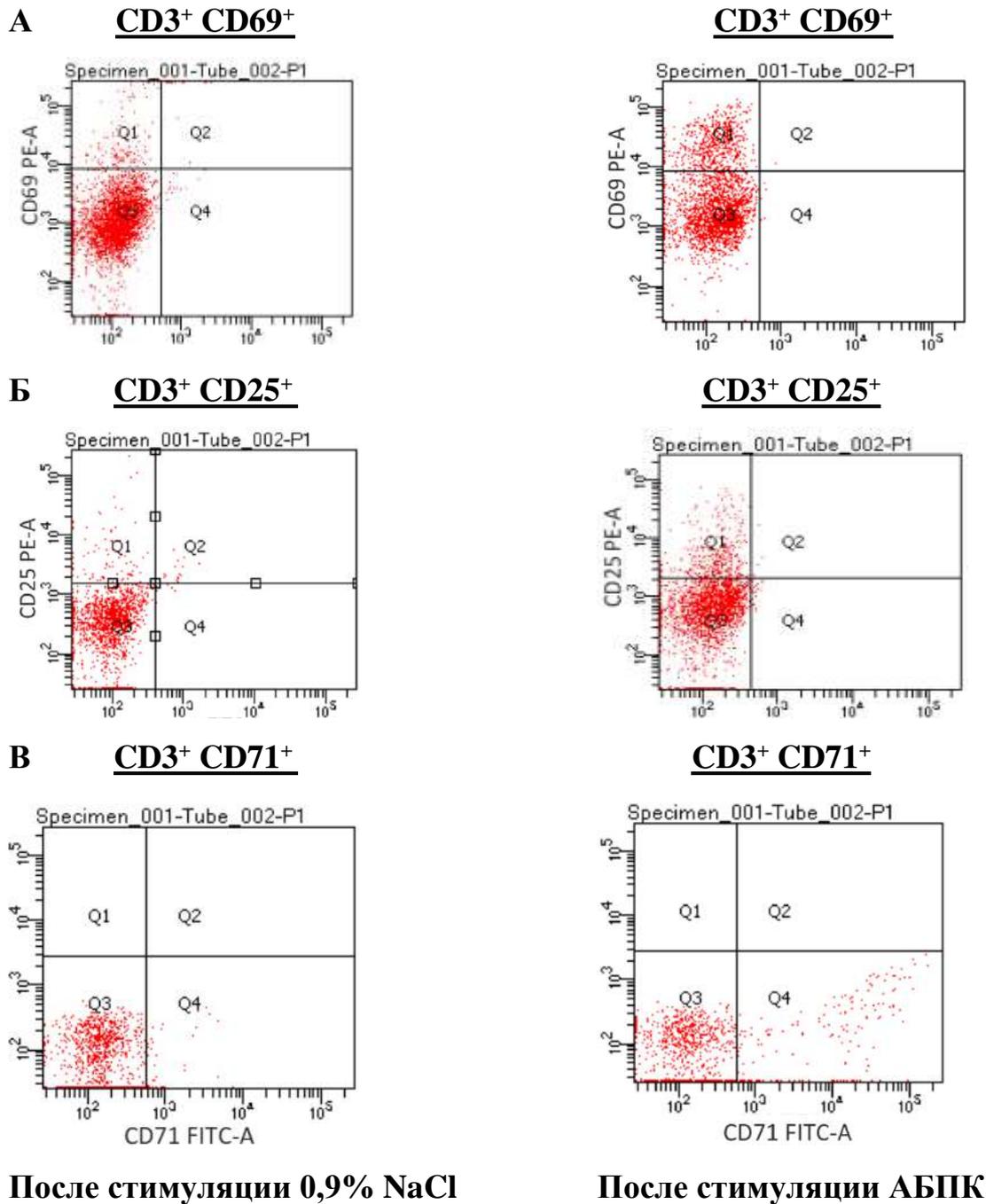


Рисунок 34 – Пример цитофлюорограм, отражающих учет процентного содержания CD3⁺ CD69⁺ (А), CD3⁺ CD25⁺ (Б), CD3⁺ CD71⁺ (В) – лимфоцитов цельной крови на 14 сутки после иммунизации людей.

Таким образом, был апробирован методический подход, основанный на *ex vivo*-анализе антигениндуцированной активации Т-лимфоцитов, для оценки иммунологической эффективности вакцинации людей по эпидемическим

показаниям живой вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19-ВА в ранние сроки после иммунизации (начиная с 14-х суток).

На основании анализа данных, представленных в главе 5 (раздел 5.1), установлено, что пороговое значение коэффициента стимуляции на уровне 50% и выше, определяемое по уровню антиген-стимулированной экспрессии рецепторов активации CD25, CD69 и CD71 в *ex vivo* условиях, является маркером развития специфического адаптивного Т-клеточного иммунитета у вакцинированных лиц. Полученные данные подтверждают высокую диагностическую эффективность клеточного антигенспецифического теста в оценке протективного иммунного ответа после введения вакцины против бруцеллеза.

Проведенные исследования могут служить фундаментом для дальнейших исследований по разработке персонализированного подхода для контроля формирования адекватного иммунного ответа на специфическую профилактику, выявления поствакцинальной иммунологической дисфункции Т-лимфоцитов (CD4⁺, CD8⁺ клеток). Кроме этого, крайне важным является вопрос комплексного обследования лиц из группы профессионального риска перед ревакцинацией, т.к. безопасность и эффективность специфической профилактики в полной мере зависит от правильности определения наличия медицинских противопоказаний к иммунизации, особенно на энзоотичной по бруцеллезу территории.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В мире бруцеллез продолжает оставаться глобальной, трудно решаемой проблемой общественного здравоохранения и животноводства. В последние два десятилетия отмечается ухудшение эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бруцеллезу, в том числе в странах относительно благополучных по этой инфекции (страны Восточной и Западной Европы, Америки, Юго-Восточной Азии). По мнению исследователей, повышение числа зарегистрированных случаев бруцеллеза, в т.ч. на территориях регионов мира «условно благополучных» по этой инфекции, может быть обусловлено улучшением качества лабораторной диагностики, внедрением в деятельность лабораторий современных диагностически более информативных методов исследования [62, 72, 207]. Патогенез бруцеллеза крайне сложный. После проникновения возбудителя в макроорганизм он адаптируется и моделирует иммунный ответ хозяина с целью создания условий для сохранения и персистенции. Особенности патогенеза острого, хронического и резидуального бруцеллеза обуславливают наличие очень широкого спектра неспецифических клинических проявлений, начиная от длительной лихорадки, астении, боли в суставах и мышцах, до более клинически тяжелых проявлений (осложнений), таких как эндокардит (2 %), нейробруцеллез (05-25 %), гепатоспленомегалия (до 50 %), органические поражения в тканях мочеполовой системы (2-20 %) и костно-суставного аппарата (2-77 %), анемия (особенно часто у детей – до 20-55 %). Лабораторная диагностика бруцеллеза в обязательном порядке должна быть комплексной с использованием различных иммунологических, молекулярно-генетических и бактериологических методов. При этом, специалисты на практике достаточно часто сталкиваются с проблемами верификации диагноза «бруцеллез» и его формы течения из-за неспецифической природы симптомов и сложности интерпретации результатов тестирования [190, 249, 250].

Начиная с конца 70-х годов XX столетия и по настоящее время в мире наиболее активно внедрялись в практику здравоохранения новые аналитические

технологии, позволяющие проводить иммунологическую молекулярную диагностику инфекционных заболеваний и сопутствующих им состояний, получать новые знания об этиологии и патогенезе системных инфекций. К одной из передовых инструментальных диагностических технологий можно отнести проточную цитофлуориметрию, алгоритмы использования которой, в последние десятилетия активно внедряются для лабораторной диагностики инфекций [85, 217, 225, 226, 282].

При изучении инфекций, в иммунопатогенезе которых ключевая функция отводится клеточным факторам иммунитета, особый интерес заслуживает анализ субпопуляций антиген-активированных Т-клеток эффекторов. Т-лимфоциты подразделяются на функциональные популяции Th1-, Th2-типы и представляет собой достаточно стабильный пул, продуцирующий иммунорегуляторные факторы, обеспечивающие баланс или поляризацию гуморального и клеточного иммунного ответа. [86, 209]. В соответствии с современными данными известно, что иммунный ответ в отношении длительно персистирующих внутриклеточных патогенов преимущественно обусловлен иммунорегуляторными цитокинами и лимфоцитами Th1-типа, опосредующими специфическую активность клеточного иммунитета. Th2- лимфоциты, участвуют в регуляции гуморального иммунитета и антителогенеза [123]. В последние годы исследователями получено много новых сведений о популяциях Th1, Th2 клеток. Установлена их высокая функциональная пластичность и иммунофенотипическое разнообразие, участие в обеспечении протективных свойств в смешанном (сбалансированном) иммунном ответе Th1/Th2 [254]. Вместе с тем известны основные принципы концепции «Th1/Th2», основу которой составляет модель, предполагающая участие в реакции иммунной защиты Т-хелперов и Т-цитотоксических регулируемых Th1-медиаторами и других иммунокомпетентных клеток в иммунном ответе с активацией цитотоксических эффекторных механизмов в отношении внутриклеточных патогенов (поляризация в сторону клеточного иммунитета), активация профессиональных макрофагов (закисление лизосом, активация активных форм кислорода) [122, 230, 212].

С учетом вышеуказанного принципа, на основании оценки антигенреактивности популяций Т-клеток можно судить не только о наличии и объеме пулов праймированных $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ и, соответственно, интенсивности их активации, а также в целом анализировать состояние эффекторных механизмов в отношении внутриклеточных патогенов и, вероятно, о наличии протективных свойств адаптивного клеточного иммунитета после вакцинации или перенесённой инфекции.

Особый научный интерес и практическое значение представляют исследования по изучению состояния антигенной активности Т-клеток и динамики количества клеточного пула праймированных CD3-лимфоцитов при бруцеллезной инфекции. В иммунопатогенезе бруцеллеза иммунореактивное состояние популяций Т-клеток играет ключевую роль как индуцированных факторами патогенности бруцелл механизмов формирования Т-клеточной анергии, которые являются основной причиной хронизации инфекции, так и как ведущий фактор при формировании адаптивного иммунитета против бруцелл, биологический цикл которых предполагает внутриклеточную локализацию и персистенцию. Кроме того, исследование антигенреактивности Т-лимфоцитов позволит изучить особенности экспрессии маркеров активации клеток и апоптоза, а также рецепторов иммунорегуляторных медиаторов, что отражает состояние и направленность иммунновоспалительных реакций в организме хозяина при бруцеллезной инфекции.

На первом этапе наших исследований была изучена возможность и перспектива оценки интенсивности антигениндуцированной активации Т-лимфоцитов *ex vivo* у лиц, иммунных к возбудителю бруцеллеза. Обследовали 36 человек больных бруцеллезом («острая форма бруцеллеза»). Для оценки уровня ответа Т-лимфоцитов на антиген анализировали интенсивность индуцированной экспрессии рецептора IL-2Ra (CD25), HLA-DR, маркера индукции апоптоза и его лиганда – CD 95 и CD 95L (CD178). Анализ значения экспрессии CD3 клетками всех исследуемых маркеров клеточного активационного состояния показал, что у 97,2 % (35 чел.) 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 %. Вместе с тем, анализ *in vitro* антиген-стимулированной экспрессии активированных CD3⁺CD25⁺ выявил наиболее высокие значения. Также, относительно высокие значения (86,1 %, 31 человек) антигензависимой активации наблюдались по показателю экспрессии FasL (CD178), принадлежащего семейству фактора некроза опухоли (TNF), который наиболее активно транслируется активированными цитотоксическими Т-клетками, что отражает, так называемую негативную активацию, при которой активированные клетки могут массово подвергаться индуцированному апоптозу (в условиях *in vivo*). В качестве антигена был использован коммерческий аллерген бруцеллезный жидкий «Бруцеллин» (НПО «Микроген»). Проведенные исследования указывают на реальную возможность и очевидную перспективу применения анализа антигензависимой активации Т-клеток в условиях *ex vivo* для оценки Т-клеточной иммунопревалентности, что можно использовать для выявления (и/или верификации) у человека острой бруцеллезной инфекции.

Поскольку в Российской Федерации отсутствует коммерчески доступный бруцеллезный антиген, пригодный для использования в клеточных антиген-специфических тестах *in vitro*, наши дальнейшие исследования были направлены на поиск и изучение эффективного активирующего антигенного препарата (или «комплексного антигена»), который бы обеспечивал оптимальный уровень сигнализации Т-клеточного рецептора (TCR) в *ex vivo* условиях с минимальным перекрестным эффектом или, в идеале, его полным отсутствием. Применение бруцеллина в качестве стимулирующего агента в клеточном антиген-специфическом тесте не обеспечивает полноты оценки функциональной активности Т-клеточного иммунитета, направленного против возбудителя бруцеллеза. Так, экспериментальные исследования с использованием биомоделей указали на недостаточную специфическую активность бруцеллина в отношении активации Т-лимфоцитов. При исследовании маркеров активации лимфоцитов после иммунизации белых мышей *Brucella abortus* 19 ВА на 7, 14, 21 и 30 сутки

наблюдения с использованием в качестве стимулятора *in vitro* бруцеллина не было установлено статистически значимого повышения уровня лимфоцитов экспрессирующих CD69⁺, CD25⁺, CD95⁺ и МНС-II во все сроки наблюдения. Вероятно, это связано с тем, что препарат (бруцеллин) представляет собой белковый комплекс продуктов жизнедеятельности бруцелл с низким содержанием антигенных пептидов с активными центрами и/или эпитопов (антигенсвязывающих субъединиц), связывающихся с TCR.

Особенностью ответа Т-клеток в условиях *in vitro* является их способность «качественно» и «количественно» реагировать на антигенные лиганды, оставаясь при этом инертными к аутоантигенам тканей хозяина. При этом необходимо учитывать, что связывание TCR с антигеном преобразуется в биохимический процесс, который сопровождается глобальными клеточными изменениями в Т-клетке. В условиях *in vitro*, преимущественно, наблюдается активация регуляторов транскрипции и синтез белка – экспрессия молекул активации, продукция цитокинов и других медиаторов. В случае, когда антигенный стимул слабый, в т.ч. из-за недостаточной концентрации и сшивки антигенных лигандов, соответственно сигнализация TCR не происходит или она слабо выражена. При этом, высокие концентрации индуцирующих компонентов, напротив, могут вызвать реорганизацию цитоскелета Т-клетки и других лейкоцитов, изменение метаболизма, повреждение, апоптоз и гибель клеток. Также, высокие концентрации антигенов в смешанной культуре лейкоцитов могут вызывать неспецифическую реакцию, в том числе за счет избыточной и неспецифической активации клеточным детритом, образовавшимся в результате лейкоцитоллиза, в том числе и специфического.

Известно, что для эффективной сигнализации TCR в условиях *in vitro* предпочтительнее использовать коктейль антигенов, что может обеспечить возбуждение одновременно нескольких сигнальных путей. Также, учитывая сложную структуру TCR и особенности активации (запуск TCR с цитоплазматическими юкстамембранными областями CD3 $\zeta\zeta$ [204], которая обеспечивает антигенный ответ только зрелых Т-клеток (в норме) [282],

преимущество будут иметь везикулы/пептиды внешней мембраны – OMP, OMV и другие PAMPs бруцелл, а также олигопептиды ABC-transporter periplasmic и комплексы эффекторных белков системы секреции IV типа, других факторов патогенности, которые будут обладать комплементарностью с бруцелла-специфическими TCR.

В ходе исследований было отобрано три серии АБПК, выделенных из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 VA, из которых был определен антигенный комплекс с наиболее гетерогенным составом, включающий в состав белки наружной мембраны OMP с молекулярными массами от 10,89 до 112,52 кДа (преимущественно 25-33 кДа). Известно, что указанные OMP, относятся к иммуногенным белкам бруцелл, инициируют *in vitro* выраженную пролиферацию Т-клеток (CD4⁺, CD8⁺) и индукцию синтеза IFN-гамма, IL2, IL6 и др. [206, 292]. Технология получения антигенного препарата не имеет аналогов (патент RU 2708561 «Способ получения бруцеллезного антигена для клеточных тестов *in vitro*»).

В процессе выполнения исследования были установлены и стандартизированы оптимальные параметры проведения *in vitro* стимуляции Т-лимфоцитов специфическими антигенами бруцелл. Концентрация антигенного комплекса (АБПК) в реакционной смеси составляла 5 мг/мл (по содержанию белка), что обеспечило максимальную чувствительность и воспроизводимость регистрации антигенреактивности клеток. При использовании полученного АБПК и оптимизированной методики доля пула лимфоцитов, экспрессирующих активационные молекулы при стимуляции составила в среднем CD3⁺CD69⁺ 25,20±2,65% (КC_{mean} – 57,46 %), CD3⁺CD25⁺ 8,32±1,00 % (КC_{mean} – 72,12 %), CD3⁺CD95⁺ 17,14±1,95 % (КC_{mean} – 48,42 %) и CD3⁺МНС-II⁺ 18,99±4,08% (КC_{mean} – 35,70 %) у биомоделей, иммунных к бруцеллам. Проведенные исследования позволили установить оптимальную концентрацию АБПК в реакционной смеси, которая обеспечивает достаточную чувствительность TCR и инициацию специфической сигнализации Т-лимфоцитов с экспрессией различных маркерных молекул, что позволяет унифицировать учет реакции и осуществлять

мультиплексную оценку клеточного антигенспецифического теста в одной постановке.

Для оценки лабораторно-клинической ценности клеточного антигенспецифического теста были проведены исследования по изучению его диагностической точности на основе критериев диагностической специфичности и чувствительности. Опираясь на полученные данные, предложенный методический подход клеточных антигенспецифических тестов 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, на 30-е сутки после вакцинации у всех участников исследования (100 % случаев) был зарегистрирован положительный результат клеточного антигенспецифического теста, что указывает на развитие специфической Т-клеточной реактивности к антигенам бруцелл.

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 Т-клеток 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 %.

На следующем этапе исследований нами были изучены особенности проявления специфической антиген-зависимой Т-клеточной реактивности при развитии бруцеллезной инфекции, так как результаты таких исследований отсутствуют в современной доступной научной литературе. Для оценки иммунореактивного состояния Т-клеток изучали спонтанную (фоновую) и антиген-индуцированную экспрессию рецепторов активации CD25, CD69, CD71 и апоптоза

CD95 субпопуляциями Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻ - Т-хелперами, CD3⁺CD8⁺ - Т-цитотоксическими). В качестве биомоделей использовали белых мышей, инфицированных *Brucella melitensis* 16М. Животных обследовали до заражения и через 7, 14, 21 и 30 суток после инфицирования. В ходе экспериментальных исследований было показано, что специфическая активация и выраженная антигенреактивность CD3 популяций отмечалась преимущественно на 14 сутки после инфицирования, что отражает общие закономерности острого инфекционного бруцеллезного процесса [139, 250].

Обращает на себя внимание поляризация Т-клеточного иммунного ответа в сторону усиления цитотоксической реакции лимфоцитов в ответ на *ex vivo* активацию в более отдаленные сроки после инфицирования (21 и 30 сутки), что связано с формированием активного цитотоксического иммунного ответа (и пула антигенреактивных TCL) на внутриклеточную инфекцию. Сохранение выраженной антигенреактивности Т-клеток отражает развитие острой бактериальной инфекции с генерализацией. Некоторое снижение антигенной активации CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов можно связать с ослаблением иммунореактивности на фоне интенсивной диссеминации возбудителя, что является отражением иммуносупрессивного действия бруцелл на организм хозяина, что влечет за собой ингибирование ведущего звена иммунологической защиты от бруцеллезной инфекции. Учитывая, что цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺) относят к потенциально основным эффекторам, выполняющим ведущие функции иммунологического контроля бруцеллеза при формировании нестерильного, а позже и стерильного инфекционного иммунитета, разработанный методический подход (с АБПК) позволит оценить функциональное состояние CTL в отношении к возбудителю бруцеллеза.

Основу патогенеза бруцеллеза у человека и животных составляет системный инфекционно-аллергический процесс, характеризующийся стадийностью и резидуально-органическими поражениями. Патогенетически инфекционный процесс при бруцеллезе ассоциирован с бактериемией, формированием первичных и вторичных метастатических септических полиорганных очагов. По мере развития

инфекции в организме хозяина активно формируются аутологичные иммунопатологические реакции, обусловленные прогрессирующей специфической сенсibilизацией и иммуносупрессией, приводящей к созданию условий для длительной персистенции бруцелл в макроорганизме [63].

Факторы врожденного иммунитета организма хозяина не обеспечивают полной санации от возбудителя бруцеллеза и являются причиной персистенции бруцелл в организме хозяина [161].

С иммунологических позиций, особенно опасным может быть ре- и суперинфицирование бруцеллами людей на фоне напряженного морбидного состояния, которое может быть обусловлено бактериемией (интоксикацией), иммуносупрессией, системным воспалением, усилением состояния гиперчувствительности и/или аутоиммунной патологией. В этом случае бруцеллез будет протекать наиболее тяжело с высоким риском хронизации инфекции и инвалидизации больных.

По современным данным известно, что иммунитет при бруцеллезе достаточно относительный и по некоторым оценкам до 8-12 % переболевших бруцеллезом могут заболеть бруцеллезом повторного после инфицирования [11]. У людей, находящихся в эпизоотическом очаге и тесном контакте с больными бруцеллезом животными (обслуживание, кормление и доение животных, уборка стойла и др.), имеется постоянный риск повторного инфицирования бруцеллами, что может обусловить тяжелое клиническое течение инфекции и формирование стойких последствий болезни. Кроме того, эпидемиологические риски повторного инфицирования возникают при так называемых «молочных» вспышках, особенно среди детей, когда в пищу неоднократно употребляются контаминированные бруцеллами молоко и кисломолочные продукты (творог, сыр и др.), концентрация бруцелл в которых, как правило, очень высока.

Учитывая определяющую роль Th-1 иммунного ответа в иммунологической защите от бруцелл, представляется крайне актуальным анализ специфической активации Т-лимфоцитов *in vitro* при остром бруцеллезе в условиях повторного инфицирования. Результаты подобных исследований в отечественной и

зарубежной научной литературе отсутствуют. На фоне формирования нестерильного иммунитета через три недели после первичного инфицирования бруцеллами статистически значимо увеличивается доля популяции CD3-лимфоцитов, активно отвечающих на антигенное воздействие в условиях *ex vivo* (Me КС CD3⁺CD25⁺ – 73,7 %, CD3⁺CD69⁺ – 30,1 %, CD3⁺МНС-II⁺ – 47,5 %).

В ходе экспериментальных исследований по моделированию повторного заражения биомоделей возбудителем бруцеллеза было установлено, что при реинфицировании на фоне острого процесса наблюдается формирование выраженного вторичного Т-клеточного ответа: несмотря на сохраняющуюся системную воспалительную реакцию, Т-лимфоциты демонстрируют высокую функциональную готовность к специфической стимуляции, что проявляется в устойчивом росте коэффициентов стимуляции по ключевым маркерам — CD25⁺ (до 59,8 %), CD69⁺ (до 70,0 %) и МНС-II⁺ (до 76,9 %). Это свидетельствует о сохранении и даже усилении антиген-презентирующей и эффекторной функции иммунной системы при повторном контакте с возбудителем. Полученные данные создают основу для разработки иммунологического алгоритма дифференциации рецидива и повторного заражения, имеющего важное значение для эпидемиологического надзора и оценки устойчивости эпизоотических очагов.

Известно, что для бруцеллеза у людей характерно достаточно длительное и рецидивирующее течение с формированием мультисистемной воспалительной реакции. В связи с формированием фагоцитарной дисфункции (незавершенность фагоцитоза) возбудитель длительно циркулирует внутри макрофагов, что инициирует медленное развитие ответной иммунной реакции. На фоне иммунорегуляторного дисбаланса Th1- и Th2 – комплексных иммунных ответов формируются условия для бактериемии и образования метастатических очагов бактерий (локализованные инфильтраты) в органах [248]. На фоне септического бруцеллезного процесса в организме формируется прогрессирующее системное воспаление, при котором, с одной стороны индуктором, а с другой – лимитирующим фактором является состояние иммунитета, в том числе адаптивного [190]. При развитии острой бруцеллезной инфекции нами проведены

исследования по изучению особенности корреляции цитологических показателей, характеризующих и ассоциированных с иммуновоспалительными процессами (МПО, лизосомальные КБ, КФ и СДГ, интенсивность «метаболического взрыва» (НСТ-тест), лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), прокальцитонина (ПКТ), концентрации цитокинов (TNF, IL-6 и IL-10) и интенсивности состояния антигенреактивности Т-лимфоцитов *ex vivo* (по коэффициентам антигенной стимуляции пулов клеток CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD69⁺, CD3⁺CD71⁺, CD3⁺CD95⁺). Анализ статистической зависимости между изучаемыми переменными выявил высокую степень корреляционной связи между ростом экспрессии CD25 рецептора и выраженности лейкоцитоза, уровня эндогенной интоксикации и остроты воспаления (по результатам исследования ЛИИ). Также, исследования показали высокую обратно-пропорциональную связь повышения антигениндуцированной экспрессии Т-лимфоцитами рецептора к IL-2 и снижения активности СДГ и НСТ-теста фагоцитов, что свидетельствует об ослаблении окислительного потенциала лейкоцитов, отражая снижение уровня интоксикации и интенсивности воспаления. В исследовании корреляции динамики пула антигенреактивных CD3⁺CD69⁺ с показателями воспалительных реакций отмечена ассоциативная выраженная прямая связь с увеличением антигениндуцированной активации CD3⁺CD69⁺ лимфоцитов с повышением концентрации провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли и маркера системного воспаления – прокальцитонина. При этом, также отмечено, что динамика числа Т-клеток, экспрессирующих рецепторы ранней пролиферации, обратно пропорционально коррелировали с уровнем IL-6 и IL-10, что, очевидно, связано с ингибирующими свойствами цитокинов и поляризацией иммунного ответа в сторону активного антителогенеза (Th2-иммунного ответа). Важным аспектом клеточного иммунного ответа при бруцеллезе является взаимодействие провоспалительных и противовоспалительных механизмов, включая коиндукцию IL-10 и противовоспалительное действие IL-6, направленное на модуляцию макрофагальной активности. Установлено, что повышение доли CD3⁺CD69⁺ Т-лимфоцитов коррелирует с увеличением функциональной активности фагоцитов,

проявляющейся в усиленном образовании активных форм кислорода. Вместе с тем, наблюдается снижение активности миелопероксидазы, что может быть связано с иммуносупрессивным влиянием факторов патогенности бруцелл.

Изучение тесноты связи динамики пула антигенреактивных Т-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы трансферина (CD71), выявило наличие связи преимущественно с активностью бактерицидного потенциала ПМЯЛ и, в целом, с функциональной активностью фагоцитов. При этом установлено, что на фоне снижения доли антигенреактивных $CD3^+CD71^+$ отмечалось некоторое усиление лейкоцитоза и значений лейкоцитарного индекса интоксикации.

Анализ статистической связи динамики пула антигенреактивных Т-клеток, несущих на мембране маркеры апоптоза CD95, показал наличие прямой функциональной тесноты с активностью фагоцитов и обратной зависимости с концентрациями IL-6, IL-10 и кислой фосфатазой лейкоцитов.

Исследования показали, что динамика значений количества лейкоцитов и их функционально-метаболического состояния, а также про- и противовоспалительных цитокинов имеет от очень тесной (высокой) до умеренной степени корреляции и вероятной связи с динамикой пула антигенреактивных Т-клеток. Анализ выявленных иммунологических особенностей позволяет сделать вывод о том, что при острой бруцеллезной инфекции происходит интенсивная активация адаптивного клеточного иммунитета, носящего нестерильный характер. Вместе с тем, сам по себе уровень антиген-стимулированной активации Т-клеток *ex vivo* не всегда отражает всю сложность иммунного ответа (в том числе способность лимфоцитов мигрировать в очаг инфекции). Однако при генерализации инфекции изучаемый показатель отражает активное формирование иммунитета к бруцеллам. На фоне прогрессирования системного воспалительного ответа отмечается включение регуляторных и компенсаторных механизмов со стороны иммунной системы, играющих ключевую роль в обеспечении естественной резистентности организма к внутриклеточному патогену. При этом, для оценки интенсивности воспаления при остром бруцеллезе, наиболее информативными среди маркеров активации Т-клеток можно выделить

количественные значения пула антигенреактивных $CD3^+CD69^+$ и $CD3^+CD95^+$. Для оценки формирования и развития иммуносупрессивного состояния, анализа активации компенсаторных механизмов, а также формирования иммунитета, более целесообразно изучение динамики пула антигенреактивных IL-2R α -позитивных Т-клеток. Показательна высокая степень связи динамики доли антигенреактивных $CD3^+CD71^+$ и $CD3^+CD95^+$ с активностью и бактерицидным потенциалом фагоцитов. Кроме того, известно, что FAS-рецептор представляет собой молекулы с двойной функцией, которые в зависимости от «клеточного контекста» (микроокружение, цитокиновый профиль, реактивность) оказывают про- или антиапоптотическое действие. Перекрестное связывание CD3 отдельно или костимуляция CD3/CD95 индуцируют процессинг каспазы-8 и/или каспазы-3 в качестве предварительного условия для активации и пролиферации Т-клеток. Изученная динамика указывает на реализацию механизмов Th1-иммунного ответа после рецептор-опосредованной TCR активации и запуска каскада иммунологических реакций.

Проведенные исследования имеют важное клиническое значение, особенно с учётом того, что у больных с острой бруцеллезной инфекцией сохраняется риск формирования острой системной реакции по типу «цитокинового шторма», обусловленного преимущественно нейтрофильными и макрофагальными факторами [275]. Анализ антигенреактивности Т-клеток позволит комплексно оценить интенсивность и направленность системной воспалительной реакции у больных бруцеллезом.

Результаты изучения особенностей антигениндуцированной экспрессии активационных молекул Т-лимфоцитов *ex vivo* у больных с различными формами течения бруцеллезной инфекции показали, что 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 бруцеллёзом в состоянии ремиссии. При этом, было обнаружено, что лиц с хроническим бруцеллезом без рецидивирующего течения выявлен большой пул антигенреактивных CTL 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 счёт цитотоксического эффекта. Вероятно, высокие значения показателей антигенной активации ТСL отражают активность иммунологического надзора за хронической инфекцией (персистенцией).

Корреляционный анализ не выявил статистически выраженной зависимости результатов исследований и величины титра антител в реакциях агглютинации Хеддельсона, 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 антителогенеза и антигенреактивностью *ex vivo* Т-клеток не выявлено.

Патогенез бруцеллезной инфекции очень сложен, имеет стадийный характер и во много обусловлен свойством возбудителя уклоняться от факторов естественной резистентности, ингибировать формирование полноценного иммунного ответа и сохраняться в клетка-мишенях организма хозяина. С одной стороны, бруцеллы подавляют фагоцитоз, снижают бактерицидную активность, уменьшают влияние на макроорганизм эндотоксических реакций ЛПС, препятствуют презентации антигена и формированию пула антигенспецифических Т-клеток. С другой, вызывают формирование системной воспалительной реакции, выраженной специфической сенсибилизации, гранулематозного воспаления и органических повреждений тканей [182].

В процессе развития инфекции, проникшие в макроорганизм и пережившие период адаптации бруцеллы, постепенно восстанавливают экспрессию ключевых генов, кодирующих метаболические процессы и факторы патогенности [202, 252]. Инфицированные клетки моноцитарно-макрофагальной системы запускают транскрипционные изменения в ответ на инфекцию (формируется в период адаптации бруцелл). Механизмы патогенности бруцелл способствуют формированию условий для персистенции их в организме хозяина [29,139]. Также известно, что патоген инициирует продукцию иммунорегуляторных факторов, которые способствуют ингибированию первичного иммунного ответа, модуляции метаболизма макрофагов, а соответственно и позднему формированию адаптивного иммунитета, в первую очередь Т-клеточного [173].

С учетом современных данных об особенностях формирования и функционирования иммунитета против бруцеллезной инфекции, а также известных молекулярных механизмов защиты, среди которых ведущая роль отводится специфической активности Т-клеток, целесообразно подробно изучить вопрос методической возможности и перспектив оценки протективной иммунологической защиты с использованием клеточного антигенспецифического теста.

Экспериментальные исследования на белых мышах, вакцинированных разными дозами *Brucella abortus* 19ВА, выявили наличие прямой пропорциональной зависимости между повышением КС активированных АБПК *ex vivo* лимфоцитов CD3⁺CD25⁺, CD3⁺МНС-II⁺ и ростом иммунизирующей дозы вакцины. При этом, в группе экспериментальных животных, иммунизированных самой высокой дозой (1×10^8 ж.м.к.), в наибольшей степени выражена динамика *ex vivo* реакции CD25⁺- позитивных Т-клеток во все сроки наблюдения.

Было выявлено, что, если при инфицировании иммунных биомоделей патогенным штаммом *Brucella melitensis*16-М в дозе 1×10^3 ж.м.к. значения КС активированных АБПК *ex vivo* CD3⁺CD25⁺- лимфоцитов равны 50 % и более, то обеспечивается 100% противобруцеллезная защита. Показано наличие тесной корреляции относительного количества антигенреактивных Т-клеток и

протективных свойств иммунитета, обеспечивающий защиту от заражения белых мышей после вакцинации: $r = -0,835 \div -0,968$, $R^2 = 0,703 \div 0,970$.

Регрессионный анализ не показал выраженной зависимости в группах экспериментальных биомоделей связи между значениями титров антител и увеличением иммунизирующей дозы вакцинного штамма ($R^2 = 0,342 \div 0,398$). Кроме того, анализ корреляции уровня СГТ антител и иммунологической защитой против бруцелл выявил слабо выраженную связь данных показателей, а также умеренную степень влияния СГТ на ИИ и ИИОВО после инфицирования иммунных к бруцеллезу белых мышей *Brucella melitensis* 16-М ($R^2 = 0,662 \div 0,683$). В результате проведения данных экспериментальных исследований был разработан патент (RU 2806161) «Способ оценки протективного иммунитета к возбудителю бруцеллеза».

Получив экспериментальные данные, указывающие на возможность применения разработанного клеточного антигенспецифического теста для оценки протективного клеточного иммунитета против бруцелл, дальнейшие наши исследования были посвящены оценке специфической активности Т-клеток под влиянием АБПК у 62 добровольцев, не имеющих специфического иммунитета к возбудителю бруцеллеза, до иммунизации и через 14 дней после введения вакцины по эпидпоказаниям. Результаты проведённого исследования демонстрируют диагностическую ценность предложенного методического подхода, заключающегося в анализе *ex vivo* активации Т-лимфоцитов под действием специфических антигенов. Данный метод может быть рекомендован для объективной 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). 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. Таким образом, клеточный антигенспецифический тест позволяет

проводить оценку готовности (активности) Т-клеток к выполнению эффекторных функций, отражая напряженность иммунологического контроля за инфекцией. Опираясь на полученные данные, был разработан и получен патент (RU 2714136) «Способ оценки фактической привитости людей против бруцеллеза на ранних сроках после вакцинации».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего диссертационного исследования впервые создан и апробирован в научно-практическую деятельность алгоритм применения клеточных антигенспецифических тестов *in vitro* для диагностики бруцеллеза и оценки специфического иммунитета. Изучен и внедрен в практику комплексный бруцеллезный антиген для клеточных тестов *in vitro*. Впервые представлена диагностическая точность клеточного антигенспецифического теста для выявления бруцеллеза у людей, которая составила 93,8 %. Получены новые данные об особенностях антиген-индуцированной активации Т-лимфоцитов у пациентов с бруцеллезом: наиболее высокие уровни экспрессии активационных маркеров CD25, CD69 и CD71 на поверхности Т-лимфоцитов выявлены при остром течении инфекции, а также в фазе обострения хронического бруцеллеза, у пациентов с хроническим бруцеллезом без обострений выявлен высокий пул антиген-реактивных CD8⁺ Т-лимфоцитов: КС CD3⁺CD8⁺CD25⁺ и CD3⁺CD8⁺CD69⁺ превышал 55–60 %, что подтверждает значимый вклад цитотоксических Т-клеток в поддержание иммунного контроля при хроническом течении инфекции. В условиях острой бруцеллезной инфекции выявлена характерная динамика активированных Т-лимфоцитов: на 14-е сутки отмечается выраженная антиген-реактивная активация, а в более поздние сроки (21–30-е сутки) – поляризация иммунного ответа в сторону цитотоксической реакции; при реинфицировании усиливается антигенспецифическая реактивность Т-лимфоцитов. Было экспериментально подтверждено, что после инфицирования иммунных биомоделей патогенным штаммом *Brucella melitensis* 16-М при значении КС активированных АБПК *ex vivo* CD3⁺CD25⁺ – лимфоцитов равным 50 % и более обеспечивается противобруцеллезная иммунологическая защита. На основании полученных экспериментальных данных разработан и предложен новый подход к оценке фактического формирования поствакцинального иммунитета у лиц, привитых против бруцеллеза, позволяющий объективно оценивать развитие специфического Т-клеточного ответа уже в ранние сроки после иммунизации, что открывает возможность оперативного мониторинга эффективности 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-е 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 бруцеллезом 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 ≥ 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 изучении клеточного иммунитета.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АБПК – антигенный белково-полисахаридный комплекс
- ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
- ж.м.к. – живые микробные клетки
- ИИ – индекс инфицированности
- ИИОВО – интенсивность обсеменения внутренних органов
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КБ – катионные белки
- КРС – крупный рогатый скот
- КС – коэффициент стимуляции
- КФ – кислая фосфатаза
- ЛПС – липополисахарид
- ЛИИ– лейкоцитарный индекс интоксикации
- МКАТ – моноклональные антитела
- МПО – миелопероксидаза
- НСТ – тест восстановления ниросинего тетразолия
- ПКТ – прокальцитонин
- ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты
- РА – реакция агглютинации
- РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов
- РПГА – реакция прямой гемагглютинации
- СДГ – сукцинатдегидрогеназа
- СГТ – средние значения геометрического титра антител
- АРС – антигенпрезентирующая клетка
- CD – кластер дифференцировки
- CTL – цитотоксический Т-лимфоцит
- ДС – дендритная клетка
- FcR – рецептор к Fc-фрагменту антитела
- HLA – лейкоцитарный антиген человека

IFN- γ – интерферон γ

IL – интерлейкин

Ig – иммуноглобулин

LPS – липополисахарид

MCP – регуляторный белок комплемента

MyD88 – компонент сигналинга TLR

MHC – главный комплекс гистосовместимости

MHC-I – молекула главного комплекса гистосовместимости I класса

MHC-II – молекула главного комплекса гистосовместимости II класса

NK – натуральные киллеры

PAMP – экзогенный патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

TCR – антигенраспознающий рецептор T-лимфоцитов

TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста бета1

Th – T-хелпер

Th1 – T-хелперы 1-го типа

Th2 – T-хелперы 2-го типа

TLR – толл-подобный рецептор

TNF- α – фактор некроза опухоли α

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллерген бруцеллезный жидкий (Бруцеллин) : фармакопейная статья ФС 42-3552-98 [Взамен ГФ X, ст. 114]. – М. : Изд-во стандартов, 1998. – 8 с.
2. Атаходжаева, Д. Р. Подострый бруцеллез и его клинико-иммунологическая характеристика / Д. Р. Атаходжаева // Вестник «Здоровье и образование в XXI веке». – 2013. – Т. 15, № 10. – С. 1–9.
3. Базанов, Г. А. Аллергия и аллергические заболевания / Г. А. Базанов, А. А. Михайленко. – М. : Изд-во МИА, 2009. – 304 с.
4. Банзаракшеев, В. Г. Лейкоцитарные индексы как способ оценки эндогенной интоксикации организма / В. Г. Банзаракшеев // Acta Biomedica Scientifica. – 2010. – № 3. – С. 390–391.
5. Баранова, Н. И. Некоторые иммунологические аспекты патогенеза аллергических заболеваний дыхательных путей с бактериальной сенсibilизацией / Н. И. Баранова, Б. А. Молотилон // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 4. – С. 30–34.
6. Белозеров, Е. С. Бруцеллез / Е. С. Белозеров. – М. : Медицина, 1985. – 184 с.
7. Богачева, Н. В. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы / Н. В. Богачева, А. В. Крючков, И. В. Дармов [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 11. – С. 48–53.
8. Борисов, А. Г. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы / А. Г. Борисов, А. А. Савченко, С. В. Смирнова // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 13–18.
9. Борисов, Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Л. Б. Борисов. – М. : МИА, 2005. – 423 с.
10. Бруцеллез : вопросы патогенеза и иммуногенеза / под ред. С. В. Балахонова. – Иркутск, 2017. – 48 с.

11. Бруцеллёз. Современное состояние проблемы : монография / под ред. Г. Г. Онищенко, А. Н. Куличенко. – 2-е изд., доп. – Н. Новгород : Союзполиграф ; Кириллица, 2021. – 356 с.
12. Бруцеллёз. Труды экспедиции ВИЭМ по изучению овечьего бруцеллёза (1933–1936) / под ред. П. Ф. Здродовского. – М. : ВИЭМ, 1937. – [Б. п.].
13. Бухарин, О. В. Персистенция бактериальных патогенов как результат отношений в системе паразит–хозяин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – № 4. – С. 3–9.
14. Васильев, А. Ю. Анализ данных лучевых методов исследования на основе принципов доказательной медицины : учеб. пособие / А. Ю. Васильев, А. Ю. Малый, Н. С. Серова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 25 с.
15. Вершилова, П. А. Бруцеллёз / П. А. Вершилова. – М. : Медгиз, 1961. – 414 с.
16. Вершилова, П. А. Изучение клеточных систем, образующих антитела в процессе вакцинального иммуногенеза / П. А. Вершилова, М. И. Чернышева, Л. А. Певницкий // Современные проблемы иммунологии и иммунопатологии. – Л., 1970. – С. 44.
17. Вершилова, П. А. Изучение напряжённости перекрёстного и типового иммунитета при бруцеллёзе / П. А. Вершилова, Д. С. Кудрина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1963. – № 8. – С. 34–39.
18. Вершилова, П. А. Клинико-эпидемиологическое и иммунологическое исследование привитых и непривитых против бруцеллёза людей, подвергающихся опасности заражения / П. А. Вершилова, В. И. Баранов, Н. Н. Щербакова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1968. – № 1. – С. 35–40.
19. Вершилова, П. А. Накожная ревакцинация против бруцеллёза рабочих мясокомбинатов и животноводческих хозяйств / П. А. Вершилова, А. А. Голубева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1958. – № 11. – С. 16–20.
20. Вершилова, П. А. Патогенез и иммунология бруцеллёза / П. А. Вершилова, М. И. Чернышова, Э. Н. Князева. – М. : Медицина, 1974. – 272 с.

21. Вершилова, П. А. Течение бруцеллёзной инфекции в иммунном организме / П. А. Вершилова, И. Н. Кокорин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1954. – № 1. – С. 27–31.
22. Вершилова, П. А. Эпидемиология бруцеллёза / П. А. Вершилова, А. А. Голубева // Бруцеллёз. – М., 1972. – С. 284–319.
23. Галактионов, В. Г. Иммунология / В. Г. Галактионов. – М. : Академия, 2009. – 528 с.
24. Голубков, Е. П. Маркетинговые исследования: теория, методология и практика / Е. П. Голубков. – М. : Финпресс, 1998. – 416 с.
25. Дармов, И. В. Современные лабораторные методы оценки эффективности проведения иммунизации против опасных и особо опасных инфекций / И. В. Дармов, Г. Д. Елагин, Н. В. Богачева [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 6. – С. 39–42.
26. Дранкин, Д. И. К вопросу о ревакцинации против бруцеллёза живой сухой накожной вакциной Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1957. – № 1. – С. 56–59.
27. Дубровина, В. И. Функциональные особенности фагоцитов при инфекционном и вакцинальном процессе, вызываемом *Francisella tularensis* : монография / В. И. Дубровина. – Иркутск, 2002. – 119 с.
28. Дубровина, В. И. Изучение иммунобиологических свойств экстракта поверхностных антигенов сибиреязвенного микроба / В. И. Дубровина, С. В. Лукьянова, Ж. А. Коновалова [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 6-1. – С. 164–168.
29. Дубровина, В. И. Иммуногенная эффективность антигенного препарата *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 *per se* и в сочетании с металлосодержащими нанокompозитами / В. И. Дубровина, Т. А. Иванова, С. В. Лукьянова [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2015. – № 3 (103). – С. 33–37.

30. Дубровина, В. И. Механизмы клеточного иммунного ответа при бруцеллёзе / В. И. Дубровина, Ж. А. Коновалова, К. Ю. Ястремская [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2016. – Т. 15, № 6. – С. 80–87.
31. Елисеева, Д. Д. Количественный и функциональный дефект регуляторных Т-клеток CD4+CD25+Foxp3+ у больных рассеянным склерозом / Д. Д. Елисеева, И. А. Завалишин, С. Н. Быковская // Вестник Российской государственной медицинской академии. – 2011. – № 6. – С. 67–70.
32. Железникова, Г. Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию / Г. Ф. Железникова // Журнал инфектологии. – 2011. – № 1. – С. 6–13.
33. Жукова, О. Б. Апоптоз и вирусная инфекция / О. Б. Жукова, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий. – Томск : Издательство Томского университета, 2006. – 142 с.
34. Здродовский, П. Ф. Проблемы инфекции, иммунитета и аллергии / П. Ф. Здродовский. – М. : Медицина, 1963. – 213 с.
35. Зенкова, Н. Ф. Профилактическая вакцинация людей живой бруцеллезной вакциной методом скарификации / Н. Ф. Зенкова // Труды Института краевой патологии Казахской ССР. – Алма-Ата, 1956. – Т. 3. – С. 77–86.
36. Иммунопатология и аллергология. Алгоритмы диагностики и лечения / под ред. Р. М. Хайтова. – М. : ГЭОТАР-Мед, 2003. – 112 с.
37. Инфекционные болезни: национальное руководство / под ред. Н. Д. Ющука, Ю. Я. Венгерова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 396–406.
38. Кайтмазова, Е. И. Сравнительная вирулентность разных биотипов бруцелл вида *melitensis*, *abortus*, *suis* / Е. И. Кайтмазова, Н. Н. Островская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1967. – № 2. – С. 66–69.
39. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство : в 2 т. / под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012.
40. Клиническая цитохимия / под ред. А. В. Ягоды, Н. А. Локтева. – Ставрополь : Ставропольская государственная медицинская академия, 2005. – 488 с.
41. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза,

легионеллеза : методические указания МУ 3.3.2.2124-06 // разраб. ФБУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт „Микроб“» [и др.]. – М., 2006. утв. Роспотребнадзором 22.12.2006. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200047517> (дата обращения: 01.08.2022).

42. Кулаков, Ю. К. Молекулярные аспекты персистенции бруцелл / Ю. К. Кулаков // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2016. – № 1. – С. 3–8.

43. Куличенко, А. Н. Использование антигенспецифических клеточных тестов *in vitro* для оценки формирования поствакцинального противочумного иммунитета / А. Н. Куличенко [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 203–208.

44. Курманова, Г. М. Оценка иммунного статуса и дифференцированная иммунокоррекция при бруцеллёзе : методические рекомендации / Г. М. Курманова, А. К. Дуйсенова, К. Б. Курманова, Н. Х. Спиричева. – Алматы, 2002. – 30 с.

45. Литвинова, Л. С. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов / Л. С. Литвинова, А. А. Гуцол, Н. А. Сохоневич [и др.] // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 7–26.

46. Лобзин, Ю. В. Лечение инфекционных больных : учеб.-метод. пособие для студ. мед. вузов / Ю. В. Лобзин, Ю. П. Финогеев, С. Н. Новицкий ; под общ. ред. Ю. В. Лобзина. – СПб. : Фолиант, 2003. – 124 с.

47. Логвиненко, О. В. Особенности иммунологических показателей крови у больных различными формами бруцеллёза / О. В. Логвиненко, Е. Л. Ракитина, Д. Г. Пономаренко [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 3. – С. 275–278.

48. Луговская, С. А. Иерархия гемопоэтических клеток: кинетика, структура и функции. II часть (лекция) / С. А. Луговская, Г. И. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – № 7. – С. 25–32.

49. Ляпина, Е. П. Хронический бруцеллёз: системное воспаление и эндотоксикоз, совершенствование терапии и эпидемиологического надзора : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.10 / Е. П. Ляпина. – Саратов, 2008. – 41 с.

50. Ляпина, Е. П. Хронический бруцеллёз: этиология, патогенез, клиника, лечение / Е. П. Ляпина, А. А. Шульдякова, В. Ф. Спирина. – Саратов, 2011. – 160 с.
51. Малов, В. А. Терапевтические маски бруцеллёза / В. А. Малов // Фарматека. – 2011. – № 4. – С. 22–28.
52. Мордык, А. В. Оценка специфического клеточного иммунитета у детей и подростков, больных туберкулёзом / А. В. Мордык // Вестник современной клинической медицины. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 60–64.
53. Новиков, П. Д. Диагностика аллергии в реакции выброса миелопероксидазы под влиянием аллергена / П. Д. Новиков, Н. Д. Новикова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2002. – № 1. – С. 63–68.
54. Нурпейсова, А. Х. Клиническая характеристика резидуального бруцеллёза / А. Х. Нурпейсова, Н. В. Рудаков, А. Д. Сафонов // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2016. – № 4 (17). – С. 66–68.
55. Об утверждении Национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям : приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21.03.2014 № 125н (в ред. от 19.02.2019). – М., 2019. – 12 с. – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70547158/> (дата обращения: 01.08.2022).
56. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.] ; пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. – М. : Мир, 1997. – Т. 1. – С. 81–143.
57. Островский, В. К. Лейкоцитарный индекс интоксикации при острых гнойных и воспалительных заболеваниях лёгких / В. К. Островский, Ю. М. Свитич, В. Р. Вебер // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. – 1983. – Т. 131, № 11. – С. 21–24.
58. Плеханова, М. А. Гамма-интерферон в диагностике туберкулёзной инфекции у детей / М. А. Плеханова, А. В. Мордык, Ю. И. Пацула // Сибирское медицинское обозрение. – 2011. – № 6. – С. 33–36.

59. Покровский, В. И. Инфекционные болезни и эпидемиология : учебник / В. И. Покровский, С. Г. Пак, Н. И. Брико, Б. К. Данилкин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 816 с.

60. Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментальных клиник (вивариев) / утв. Российской Академией медицинских наук и Министерством здравоохранения РФ 21–22.04.2003. – М., 2003. – 32 с.

61. Пономаренко, Д. Г. Анализ заболеваемости бруцеллёзом и молекулярно-генетическая характеристика популяции бруцелл на территории Российской Федерации / Д. Г. Пономаренко, А. А. Хачатурова, Д. А. Ковалёв [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 2. – С. 61–74.

62. Пономаренко, Д. Г. Анализ ситуации по бруцеллёзу в мире и Российской Федерации / Д. Г. Пономаренко, А. Д. Матвиенко, А. А. Хачатурова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024. – № 2. – С. 36–50.

63. Пономаренко, Д. Г. Бруцеллёз: анализ иммунопатологической концепции (материал для подготовки лекции) / Д. Г. Пономаренко, Н. С. Саркисян, А. Н. Куличенко // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 96–105.

64. Пономаренко, Д. Г. Бруцеллёз: тенденции развития ситуации в мире и прогноз на 2022 г. в Российской Федерации / Д. Г. Пономаренко, О. Н. Скударева, А. А. Хачатурова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. – № 2. – С. 36–45.

65. Пономаренко, Д. Г. Использование теста активации базофилов для лабораторной диагностики бруцеллёза и сибирской язвы / Д. Г. Пономаренко, Е. Л. Ракитина, О. В. Логвиненко // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. – Ставрополь : ВНИИ овцеводства и козоводства, 2012. – Т. 3, № 1-1. – С. 26–29.

66. Пономаренко, Д. Г. Новый подход к аллергодиагностике бруцеллёза / Д. Г. Пономаренко, О. В. Логвиненко, Н. С. Саркисян [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 1. – С. 89–92.

67. Пономаренко, Д. Г. Новый подход к комплексной оценке иммунобиологической реактивности контингента, подлежащего вакцинации (ревакцинации) против бруцеллёза / Д. Г. Пономаренко // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2015. – № 3. – С. 28–31.
68. Правила надлежащей лабораторной практики : приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н. – М., 2016. – 35 с.
69. Ракитина, Е. Л. Анализ содержания НКТ-лимфоцитов у больных острым и хроническим бруцеллёзом / Е. Л. Ракитина, О. В. Логвиненко, Д. Г. Пономаренко [и др.] // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных : материалы II Всероссийской научно-практической конференции. – Ставрополь, 2017. – С. 273–275.
70. Ременцова, М. М. Влияние гидрокортизона и методов заражения на высеваемость бруцелл из организма белых мышей / М. М. Ременцова, Т. А. Грушина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1978. – № 1. – С. 61–65.
71. Ройт, А. Иммунология : [пер. с англ.] / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл ; пер. под ред. Л. А. Пинегина. – М. : Мир, 2000. – 592 с.
72. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней : в 2 т. / Н. И. Брико, Г. Г. Онищенко, В. И. Покровский [и др.]. – М. : Медицинское информационное агентство, 2019. – Т. 1. – 880 с.
73. Рыжикова, С. Л. Продукция цитокинов клетками крови как показатель напряжённости поствакцинального клеточного иммунитета / С. Л. Рыжикова, Ю. Г. Дружинина, Т. Г. Рябичева [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 57–61.
74. Савченко, А. А. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний / А. А. Савченко, И. В. Кудрявцев, А. Г. Борисов // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 4. – С. 327–340.
75. Саидова, Б. М. Аллергодиагностика бруцеллёза / Б. М. Саидова, Д. Р. Ахмедов, М. С. Саидов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – № 3. – С. 16–17.

76. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней : СанПиН 3.3686-21 / утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4 [Электронный ресурс]. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/573660140> (дата обращения: 01.08.2022).

77. Саркисян, Н. С. Интенсивность специфической сенсибилизации и иммунный статус у больных бруцеллёзом / Н. С. Саркисян, Д. Г. Пономаренко, О. В. Логвиненко [и др.] // Медицинская иммунология. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 365–372.

78. Сафонов, А. Д. Современный взгляд на клинические классификации бруцеллёза / А. Д. Сафонов // Инфекционные болезни. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 106–109.

79. Таран, И. Ф. Бруцеллёз (Микробиология, иммунология, эпидемиология, профилактика) / И. Ф. Таран, Г. И. Лямкин. – Ставрополь, 1996. – 95 с.

80. Таран, И. Ф. Иммунологическая характеристика и вакцинопрофилактика при бруцеллёзе : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / И. Ф. Таран. – Саратов, 1967. – 35 с.

81. Тришкова, Л. Инфекционные болезни / Л. Тришкова, С. Богатырева. – М. : Медицина, 2010. – 451 с.

82. Фарманова, М. А. Клинико-эпидемиологические особенности бруцеллёза на современном этапе / М. А. Фарманова, И. А. Касымов, Д. Р. Атаходжаева [и др.] // Новый день в медицине. – 2020. – № 1 (29). – С. 436–438.

83. Фирстова, В. В. Определение экспрессии CD69 на лимфоцитах мышей, иммунизированных против чумы в ответ на стимуляцию антигенами чумного микроба / В. В. Фирстова, И. В. Бахтеева, Г. М. Титарева [и др.] // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11, № 4–5. – С. 336–337.

84. Фирстова, В. В. Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба / В. В. Фирстова, И. В. Бахтеева, Г. М. Титарева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – № 103. – С. 56–59.

85. Хайдуков, С. В. Возможности проточной цитометрии в диагностике инфекционных заболеваний. Часть 2 / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1, № 2. – С. 113–120.

86. Хайдуков, С. В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 7–16.

87. Цинкернагель, Р. М. Основы иммунологии / Р. М. Цинкернагель ; пер. с англ. под ред. А. А. Ярилина. – М. : Мир, 2008. – 135 с.

88. Цирельсон, Л. Е. Бруцеллёз в России: профессиональные заболевания и трудовой прогноз / Л. Е. Цирельсон, М. М. Желудков // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 5. – С. 18–22.

89. Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллёза у людей : методические рекомендации МР 3.1.0207-20 / разработ. ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, ФКУЗ «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора ; утв. Руководителем Роспотребнадзора, Главным государственным санитарным врачом РФ А. Ю. Поповой 19.08.2020. – М. : Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2021. – 24 с. – (Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации). – URL: <https://base.garant.ru/402622756/> (дата обращения: 01.08.2022).

90. Чернышева, М. И. Цитологический метод изучения формирования прививочного иммунитета при бруцеллёзе // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1958. – № 11. – С. 20.

91. Шестакова, И. В. Бруцеллез у взрослых : клинические рекомендации / И. В. Шестакова [и др.] ; утверждены решением Пленума правления Национального научного общества инфекционистов от 30 октября 2014 г. – М., 2014. – 71 с.

92. Щуковская, Т. Н. Оценка приобретённого иммунитета против сибирской язвы по степени повреждения лейкоцитов крови *in vitro* антраксином / Т. Н.

Щуковская, В. В. Фирстова, А. Л. Кравцов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 2007. – Вып. 93. – С. 81–84.

93. Эпидемиологический надзор, лабораторная диагностика бруцеллёза 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. – 96 с. – (Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации). – URL: <https://base.garant.ru/412408872/> (дата обращения: 12.11.2025).

94. Юхно Е. С. Значение дисфункции эндотелия и вариабельности генов-кандидатов для прогноза у больных острым коронарным синдромом без подъёма сегмента ST : автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.05, 03.02.07 / Е. С. Юхно. – Кемерово, 2015. – 31 с.

95. Ahmed, W. Establishment of chronic infection: Brucella's stealth strategy / W. Ahmed, K. Zheng, Z.-F. Liu [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2016. – Vol. 6. – Art. 30. – DOI: 10.3389/fcimb.2016.00030.

96. Aisen, P. Transferrin receptor 1 / P. Aisen // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2004. – Vol. 36, № 11. – P. 2137–2143. – DOI: 10.1016/j.biocel.2004.02.007.

97. Almajid, F. M. Lymphocyte activation test for diagnosis of sero-negative brucellosis in humans / F. M. Almajid // *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. – 2011. – Vol. 54, № 4. – P. 775–781.

98. Altamirano-Silva, P. *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the two-component system BvrR/BvrS allowing the adaptation to its replicative niche / P. Altamirano-Silva, J. Meza-Torres, A. Castillo-Zeledón [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2018. – Vol. 86, № 9. – P. 713–724.

99. Altamirano-Silva, P. Intracellular passage triggers a molecular response in *Brucella abortus* that increases its infectiousness / P. Altamirano-Silva, M. Cordero-Serrano, J. Méndez-Montoya [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2021. – Vol. 89, № 7. – e00004-21. – DOI: 10.1128/IAI.00004-21.

100. Amaral, E. P. Inhibiting Adenosine Receptor Signaling Promotes Accumulation of Effector CD4⁺ T Cells in the Lung Parenchyma During Severe Tuberculosis / E. P. Amaral, E. de Salles Machado, C. C. Barbosa Bomfim [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 219, № 6. – P. 964–974. – DOI: 10.1093/infdis/jiy586.
101. Anderson, T. D. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus* infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum / T. D. Anderson, N. F. Cheville // *The American Journal of Pathology*. – 1986. – Vol. 124, № 2. – P. 226–237.
102. Andriopoulos, P. Prevalence of Brucella antibodies on a previously acute brucellosis infected population: sensitivity, specificity and predictive values of Rose Bengal and Wright standard tube agglutination tests / P. Andriopoulos, A. Kalogerakou, D. Rebelou [et al.] // *Infection*. – 2015. – Vol. 43, № 3. – P. 325–330. – DOI: 10.1007/s15010-015-0748-z.
103. Araj, G. F. Profiles of Brucella-specific immunoglobulin G subclasses in sera of patients with acute and chronic brucellosis / G. F. Araj // *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease*. – 1988. – Vol. 2, № 5. – P. 401–410.
104. Araya, L. N. Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus* / L. N. Araya, P. H. Elzer, G. E. Rowe [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 1989. – Vol. 143, № 10. – P. 3330–3337.
105. Arellano-Reynoso, B. Cyclic β -1,2-glucan is a Brucella virulence factor required for intracellular survival / B. Arellano-Reynoso, N. Lapaque, S. Salcedo [et al.] // *Nature Immunology*. – 2005. – Vol. 6, № 6. – P. 618–625.
106. Arenas, G. N. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages / G. N. Arenas, A. S. Staskevich, A. Aballay, L. S. Mayorga // *Infection and Immunity*. – 2000. – Vol. 68, № 7. – P. 4255–4263.
107. Ariza, J. Specific antibody profile in human brucellosis / J. Ariza, T. Pellicer, R. Pallares [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 1992. – Vol. 14, № 1. – P. 131–140.

108. Atluri, V. L. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts / V. L. Atluri M. N. Xavier, M. F. de Jong [et al.] // *Annual Review of Microbiology*. – 2011. – Vol. 65. – P. 523–541.
109. Avila-Calderon, E. D. Dendritic cells and *Brucella* spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen / E. D. Avila-Calderon, L. Flores-Romo, W. Sharon [et al.] // *Folia Microbiologica*. – 2020. – Vol. 65, № 1. – P. 1–16.
110. Bahador, A. Frequencies of CD4⁺ T regulatory cells and their CD25^{high} and FoxP3^{high} subsets augment in peripheral blood of patients with acute and chronic brucellosis / A. Bahador, J. Hadjati, N. Hassannejad [et al.] // *Osong Public Health and Research Perspectives*. – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. 161–168.
111. Baldi, P. C. Immunopathology of *Brucella* infection / P. C. Baldi G. H. Giambartolomei // *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 18–26.
112. Baldwin, C. L. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? / C. L. Baldwin, R. Goenka // *Critical Reviews in Immunology*. – 2006. – Vol. 26, № 5. – P. 407–442.
113. Barquero-Calvo, E. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection / E. Barquero-Calvo, E. Chaves-Olarte, D. S. Weiss [et al.] // *PLOS ONE*. – 2007. – Vol. 2, № 7. – Art. e631. – DOI: 10.1371/journal.pone.0000631.
114. Barquero-Calvo, E. *Brucella abortus* induces the premature death of human neutrophils through the action of its lipopolysaccharide / E. Barquero-Calvo, R. Mora-Cartin, V. Arce-Gorvel [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2015. – Vol. 11, № 5. – Art. e1004853. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1004853.
115. Ben Marzouk-Hidalgo, O. J. Differential effects of viremia and microbial translocation on immune activation in HIV-infected patients throughout ritonavir-boosted darunavir monotherapy / O. J. Ben Marzouk-Hidalgo, A. Torres-Cornejo, A. Gutiérrez-Valencia [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – Vol. 94, № 17. – Art. e781. – DOI: 10.1097/MD.0000000000000781.

116. Ben Tekaya, H. Bartonella and Brucella – weapons and strategies for stealth attack / H. Ben Tekaya, J. P. Gorvel, C. Dehio [et al.] // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2013. – Vol. 5, № 9. – Art. a010231. – DOI: 10.1101/cshperspect.a010231.
117. Berman, D. T. Relationship of biological activities to structure of *Brucella abortus* endotoxin and lipopolysaccharide / D. T. Berman, R. S. Kurtz // Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie. – 1987. – Vol. 138, № 1. – P. 98–101.
118. Bertotto, A. Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection / A. Bertotto, R. Gerli, F. Spinozzi [et al.] // Journal of Clinical Immunology. – 1993. – Vol. 13, № 5. – P. 1177–1180.
119. Bessoles, S. Human CD4+ invariant NKT cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-dependent but CD4-independent mechanisms / S. Bessoles, S. Dudal, G. S. Besra [et al.] // European Journal of Immunology. – 2009. – Vol. 39, № 4. – P. 1025–1035.
120. Boschiroli, M. L. Type IV secretion and *Brucella* virulence / M. L. Boschiroli, S. Ouahrani-Bettache, V. Foulongne [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2002. – Vol. 90, № 1–4. – P. 341–348.
121. Boura, P. Effect of bacterial extracts on the immunologic profile in chronic relapsing brucellosis patients / P. Boura, P. Skendros, J. Kountouras [et al.] // International Journal of Immunopathology and Pharmacology. – 1999. – Vol. 12, № 2. – P. 103–111.
122. Bretscher, P. On analyzing how the Th1/Th2 phenotype of an immune response is determined: classical observations must not be ignored / P. Bretscher // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. – Art. 1234. – DOI: 10.3389/fimmu.2019.01234.
123. Butcher, M. J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice / M. J. Butcher, J. Zhu // F1000Research. – 2021. – Vol. 10. – Art. 30. – DOI: 10.12703/r/10-30.
124. Buttigieg, S. C. Brucellosis control in Malta and Serbia: a one health evaluation / S. C. Buttigieg, S. Savic, D. Cauchi // Frontiers in Veterinary Science. – 2018. – Vol. 5. – Art. 147. – DOI: 10.3389/fvets.2018.00147.
125. Byndloss, M. X. How bacterial pathogens use type III and type IV secretion systems to facilitate their transmission / M. X. Byndloss, F. Rivera-Chávez, R. M. Tsolis,

A. J. Bäumlér // *Current Opinion in Microbiology*. – 2017. – Vol. 35. – P. 1–7. – DOI: 10.1016/j.mib.2016.08.007.

126. Byndloss, M. X. Chronic bacterial pathogens: mechanisms of persistence / M. X. Byndloss, R. M. Tsois // *Microbiology Spectrum*. – 2016. – Vol. 4, № 2. – Art. VMBF-0015-2015. – DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0020-2015.

127. Cardoso, P. G. *Brucella spp.* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system / P. G. Cardoso, G. C. Macedo, V. Azevedo, S. C. Oliveira // *Microbial Cell Factories*. – 2006. – Vol. 5. – Art. 13. – DOI: 10.1186/1475-2859-5-13.

128. Celli, J. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum / J. Celli, C. de Chastellier, D-M. Franchini [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2003. – Vol. 198, № 4. – P. 545–556. – DOI: 10.1084/jem.20030088.

129. Chen, J. Intratumoral CD45⁺CD71⁺ erythroid cells induce immune tolerance and predict tumor recurrence in hepatocellular carcinoma / J. Chen, Y. D. Qiao, X. Li [et al.] // *Cancer Letters*. – 2021. – Vol. 499. – P. 85–98. – DOI: 10.1016/j.canlet.2020.12.003.

130. Clapp, B. Protective live oral brucellosis vaccines stimulate Th1 and Th17 cell responses / B. Clapp, J. A. Skyberg, X. Yang [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2011. – Vol. 79, № 10. – P. 4165–4174. – DOI: 10.1128/IAI.05080-11.

131. Cloeckert, A. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella* / A. Cloeckert, J. M. Verger, M. Grayon [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 1996. – Vol. 145, № 1. – P. 1–8. – DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08547.x.

132. Conde-Alvarez, R. The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition / R. Conde-Alvarez, V. Arce-Gorvel, M. Iriarte [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2012. – Vol. 8, № 5. – Art. e1002675. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1002675.

133. Copin, R. MyD88-dependent activation of B220⁺ CD11b⁺ Ly-6C⁺ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection / R. Copin, P. De Baetselier, Y. Carlier [et al.]

// The Journal of Immunology. – 2007. – Vol. 178, № 8. – P. 5182–5191. – DOI: 10.4049/jimmunol.178.8.5182.

134. Corbel, M. J. Brucellosis: an overview / M. J. Corbel // Emerging Infectious Diseases. – 1997. – Vol. 3, № 2. – P. 213–221. – DOI: 10.3201/eid0302.970219.

135. Coria, L. M. Brucella abortus Omp19 recombinant protein subcutaneously co-delivered with an antigen enhances antigen-specific T helper 1 memory responses and induces protection against parasite challenge / L. M. Coria, A. E Ibañez, K. A. Pasquevich [et al.] // Vaccine. – 2016. – Vol. 34, № 4. – P. 430–437. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.012.

136. Cutler, S. J. Brucellosis – new aspects of an old disease / S. J. Cutler, A. M. Whatmore, N. J. Commander // Journal of Applied Microbiology. – 2005. – Vol. 98. – P. 1270–1281. – DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02622.x.

137. De Barsy, M. Identification of a Brucella spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2 / M. De Barsy, A. Jamet, D. Filopon [et al.] // Cellular Microbiology. – 2011. – Vol. 13. – P. 1044–1058. – DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01601.x.

138. De Barsy, M. A *Brucella abortus* cstA mutant is defective for association with endoplasmic reticulum exit sites and displays altered trafficking in HeLa cells / M. De Barsy, A. Mirabella, J. -J. Letesson, X. De Bolle // Microbiology. – 2012. – Vol. 158 (Pt 10). – P. 2610-2618. – DOI: 10.1099/mic.0.060509-0.

139. De Figueiredo, P. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions / P. De Figueiredo, T. A. Ficht, A. Rice-Ficht [et al.] // The American Journal of Pathology. – 2015. – Vol. 185, № 6. – P. 1505–1517. – DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.003.

140. De Jong, M. F. Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the Brucella type IV secretion system / M. F. De Jong, Y. H. Sun, A. B. den Hartigh [et al.] // Molecular Microbiology. – 2008. – Vol. 70, № 6. – P. 1378–1396. – DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06487.x.

141. De Long, M. F. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella* / M. F. De Long, H. G. Rolán, R. M. Tsolis // *Cellular Microbiology*. – 2010. – Vol. 12, № 9. – P. 1195–1202. – DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01498.x.
142. De Long, M. F. Brucellosis and type IV secretion / M. F. De Long, R. M. Tsolis // *Future Microbiology*. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 47–58. – DOI: 10.2217/fmb.11.136.
143. De Maria, R. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors / R. De Maria, M. G. Cifone, R. Trotta [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1994. – Vol. 180. – P. 1999–2004. – DOI: 10.1084/jem.180.5.1999.
144. De, P. Structural determinants in a glucose-containing lipopolysaccharide from *Mycobacterium tuberculosis* critical for inducing a subset of protective T cells / P. De, M. McNeil, M. Xia [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Vol. 293, № 25. – P. 9706–9717. – DOI: 10.1074/jbc.RA118.002582.
145. De Weck, A. L. Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome: a multicenter study. II. Basophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its impact on pathogenesis / A. L. De Weck, M. L. Sanz, P. M. Gamboa, J. M. Jermann // *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. – 2010. – Vol. 20, № 1. – P. 39–57.
146. Dehio, C. Type IV effector secretion and subversion of host functions by *Bartonella* and *Brucella* species / C. Dehio, R. M. Tsolis // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2017. – Vol. 413. – P. 269–295. – DOI: 10.1007/978-3-319-75241-9_11.
147. Delpino, M. V. A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice / M. V. Delpino, M. I. Marchesini, S. M. Estein [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2007. – Vol. 75. – P. 299–305. – DOI: 10.1128/iai.00952-06.
148. Den Hartigh, A. B. VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system / A. B.

Den Hartigh, H. G. Rolán, M. F. De Jong [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – Vol. 190. – P. 4427–4436. – DOI: 10.1128/JB.00406-08.

149. Dinh, H. Q. Coexpression of CD71 and CD117 identifies an early unipotent neutrophil progenitor population in human bone marrow / H. Q. Dinh, T. Eggert, M. A. Meyer [et al.] // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53, № 2. – P. 319–334.e6. – DOI: 10.1016/j.immuni.2020.07.017.

150. Döhmer, P. H. Identification of a type IV secretion substrate of *Brucella abortus* that participates in the early stages of intracellular survival / P. H. Döhmer, E. Valguarnera, C. Czibener, J. E Ugalde // *Cellular Microbiology*. – 2014. – Vol. 16, № 3. – P. 396–410. – DOI: 10.1111/cmi.12224.

151. Dong, D. Structural basis of assembly of the human T cell receptor–CD3 complex / D. Dong, L. Zheng, J. Lin [et al.] // *Nature*. – 2019. – Vol. 573, № 7775. – P. 546–552. – DOI: 10.1038/s41586-019-1537-0.

152. Dornand, J. Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism / J. Dornand, V. Lafont, J. Oliaro [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2004. – Vol. 72, № 4. – P. 2303–2311. – DOI: 10.1128/IAI.72.4.2303-2311.2004.

153. Dorneles, E. M. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination / E. M. Dorneles, A. Teixeira-Carvalho, M. S. Araújo [et al.] // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33, № 31. – P. 3659–3666. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.05.057.

154. Drappa, J. The Fas protein is expressed at high levels on CD4⁺CD8⁺ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr / J. Drappa, N. Brot, K. B. Elkon // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – Vol. 90, № 21. – P. 10340–10344. – DOI: 10.1073/pnas.90.21.10340.

155. Elfaki, M. G. Host response to *Brucella* infection: review and future perspective / M. G. Elfaki, A. A. Alaidan, A. A. Al-Hokail // *Infection and Drug Resistance*. – 2015. – Vol. 8. – P. 697–701. – DOI: 10.3855/jidc.6625.

156. Ellis, J. S. Regulatory T cells in B-cell-deficient and wild-type mice differ functionally and in expression of cell surface markers / J. S. Ellis, H. Braley-Mullen // *Immunology*. – 2015. – Vol. 144, № 4. – P. 598–610. – DOI: 10.1111/imm.12410.
157. Eneslätt, K. Signatures of T cells as correlates of immunity to *Francisella tularensis* / K. Eneslätt, M. Normark, R. Björk [et al.] // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 3. – Art. e32367. – DOI: 10.1371/journal.pone.0032367.
158. Enright, F. M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infections in domestic animals / F. M. Enright, J. R. Duncan // *Animal Brucellosis* / ed. by K. H. Nielsen, J. R. Duncan. – Boca Raton : CRC Press, 1990. – P. 301–320.
159. Erokhina, S. A. HLA-DR-expressing NK cells: effective killers suspected for antigen presentation / S. A. Erokhina, M. A. Streltsova, L. M. Kanevskiy [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2021. – Vol. 109, № 2. – P. 327–337. – DOI: 10.1002/JLB.3RU0420-668RR.
160. Evnouchidou, I. The role of endocytic trafficking in antigen T cell receptor activation / I. Evnouchidou, V. Caillens, D. Koumantou, L. Saveanu // *Biomedical Journal*. – 2022. – Vol. 45, № 2. – P. 310–320. – DOI: 10.1016/j.bj.2021.09.004.
161. Fernandes, D. M. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus* / D. M. Fernandes, C. L. Baldwin // *Infection and Immunity*. – 1995. – Vol. 63. – P. 1130–1133.
162. Firstova, V. V. Immunological markers that correlate with protective immunity against tularemia infection / V. V. Firstova, A. N. Mokrievich, V. M. Pavlov [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2014. – Vol. 808. – P. 15–23. – DOI: 10.1007/978-81-322-1774-9_2.
163. Forestier, C. *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation / C. Forestier, F. Deleuil, N. Lapaque [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2000. – Vol. 165, № 9. – P. 5202–5210. – DOI: 10.4049/jimmunol.165.9.5202.
164. Gamboa, P. M. Component-resolved in vitro diagnosis in peach-allergic patients / P. M. Gamboa, M. L. Sanz, M. Lombardero [et al.] // *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. – 2009. – Vol. 19, № 1. – P. 13–20.

165. Ganji, A. Evaluation of regulatory T cells in patients with acute and chronic brucellosis / A. Ganji, G. Mosayebi, E. Ghaznavi-Rad [et al.] // Reports of Biochemistry and Molecular Biology. – 2017. – Vol. 5. – P. 91–96.
166. Gerosa, F. Structural analysis of the CD69 early activation antigen by two monoclonal antibodies directed to different epitopes / F. Gerosa, M. Tommasi, M. Scardoni [et al.] // Molecular Immunology. – 1991. – Vol. 28, № 1–2. – P. 159–168. – DOI: 10.1016/0161-5890(91)90100-x.
167. Gerber, W. A. Focus on chronic variable immunodeficiency for primary care practitioners, the gatekeepers to optimal health outcomes for primary immunodeficiency syndromes / W. A. Gerber // Current Pediatrics Reports. – 2019. – Vol. 7. – P. 130–144. – DOI: 10.1007/s40124-019-00202-8.
168. Ghaznavi-Rad, E. Reduced IFN- γ production in chronic brucellosis patients / E. Ghaznavi-Rad, K. Khosravi, N. Zarinfar, G. Mosayebi // Iranian Journal of Immunology. – 2017. – Vol. 14. – P. 215–222.
169. Giambartolomei, G. H. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the pro-inflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus* / G. H. Giambartolomei, A. Zwerdling, J. Cassatar [et al.] // The Journal of Immunology. – 2004. – Vol. 173. – P. 4635–4642. – DOI: 10.4049/jimmunol.173.7.4635.
170. Glowacka, P. *Brucella* – virulence factors, pathogenesis and treatment / P. Glowacka, D. Zakowska, K. Naylor, M. Niemcewicz, A. Bielawska-Drozd // Polish Journal of Microbiology. – 2018. – Vol. 67, № 2. – P. 151–161. – DOI: 10.21307/pjm-2018-029.
171. Goenka, R. B lymphocytes provide an infection niche for intracellular bacterium *Brucella abortus* / R. Goenka, P. D. Guirnalda, S. J. Black [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2012. – Vol. 206. – P. 91–98. – DOI: 10.1093/infdis/jis310.
172. Goenka, R. B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* / R. Goenka, M. A. Parent, P. H. Elzer, C. L. Baldwin // The Journal of Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 203. – P. 1136–1146. – DOI: 10.1093/infdis/jiq171.

173. Gomes, M. T. R. STING regulates metabolic reprogramming in macrophages via HIF-1 α during *Brucella* infection / M. T. R. Gomes, E. S. Guimarães, F. V. Marinho [et al.] // PLOS Pathogens. – 2021. – Vol. 17, № 5. – Art. e1009597. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1009597.
174. Gomes, M. T. The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus* / M. T. Gomes, P. C. Campos, L. A. de Almeida [et al.] // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2012. – Vol. 2. – Art. 130. – DOI: 10.3389/fcimb.2012.00130.
175. Gorabi, A. M. The pivotal role of CD69 in autoimmunity / A. M. Gorabi, S. Hajighasemi, N. Kiaie [et al.] // Journal of Autoimmunity. – 2020. – Vol. 111. – Art. 102453. – DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102453.
176. Gorvel, J. P. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication / J. P. Gorvel, E. Moreno // Veterinary Microbiology. – 2002. – Vol. 90. – P. 281–297. – DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00214-6.
177. Grzywa, T. M. The role of CD71⁺ erythroid cells in the regulation of the immune response / T. M. Grzywa, D. Nowis, J. Golab // Pharmacology & Therapeutics. – 2021. – Vol. 228. – Art. 107927. – DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107927.
178. Guo, H. Ratio of CD147^{high}/CD147^{low} in CD4⁺CD25⁺ T cells: a potential biomarker for early diagnosis and prediction of response to therapy for autoimmune diseases / H. Guo, L. Xun, R. Zhang, X. Gou // Medical Hypotheses. – 2018. – Vol. 115. – P. 1–4. – DOI: 10.1016/j.mehy.2018.03.005.
179. Hanot Mambres, D. In situ characterization of splenic *Brucella melitensis* reservoir cells during the chronic phase of infection in susceptible mice / D. Hanot Mambres, A. Machelart, J. M. Vanderwinden [et al.] // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 9. – Art. e0137835. – DOI: 10.1371/journal.pone.0137835.
180. Hasanjani, M. R. Evaluation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells during treatment of patients with brucellosis / M. R. Hasanjani, M. Bayani, S. A. Soleimani [et al.] // Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. – 2016. – Vol. 30. – P. 675–682.

181. Hasegawa, A. Role of CD69 in the pathogenesis of inflammation / A. Hasegawa, T. Nakayama // *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. – 2010. – Vol. 33, № 4. – P. 189–195.
182. Hayday, A. C. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection / A. C. Hayday // *Annual Review of Immunology*. – 2000. – Vol. 18. – P. 975–1026. – DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.975.
183. Herrou, J. Periplasmic protein EipA determines envelope stress resistance and virulence in *Brucella abortus* / J. Herrou, J. W. Willett, A. Fiebig [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2019. – Vol. 111, № 3. – P. 637–661. – DOI: 10.1111/mmi.14178.
184. Holling, T. Function and regulation of MHC Class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men / T. Holling, E. Schooten, P. van den Elsen // *Human Immunology*. – 2004. – Vol. 65, № 4. – P. 282–290. – DOI: 10.1016/j.humimm.2004.01.005.
185. Huang, J. A single peptide–major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4⁺ T cells / J. Huang, M. Brameshuber, X. Zeng [et al.] // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 5. – P. 846–857. – DOI: 10.1016/j.immuni.2013.08.036.
186. Huy, T. X. N. Immunization with a Combination of Four Recombinant *Brucella abortus* Proteins Omp16, Omp19, Omp28, and L7/L12 Induces T Helper 1 Immune Response Against Virulent *B. abortus* 544 Infection in BALB/c Mice / T. X. N. Huy, T. T. Nguyen, A. W. B. Reyes [et al.] // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2021. – Vol. 7. – Art. 577026. – DOI: 10.3389/fvets.2020.577026.
187. Irmak, H. Use of the Brucella IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis / H. Irmak, T. Buzgan, O. Evirgen, H. Akdeniz // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2004. – Vol. 70. – P. 688–694.
188. Janeway, C. A. Innate immune recognition / C. A. Janeway, R. Medzhitov // *Annual Review of Immunology*. – 2002. – Vol. 20. – P. 197–216.
189. Jiao, H. The mechanism of facultative intracellular parasitism of *Brucella* / H. Jiao, Z. Zhou, B. Li [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 7. – Art. 3673. – DOI: 10.3390/ijms22073673.

190. Jin, M. Research progress on complications of Brucellosis / M. Jin, Z. Fan, R. Gao [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2023. – 13:1136674. – DOI: 10.3389/fcimb.2023.1136674.
191. Kaygusuz, T. O. Investigation of hearing loss in patients with acute brucellosis by standard and high-frequency audiometry / T. O. Kaygusuz, I. Kaygusuz, S. S. Kilic [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection.* – 2005. – Vol. 11. – P. 559–563.
192. Ke, Y. Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors / Y. Ke, Y. Wang, W. Li, Z. Chen // *J. Front Cell Infect Microbiol.* – 2015. – V. 5 (72). P. 114–116.
193. Keestra-Gounder, A.M. NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation / A.M. Keestra-Gounder, M. X. Byndloss, N. Seyffert [et al.] // *Nature.* – 2016. – Vol. 532, №7599. – P. 394–397. – DOI: 10.1038/nature17631.
194. Kho, S. Preserved dendritic cell HLA-DR expression and reduced regulatory T cell activation in asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infection // S. Kho, J. Marfurt, R. Noviyanti [et al.] // *Infect Immun.* – 2015– Vol. 83, № 8. – P. 3224–3232. – DOI: 10.1128/IAI.00226-15.
195. Kilic, S.S. Gamma/delta T cells in patients with acute brucellosis / S.S. Kilic, H. H. Akbulut, M. Ozden, V. Bulut // *Clin. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 9, №2. – P. 101–104. – DOI: 10.1007/s10238-008-0021-1.
196. Kleinman, C. L. ChIP-seq analysis of the LuxR-type regulator VjbR reveals novel insights into the *Brucella* virulence gene expression network / C. L. Kleinman, Gio Sycz, H. R. Bonomi [et al.] // *Nucleic Acids Research.* – 2017. – Vol. 45, № 10. – P. 5757–5769. – DOI: 10.1093/nar/gkx165.
197. Ko, J. Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis / J. Ko, A. Gendron-Fitzpatrick, G. A. Splitter // *The Journal of Immunology.* – 2002. – Vol. 168. – P. 2433–2440. – DOI: 10.4049/jimmunol.168.5.2433.
198. Ko, J. Molecular host–pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans / J. Ko, G.

A. Splitter // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2003. – Vol. 16, № 1. – P. 65–78. – DOI: 10.1128/CMR.16.1.65-78.2003.

199. Kohler, S. The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell / S. Kohler, V. Foulongne, S. Ouahrani-Bettach [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Vol. 99, № 24. – P. 15711–15716. – DOI: 10.1073/pnas.232454299.

200. Kulakov, Y. K. Molecular aspects of *Brucella* persistence / Y. K. Kulakov // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. – 2016. – Vol. 31, № 1. – P. 1–8.

201. Kumar, H. NLRC5 deficiency does not influence cytokine induction by virus and bacteria infections / H. Kumar, J. Pandey, S. Zou [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186, № 2. – P. 994–1000. – DOI: 10.4049/jimmunol.1002094.

202. Lamontagne, J. Intracellular adaptation of *Brucella abortus* / J. Lamontagne, A. Forest, E. Marazzo [et al.] // *Journal of Proteome Research*. – 2009. – Vol. 8, № 3. – P. 1594–1609. – DOI: 10.1021/pr800978p.

203. Leach, M. *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis* / M. Leach, M. Drummond, A. Doig. – Chichester : Wiley-Blackwell, 2013. – 248 p. [1](#) DOI: 0.1002/9781118487969.

204. Lee, M. S. A mechanical switch couples T cell receptor triggering to the cytoplasmic juxtamembrane regions of CD3 ζ / M. S. Lee, C. R. Glassman, N. R. Deshpande [et al.] // *Immunity*. – 2015. – Vol. 43, № 2. – P. 227–239. – DOI: 10.1016/j.immuni.2015.06.018.

205. Li, L. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1 / L. Li, C. J. Fang, J. C. Ryan [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107, № 8. – P. 3505–3510. – DOI: 10.1073/pnas.0913192107.

206. Li, Z. Immunization with a combination of recombinant *Brucella abortus* proteins induces T helper immune response and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice / Z. Li, S. Wang, S. Wei [et al.] // *Microbial Biotechnology*. – 2022. – Vol. 15, № 6. – P. 1811–1822. – DOI: 10.1111/1751-7915.14015.

207. Liu, Z. Long ignored but making a comeback: a worldwide epidemiological evolution of human brucellosis / Z. Liu, L. Gao, M. Wang [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2024. – Vol. 13, № 1. – Art. 2290839. – DOI: 10.1080/22221751.2023.2290839.

208. Liautard, J. Identification and isolation of *Brucella suis* virulence genes involved in resistance to the human innate immune system / J. Liautard, S. Ouahrani-Bettache, V. Jubier-Maurin [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2007. – Vol. 75, № 11. – P. 5167–5174. – DOI: 10.1128/IAI.00690-07.

209. Lin, J. T cell receptor signaling / J. Lin, A. Weiss // *Journal of Cell Science*. – 2001. – Vol. 114, № 2. – P. 243–244.

210. Lin, Y. Ontology-based representation and analysis of host–*Brucella* interactions / Y. Lin, Z. Xiang, Y. He // *Journal of Biomedical Semantics*. – 2015. – Vol. 6. – Art. 37. – DOI: 10.1186/s13326-015-0036-y.

211. López-Goñi, I. Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS / I. López-Goñi, C. Guzmán-Verri, L. Manterola [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 2002. – Vol. 90, № 1–4. – P. 329–339. – DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00218-3.

212. Lucey, D. R. Evolution of the type-1 (Th1)-type-2 (Th2) cytokine paradigm / D. R. Lucey // *Infectious Disease Clinics of North America*. – 1999. – Vol. 13, № 1. – P. 1–9. – DOI: 10.1016/s0891-5520(05)70039-8.

213. Ly, L. H. Microdissection of the cytokine milieu of pulmonary granulomas from tuberculous guinea pigs / L. H. Ly, M. I. Russell, D. N. McMurray // *Cellular Microbiology*. – 2007. – Vol. 9. – P. 1127–1136. – DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00854.x.

214. Manetti, R. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells / R. Manetti, P. Parronchi, M. G. Giudizi [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1993. – Vol. 177. – P. 1199–1204. – DOI: 10.1084/jem.177.4.1199.

215. Manterola, L. BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence / L. Manterola, C. Guzmán-

Verri, E. Chaves-Olarte [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2007. – Vol. 75, № 10. – P. 4867–4874. – DOI: 10.1128/IAI.00439-07.

216. Mantur, B. ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis / B. Mantur, A. Parande, S. Amarnath [et al.] // *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2010. – Vol. 83. – P. 314–318. – DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0790.

217. Mantur, B. G. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis / B. G. Mantur, S. K. Amarnath, R. S. Shinde // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2007. – Vol. 25, № 3. – P. 188–202. – DOI: 10.4103/0255-0857.34758.

218. Marega, L. F. Phenotypes of STAT3 gain-of-function variant related to disruptive regulation of CXCL8/STAT3, KIT/STAT3, and IL-2/CD25/Treg axes / L. F. Marega, J. S. Sabino, M. V. Pedroni [et al.] // *Immunologic Research*. – 2021. – Vol. 69, № 5. – P. 445–456. – DOI: 10.1007/s12026-021-09225-0.

219. Martínez-Núñez, C. The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus* / C. Martínez-Núñez, P. Altamirano-Silva, F. Alvarado-Guillén [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2010. – Vol. 192. – P. 5603–5608. – DOI: 10.1128/JB.00567-10.

220. Martirosyan, A. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen / A. Martirosyan, E. Moreno, J-P. Gorvel // *Immunological Reviews*. – 2011. – Vol. 240. – P. 211–234. – DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x.

221. Mary, C. Interaction via the N terminus of the type IV secretion system (T4SS) protein VirB6 with VirB10 is required for VirB2 and VirB5 incorporation into T-pili and for T4SS function / C. Mary, A. Fouillen, B. Bessette [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Vol. 293, № 35. – P. 13415–13426. – DOI: 10.1074/jbc.RA118.002751.

222. Marzio, R. CD69 and regulation of the immune function / R. Marzio, J. Mauël, S. Betz-Corradin // *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. – 1999. – Vol. 21, № 3. – P. 565–582. – DOI: 10.3109/08923979909007126.

223. Meador, V. P. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta / V. P. Meador, B. L. Deyoe // *Veterinary Pathology*. – 1989. – Vol. 26, № 6. – P. 513–515. – DOI: 10.1177/030098588902600609.

224. Meltzer, E. Sexually transmitted brucellosis in humans / E. Meltzer, Y. Sidi, G. Smolen [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 51, № 2. – P. e12–e15. – DOI: 10.1086/653608.

225. McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview / K. M. McKinnon // *Current Protocols in Immunology*. – 2018. – Vol. 120. – Art. 5.1.1–5.1.11. – DOI: 10.1002/cpim.40.

226. Montante, S. Flow cytometry data analysis: recent tools and algorithms / S. Montante, R. R. Brinkman // *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2019. – Vol. 41, Suppl. 1. – P. 56–62. – DOI: 10.1111/ijlh.13016.

227. Moosazadeh, M. Epidemiological and clinical features of people with Malta fever in Iran: a systematic review and meta-analysis / M. Moosazadeh, R. Nikaen, G. Abedi [et al.] // *Journal of Research in Health Sciences*. – 2016. – Vol. 16, № 3. – P. 157–167.

228. Moreno-Lafont, M. C. Antigen-specific activation and proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from brucellosis patients / M. C. Moreno-Lafont, R. López-Santiago, E. Zumarán-Cuéllar [et al.] // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2002. – Vol. 96, № 3. – P. 340–347. – DOI: 10.1016/s0035-9203(02)90119-7.

229. Munsaka, S. M. Characteristics of activated monocyte phenotype support R5-tropic human immunodeficiency virus / S. M. Munsaka, M. Agsalda, D. Troelstrup [et al.] // *Immunology and Immunogenetics Insights*. – 2009. – Vol. 1. – P. 15–20. – DOI: 10.4137/iii.s2011.

230. Muraille, E. Revisiting the Th1/Th2 paradigm / E. Muraille, O. Leo // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 1998. – Vol. 47, № 1. – P. 1–9. – DOI: 10.1111/j.1365-3083.1998-47-1.00383.x.

231. Murphy, E. A. Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice / E. A. Murphy,

J. Sathiyaseelan, M. A. Parent [et al.] // *Immunology*. – 2001. – Vol. 103. – P. 511–518. – DOI: 10.1046/j.1365-2567.2001.01258.x.

232. Naghizadeh, M. Kinetics of activation marker expression after in vitro polyclonal stimulation of chicken peripheral T cells / M. Naghizadeh, N. Hatamzadeh, F. T. Larsen [et al.] // *Cytometry Part A*. – 2022. – Vol. 101, № 1. – P. 45–56. – DOI: 10.1002/cyto.a.24304.

233. Ning, G. Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to *Brucella abortus* / G. Ning, P. Jennings, Y. Guo, D. Yuan // *Innate Immunity*. – 2011. – Vol. 17, № 2. – P. 152–163. – DOI: 10.1177/1753425910367526.

234. O’Callaghan, D. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis* / D. O’Callaghan, C. Cazevieuille, A. Allardet-Servent [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 1999. – Vol. 33, № 6. – P. 1210–1220. – DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01569.x.

235. Oliveira, S. C. Update on the role of innate immune receptors during *Brucella abortus* infection / S. C. Oliveira, L. A. de Almeida, N. B. Carvalho [et al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2011. – Vol. 148, № 1–2. – P. 129–135. – DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.05.036.

236. Olsen, S. C. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years / S. C. Olsen, M. V. Palmer // *Veterinary Pathology*. – 2014. – Vol. 51, № 6. – P. 1076–1089. – DOI: 10.1177/0300985814540545.

237. Osoba, A. O. Diagnostic value of *Brucella* ELISA IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis / A. O. Osoba, H. Balkhy, Z. Memish [et al.] // *Journal of Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 13, Suppl. 1. – P. 54–59.

238. Pascual, D. W. Alternative strategies for vaccination to brucellosis / D. W. Pascual, X. Yang, H. Wang [et al.] // *Microbes and Infection*. – 2018. – Vol. 20, № 9–10. – P. 599–605. – DOI: 10.1016/j.micinf.2017.12.006.

239. Pasquevich, K. A. Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection / K.

A. Pasquevich, S. M. Estein, C. G. Samartino [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2009. – Vol. 77, № 1. – P. 436–445. – DOI: 10.1128/IAI.01151-08.

240. Pei, J. *Brucella* dissociation is essential for macrophage egress and bacterial dissemination / J. Pei, M. Kahl-McDonagh, T. A. Ficht // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2014. – Vol. 4. – Art. 23. – P. 1–9. – DOI: 10.3389/fcimb.2014.00023.

241. Pei, J. Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella* mutants is type IV secretion system dependent / J. Pei, Q. Wu, M. Kahl-McDonagh, T. A. Ficht // *Infection and Immunity*. – 2008. – Vol. 76, № 1. – P. 30–37. – DOI: 10.1128/IAI.00379-07.

242. Peng, Y. CD25: a potential tumor therapeutic target / Y. Peng, Y. Tao, Y. Zhang [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2022. – DOI: 10.1002/ijc.34281.

243. Pepper, M. Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells / M. Pepper, J. L. Linehan, A. J. Pagán [et al.] // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 83–89. – DOI: 10.1038/ni.1826.

244. Peter, M. E. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond / M. E. Peter, P. H. Krammer // *Cell Death and Differentiation*. – 2003. – Vol. 10. – P. 26–35. – DOI: 10.1038/sj.cdd.4401186.

245. Pizarro-Cerdá, J. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes / J. Pizarro-Cerdá, S. Méresse, R. G. Parton [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1998. – Vol. 66. – P. 5711–5724.

246. Poester, F. P. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock / F. P. Poester, L. E. Samartino, R. L. Santos // *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. – 2013. – Vol. 32, № 1. – P. 105–115.

247. Ponomarenko, D. G. Applicazione della tecnologia di stimolazione antigenica delle cellule per la diagnosi di brucellosis / D. G. Ponomarenko, E. L. Rakitina, O. V. Logvinenko [et al.] // *Italian Science Review*. – 2014. – № 1 (10). – P. 178–181.

248. Qie, C. Epidemiological and clinical characteristics of bacteremic brucellosis / C. Qie, J. Cui, Y. Liu [et al.] // Journal of International Medical Research. – 2020. – Vol. 48, № 7. – Art. 300060520936829. – DOI: 10.1177/0300060520936829.

249. Queipo-Ortuño, M. I. Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay with Serum and PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Whole Blood Samples for the Diagnosis of Human Brucellosis / M. I. Queipo-Ortuño, J. D. Colmenero, G. Baeza, P. Morata // Clinical Infectious Diseases. – 2005. – Vol. 40. – P. 260–264. – DOI: 10.1086/426818.

250. Qureshi, K. A. Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment – a comprehensive review / K. A. Qureshi, A. Parvez, N. A. Fahmy [et al.] // Annals of Medicine. – 2023. – Vol. 55, № 2. – P. 2295398. – DOI: 10.1080/07853890.2023.2295398.

251. Rafiei, A. Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease / A. Rafiei, S. K. Ardestani, A. Kariminia [et al.] // Journal of Infection. – 2006. – Vol. 53. – P. 315–324. – DOI: 10.1016/j.jinf.2005.11.024.

252. Rambow-Larsen, A. A. Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella / A. A. Rambow-Larsen, G. Rajashekara, E. Petersen, G. Splitter // Journal of Bacteriology. – 2008. – Vol. 190, № 9. – P. 3274–3282. – DOI: 10.1128/JB.01915-07.

253. Rodriguez-Zapata, M. Human brucellosis is characterized by an intense Th1 profile associated with a defective monocyte function / M. Rodriguez-Zapata, M. J. Matías, A. Prieto [et al.] // Infection and Immunity. – 2010. – Vol. 78. – P. 3272–3279. – DOI: 10.1128/IAI.01385-09.

254. Rogozynski, N. P. The Th1/Th2 paradigm: a misrepresentation of helper T cell plasticity / N. P. Rogozynski, B. Dixon // Immunology Letters. – 2024. – Vol. 268. – Art. 106870. – DOI: 10.1016/j.imlet.2024.106870.

255. Saito, S. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia / S, Saito,

M. Sakai, Y. Sasaki [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. – 1999. – Vol. 117. – P. 550–555. – DOI: 10.1046/j.1365-2249.1999.00997.x.

256. Salerno-Goncalves, R. Generation of heterogeneous memory T cells by live attenuated tularemia vaccine in humans / R. Salerno-Goncalves, M. J. Hepburn, S. Bavari, M. B. Sztein // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 28. – P. 195–206. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.09.100.

257. Saunders, B. M. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis / B. M. Saunders, W. J. Britton // *Immunology and Cell Biology*. – 2007. – Vol. 85. – P. 103–111. – DOI: 10.1038/sj.icb.7100027.

258. Sauret, J. M. Human brucellosis / J. M. Sauret, N. Vilissova // *Journal of the American Board of Family Medicine*. – 2002. – Vol. 15, № 5. – P. 401–406.

259. Shaw, C. A. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cells respond to antigens fused to anthrax lethal toxin / C. A. Shaw, M. N. Starnbach // *Infection and Immunity*. – 2008. – Vol. 76, № 6. – P. 2603–2611. – DOI: 10.1128/IAI.01718-07.

260. Shevach, E. Control of T cell activation by CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells / E. Shevach, R. S. McHugh, C. A. Piccirillo, A. M. Thornton // *Immunological Reviews*. – 2001. – Vol. 182. – P. 58–67. – DOI: 10.1034/j.1600-065x.2001.1820104.x.

261. Shipkova, M. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation / M. Shipkova, E. Wieland // *Clinica Chimica Acta*. – 2012. – Vol. 413. – P. 1338–1349. – DOI: 10.1016/j.cca.2011.11.006.

262. Skendros, P. Immunity to brucellosis / P. Skendros, P. Boura // *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*. – 2013. – Vol. 32, № 1. – P. 137–147.

263. Skendros, P. Diminished percentage of CD4⁺ T-lymphocytes expressing interleukin-2 receptor alpha in chronic brucellosis / P. Skendros, P. Boura, D. Chrisagis, M. Raptopoulou-Gigi // *Journal of Infection*. – 2007. – Vol. 54. – P. 192–197. – DOI: 10.1016/j.jinf.2006.04.001.

264. Smith, J. A. Brucella lipopolysaccharide and pathogenicity: the core of the matter / J. A. Smith // *Virulence*. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 379–382. – DOI: 10.1080/21505594.2017.1395544.

265. Spera, J. M. *Brucella* alters the immune response in a *prpA*-dependent manner / J. M. Spera, D. J. Comerci, J. E. Ugalde // *Microbial Pathogenesis*. – 2014. – Vol. 75. – P. 8–13. – DOI: 10.1016/j.micpath.2014.01.003.

266. Spera, J. M. A B lymphocyte mitogen is a *Brucella abortus* virulence factor required for persistent infection / J. M. Spera, J. E. Ugalde, J. Mucci [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103. – P. 16514–16519. – DOI: 10.1073/pnas.0603362103.

267. Starr, T. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment / T. Starr, T. W. Ng, T. D. Wehrly [et al.] // *Traffic*. – 2008. – Vol. 9. – P. 678–694. – DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00718.x.

268. Starr, T. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle / T. Starr, R. Child, T. D. Wehrly [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2012. – Vol. 11. – P. 33–45. – DOI: 10.1016/j.chom.2011.12.002.

269. Stevens, M. G. Effects of gamma-interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice / M. G. Stevens, G. W. Pugh, L. B. Tabatabai // *Infection and Immunity*. – 1992. – Vol. 60. – P. 4407–4409.

270. Svetic, A. *Brucella abortus* induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN- γ in CD4⁺ T cells / A. Svetic, Y. C. Jian, P. Lu [et al.] // *International Immunology*. – 1993. – Vol. 5. – P. 877–883. – DOI: 10.1093/intimm/5.8.877.

271. Szopa, I. M. Effective activation and expansion of canine lymphocytes using a novel nano-sized magnetic beads approach / I. M. Szopa, M. Granica, J. K. Bujak [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 604066. – DOI: 10.3389/fimmu.2021.604066.

272. Tomayko, M. M. What B cell memories are made of. / M. M. Tomayko, D. Allman // *Curr Opin Immunol*. – 2019. – Vol. 57. – P. 58–64. – DOI: 10.1016/j.coi.2019.01.003.

273. Velikovskiy, C. A. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice / C. A. Velikovskiy, J.

Cassataro, G. H. Giambartolomei [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2002. – Vol. 70. – P. 2507–2511. – DOI: 10.1128/IAI.70.5.2507-2511.2002.

274. Vitry, M. A. Crucial role of gamma interferon-producing CD4⁺ Th1 cells but dispensable function of CD8⁺ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice / M. A. Vitry, C. de Trez, S. Goriely [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2012. – Vol. 80, № 12. – P. 4271–4280. – DOI: 10.1128/IAI.00761-12.

275. Wang, Y. Single-cell landscape revealed immune characteristics associated with disease phases in brucellosis patients / Y. Wang, S. Yang, B. Han [et al.] // *iMeta*. – 2024. – Vol. 3, № 4. – Art. e226. – DOI: 10.1002/imt2.226.

276. Wattam, A. R. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource / A. R. Wattam, D. Abraham, O. Dalay [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, № D1. – P. D581–D591. – DOI: 10.1093/nar/gkt1099.

277. Xavier, M. N. Pathogenesis of *Brucella* spp. / M. N. Xavier, T. A. Paixão, A. B. den Hartigh, R. M. Tsolis // *The Open Veterinary Science Journal*. – 2010. – Vol. 4. – P. 109–118.

278. Xavier, M. N. CD4⁺ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function / M. N. Xavier, M. G. Winter, A. M. Spees [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2013. – Vol. 9, № 6. – Art. e1003454. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1003454.

279. Xia, M. A. A subset of protective $\gamma\delta$ 2 T cells is activated by novel mycobacterial glycolipid components / M. A. Xia, D. C. Hesser, P. De [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2016. – Vol. 84, № 9. – P. 2449–2462. – DOI: 10.1128/IAI.01322-15.

280. Xiang, Z. PHIDIAS: a pathogen-host interaction data integration and analysis system / Z. Xiang, Y. Tian, Y. He // *Genome Biology*. — 2007. — Vol. 8, № 7. — P. R150. — DOI: 10.1186/gb-2007-8-7-r150.

281. Xiang, Z. BBP: *Brucella* genome annotation with literature mining and curation / Z. Xiang, W. Zheng, Y. He // *BMC Bioinformatics*. – 2006. – Vol. 7. – Art. 347. – DOI: 10.1186/1471-2105-7-347.

282. Xu, J. Raman Flow Cytometry and Its Biomedical Application / J. Xu, H. Chen, C. Wang, Y. Ma, Y. Song // *Biosensors*. – 2024. – Vol. 14, № 4. – Art. 171. – DOI: 10.3390/bios14040171.
283. Xu, X. Structural understanding of T cell receptor triggering / X. Xu, H. Li, C. Xu // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2020. – Vol. 17, № 3. – P. 193–202. – DOI: 10.1038/s41423-020-0367-1.
284. Yagupsky, P. Detection of brucellae in blood cultures / P. Yagupsky // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1999. – Vol. 37, № 11. – P. 3437–3442. – DOI: 10.1128/JCM.37.11.3437-3442.1999.
285. Yingst, S. T cell immunity to brucellosis / S. Yingst, D. L. Hoover // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2003. – Vol. 29, № 4 – P. 313–331. – DOI: 10.1080/713608012.
286. Yman, L. Allergen assay and extract potency estimation / L. Yman // *nt Arch Allergy Appl Immunol*. – 1975. – Vol. 49. – P. 55–62.
287. Yoshino, T. Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes / T. Yoshino, E. Kondo, L. Cao [et al.] // *Blood*. – 1994. – Vol. 83, № 7. – P. 1856–1861.
288. Young, E. J. An overview of human brucellosis / E. J. Young // *Clinical Infectious Diseases*. – 1995. – Vol. 21. – P. 283–289. – DOI: 10.1093/clinids/21.2.283.
289. Young, E. J. Brucellosis: current epidemiology, diagnosis and management / E. J. Young // *Current Topics in Infectious Diseases*. – 1995. – Vol. 15. – P. 115–128.
290. Zeidi, M. Increased CD69⁺CCR7⁺ circulating activated T cells and STAT3 expression in cutaneous lupus erythematosus patients recalcitrant to antimalarials / M. Zeidi, K. L. Chen, J. Patel [et al.] // *Lupus*. – 2022. – Vol. 31, № 4. – P. 472–481. – DOI: 10.1177/09612033221084093.

291. Zhan, Y. F. Endogenous gamma-interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection / Y. F. Zhan, C. Cheers // *Infection and Immunity*. – 1993. – Vol. 61, № 11. – P. 4899–4901. – DOI: 10.1128/iai.61.11.4899-4901.1993.

292. Zhan, Y. Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins / Y. Zhan, J. Yang, C. Cheers // *Infection and Immunity*. – 1993. – Vol. 61, № 7. – P. 2841–2847. – DOI: 10.1128/iai.61.7.2841-2847.1993.

293. Zhao, Q. Activated CD69⁺ T cells foster immune privilege by regulating IDO expression in tumor-associated macrophages / Q. Zhao, D. M. Kuang, Y. Wu [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 188, № 3. – P. 1117–1124. – DOI: 10.4049/jimmunol.1100164.

294. Zheng, R. A systematic review and meta-analysis of epidemiology and clinical manifestations of human brucellosis in China / R. Zheng, S. Xie, X. Lu [et al.] // *BioMed Research International*. – 2018. – Vol. 2018. – Art. 5712920. – DOI: 10.1155/2018/5712920.

295. Zheng, R. Meta-analysis of the changes of peripheral blood T cell subsets in patients with brucellosis / R. Zheng, S. Xie, S. Niyazi [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2018. – Vol. 2018. – Art. 23152. – DOI: 10.1155/2018/8439813.