

Иванов А.П.¹, Козлов В.Г.¹, Клеблеева Т.Д.¹, Иванова О.Е.^{1,2}, Киктенко А.В.¹

Система иммуноферментного анализа на основе специфических антител класса (IgY) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инактивированных полиовирусных вакцинах

¹ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН», ²ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН», Российская Федерация, 142782, г. Москва

Приводятся результаты конструирования первой российской системы иммуноферментного анализа (ИФА) для количественного определения D-антигена полиовирусов I–III типов в препаратах инактивированной полиовирусной вакцины (ИПВ). Впервые такого рода система основана на использовании специфических антител класса Y из яичных желтков иммунизированных кур. Показано, что данная система ИФА специфична, отличается достаточной чувствительностью и может использоваться для количественного определения D-антигена полиовирусов I–III типов в ИПВ.

Ключевые слова: полиовирусы; D-антиген; инактивированная полиовирусная вакцина; иммуноферментный анализ.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2014; 59(6): 39–42.*

An ELISA system based on the specific class Y (IgY) antibodies from egg yolks for the quantitative determination of D-antigen in inactivated poliovirus vaccines

Ivanov A. P.¹, Kozlov V. G.¹, Klebleeva T. D.¹, Ivanova O. E.^{1,2}, Kiktenko A. V.¹

¹FSUE on Manufacture of Bacterial and Viral Preparations, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement "Moskovskiy", 142782, Moscow, Russia; ²Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Settlement "Moskovskiy", 142782, Moscow, Russia

The results of the construction of the first Russian ELISA system for the quantitative determination of D-antigen of 1-3 poliovirus types in the preparations of inactivated poliovirus vaccines are presented. For the first time, this kind of system is based on the use of specific antibodies of class Y (IgY) from egg yolks of immunized hens. It was shown that this ELISA system is specific, sufficiently sensitive, and can be used for quantitative determination of D-antigen of 1-3 poliovirus types in inactivated poliovirus vaccines.

Key words: *poliovirus; D-antigen; inactivated poliovirus vaccine; ELISA.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2014; 59(6): 39–42. (in Russ.)*

Введение

Заключительный этап программы ВОЗ по глобальному искоренению полиомиелита предусматривает изменения в стратегии вакцинации: прекращение иммунизации с помощью оральной полиовирусной вакцины (ОПВ) и разработку более безопасных процессов изготовления инактивированных полиовирусных вакцин (ИПВ) и приемлемых стратегий их использования [1]. Известные недостатки ОПВ (в течение многих десятилетий «вакцина выбора» для достижения целей программы ВОЗ) – возникновение случаев вакциноассоциированного полиомиелита и возможность формирования вакцинородственных штаммов с повышенной нейровирулентностью и способностью к трансмиссии, делают неприемлемым ее использование для рутинной иммунизации на заключительном этапе выполнения программы. Новый стратегический план ВОЗ по искоренению полиомиелита предусматривает всемирное внедрение хотя бы одной дозы ИПВ, в последующем ИПВ будет основным средством профилактики полиомиелита [1].

Создание любого варианта ИПВ (на основе «диких», аттенуированных, генетически модифицированных и т. д.

штаммов полиовирусов) неизбежно связано с разработкой метода количественного определения D-антигена (выражается в D-антигенных единицах, DU/ДАГ ЕД) – основного показателя потенциальной способности вакцины индуцировать защитный иммунитет (вируснейтрализующие антитела – АТ) у вакцинированных лиц. Ведущие производители коммерческих ИПВ (например, Sanofi Pasteur, Франция; GlaxoSmithKline, Великобритания) для количественного определения D-антигена используют различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА) собственной разработки. Эти системы ИФА основаны на специфических поликлональных АТ млекопитающих, в частности кроликов [2]. Однако известно, что использование АТ млекопитающих (кролики) для систем ИФА сопряжено с рядом негативных моментов, прежде всего с возможностью неспецифических взаимодействий данных АТ с другими компонентами ИФА (вторичные АТ, ферментный конъюгат), что выражается в высоком неспецифическом фоне и получении ложноположительных результатов анализа [3, 4]. Исходя из этого, в данном сообщении мы представляем результаты разработки первой отечественной системы ИФА для количественного определения D-антигена полио-

Для корреспонденции: Иванов Александр Петрович, д-р мед. наук, рук. научно-технологического отделения, e-mail: ivanovalexander1@gmail.com

Correspondence to: Aleksander Ivanov, MD, PhD, DSc, Head of Science and Technology Department, e-mail: ivanovalexander1@gmail.com

вирусов, основанной на использовании специфических АТ класса Y (IgY) яичных желтков («IgY-технология») [4].

Материалы и методы

Иммунные препараты.

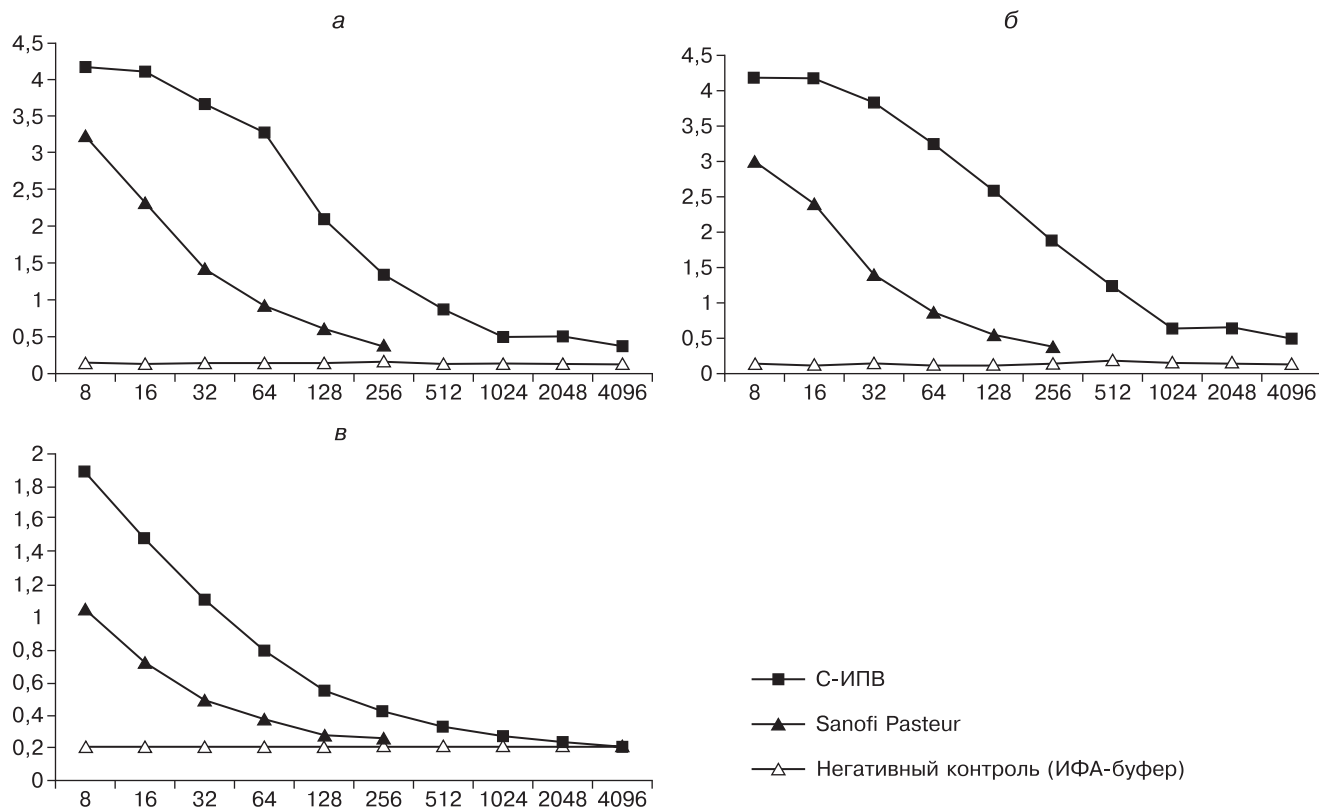
Несущихся куриц породы Леггорн (4–6-месячного возраста) иммунизировали 3 раза с интервалом в 2 нед по 1 мл антигена, который представлял собой в 10 раз сконцентрированную полную (типы I–III «дикого» полиовируса) коммерческую инактивированную полиовирусную вакцину производства Sanofi Pasteur (Франция), в 4 точки пекторальных мышц без адьюванта [5, 6]. Отложенные яйца маркировали и хранили при температуре 4°C, либо выделяли желтки и хранили их при -20°C. Препараты IgY (из желтков, полученных через 2 нед после 3-й иммунизации) получали высаливанием сульфатом натрия (Na₂SO₄) по методу E. Akita и соавт. [7] с последующей аффинной очисткой на колонке HiTrap (Amersham) согласно инструкции производителя. Концентрацию тотального IgY определяли при 280 нм. Препараты IgY стерилизовали фильтрацией (фильтры с диаметром пор 0,45 мкм), хранили при 4°C и использовали в ИФА как универсальный иммуносорбент (против типов I–III полиовируса).

Для получения моноспецифических иммунных сывороток против полиовирусов использовали рандомбредных кроликов породы Шиншилла (масса 2,5–3 кг, возраст 3 мес). Вирусосодержащие осветленные культуральные жидкости клеток RD, инфицированные «дикими» полиовирусами I типа (Mahoney), либо типа II (MEF-1), либо III типа (Saukett) с титром 8 lg ТЦД/1 мл вводили по следующей схеме. Первая иммунизация: 5 мл вируса внутривенно (в/в) и 5 мл вируса + 5 мл адьюванта (вазелиново-ланолиновая эмульсия) внутримышечно. Через 3 нед 2-я иммунизация: 10 мл вируса в/в без адью-

ванта; затем 3-я–6-я иммунизация в/в по 10 мл без адьюванта (интервал между 2-й и 3-й – 3 нед, между 3-й и 4-й – 2 нед, между 4, 5 и 6-й – 5 нед. Через 7 дней после 6-й иммунизации производили забор крови. Аффинно-очищенные препараты IgG из сывороток получали на колонке HiTrap Protein A (Amersham) согласно инструкции производителя. Концентрацию тотального IgG определяли при 280 нм. Препараты IgG стерилизовали фильтрацией (фильтры с диаметром пор 0,45 мкм), хранили при 4°C и использовали в ИФА в качестве вторичных (детекторных) АТ для каждого типа полиовируса.

Специфическую активность (авидность) очищенных IgY из желтков и IgG из сывороток кроликов определяли в реакции микронейтрализации (РН) против стандартных препаратов полиовирусов Сэбин типов I–III (препараты получены из Национального института биологических стандартов и контроля – NIBSC, Великобритания) на культуре клеток HEp-2 согласно рекомендациям ВОЗ [8].

Система ИФА для количественного определения D-антигена полиовирусов. Иммунопанели Costar (кат. № 9018) сенсibilизировали 18 ч при 4°C аффинно-очищенным IgY против трех типов «диких» полиовирусов (поливалентный иммуносорбент) в концентрации 20 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6 (Sigma, кат. № C3041-100 CAP). После 3-кратной отмывки 0,05% Tween-20 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и блокирования свободных сайтов 1% сывороткой телянка (Gibco) в ФСБ в течение 1 ч при 37°C и 3-кратной отмывки вносили анализируемые препараты D-антигена: ИПВ Sanofi Pasteur (в качестве референс-образца), экспериментальные серии ИПВ на основе штаммов Сэбина (разработка ФГУП «ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН»). Препараты D-антигена разводили, начиная с 1:4–1:8 в ИФА-буфере (1% сыворотка телянка в ФСБ с 0,05% Tween-20). Негативный контроль – ИФА-буфер. После



ИФА: результаты титрования D-антигена в экспериментальной серии С-ИПВ и коммерческой ИПВ Sanofi Pasteur.

а – I тип; б – II тип; в – III тип.

По оси абсцисс – разведение (обратные величины; по оси ординат – ОП (450 нм).

Результаты контроля специфичности ИФА методом «блока» при определении содержания D-антигена полиовируса в коммерческой ИПВ Sanofi Pasteur

Тип	Разведение типоспецифической "блокирующей"/неиммунной сыворотки (обратные величины)					
	10	20	40	80	160	320
I	1,337*/0,344**	1,342/0,359	1,338/0,370	1,357/0,421	1,345/0,529	1,332/0,607
II	0,934/0,203	0,929/0,254	0,931/0,366	0,936/0,510	0,926/0,629	0,948/0,814
III	0,903/0,435	0,889/0,499	0,881/0,610	0,896/0,766	0,891/0,763	0,893/0,814

Примечание. * – оптическая плотность (450 нм) образца D-антигена в разведении 1:10 при инкубации с разведениями: * – неиммунной сыворотки, ** – типоспецифической.

инкубации в течение 2 ч при 37°C (или 18 ч при 4°C) и 5-кратной отмывки вносили вторичные АТ: аффинно-очищенные препараты IgG кролика против соответствующего типа полиовируса в ИФА-буфере в рабочем разведении, подобранным шахматным титрованием. После инкубации в течение 1 ч при 37°C и 5-кратной отмывки вносили пероксидазный конъюгат против IgG кролика (Sigma, кат. № A1949-1VL) в ИФА-буфере в рабочем разведении. Инкубировали 1 ч при 37°C, отмывали 5 раз и вносили готовый субстрат ТМВ (Sigma, кат. № T0440-100 мл). Инкубировали в течение 30 мин в темноте, реакцию останавливали 1 М серной кислотой. Объем вносимых ингредиентов 0,1 мл. Оптическую плотность (ОП) измеряли при 450 нм (Thermo Scientific Multiscan FC ELISA reader, Thermo LabSystems). Результат (титр D-антигена) считали положительным при значении P/N (ОП опыта/ОП контроля) $\geq 2,1$ [9]. Количество D-антигена (DU/ml, ДАГ ЕД/мл) рассчитывали по титру или по отношению к ОП референс-образца (приблизительно). Для точного подсчета используют «метод параллельных линий» (PLA), для которого, однако, необходим референс-образец с максимально достоверным количеством D-антигена [2].

Система ИФА для контроля специфичности определения содержания D-антигена ("блок" ИФА) Данная система повторяет вышеописанную за исключением фазы "блока" – после инкубации с исследуемым образцом D-антигена вносили по 0,1 мл разведений сыворотки (в ИФА-буфере, начиная с 1:10), содержащей АТ к соответствующему типу полиовируса (например, сыворотка мыши), инкубировали 1 ч при 37°C, отмывали 5 раз; дальнейшие процедуры – инкубация с вторичными АТ, конъюгатом и т. д., проводили согласно вышеописанному. В контрольные лунки вносили сыворотку неиммунной мыши в ИФА-буфере в аналогичных разведениях. Результат считали положительным, если ОП лунок с D-антигеном после инкубации со специфической сывороткой снижалась на $\geq 50\%$ по сравнению с таковой неиммунной сыворотки [10], подтверждая специфичность связи D-антигена с иммуносорбентом (IgY) и вторичными АТ (типоспецифическими IgG кролика).

Результаты

Специфическая активность (авидность) иммунных препаратов в реакции нейтрализации против штаммов Сэбина (титры вируснейтрализующих АТ). Препарат IgY (поливалентный иммуносорбент): I тип – 1:2371; II тип – 1: 3350; III тип – 1: 355. Препараты IgG кроликов (вторичные АТ): I тип – 1: 1412; II тип – 1: 708; III тип – 1: 596.

На рисунке представлены результаты параллельного титрования D-антигена полиовируса трех типов: в коммерческой ИПВ Sanofi Pasteur (смесь I–III типов) и в экспериментальной серии ИПВ на основе штаммов Сэбина (раздельно 1, 2 и 3 типы). ОП (450 нм) негативного контроля (ИФА-буфер) составляет 0,1–0,2 оптической единицы (низкий фоновый сигнал), что достоверно ниже ОП ис-

следуемых образцов D-антигена. Титры D-антигена ИПВ Sanofi Pasteur: $\geq 1:256$ для I и II типов и 1: 64 для III типа. Титры D-антигена для экспериментальной серии ИПВ на основе штаммов Сэбина: $\geq 1:4096$ для I и II типов и 1:256 для III типа. В таблице представлены результаты проверки специфичности определения содержания D-антигена в коммерческой ИПВ Sanofi Pasteur (метод "блока" ИФА). Тест специфичен, поскольку в результате инкубации с "блокирующими" специфическими сыворотками мышей

ОП снижается на $\geq 50\%$ по сравнению с таковой при инкубации с неиммунной сывороткой мыши. При этом титр «блокирующей» сыворотки для I типа равен 1: 320 (снижение ОП на 58%), для II типа – 1:80 (снижение ОП на 50%), и для III типа – 1:10 (снижение ОП на 54%).

Обсуждение

Представленная система ИФА для количественного определения D-антигена полиовирусов является первой отечественной системой такого рода (до настоящего времени определение содержания D-антигена для практики вакцинологии в России было просто не востребовано в связи с исключительным применением ОПВ). Использование «IgY-технологии» отвечает современным тенденциям конструирования диагностических систем и доказанным преимуществами АТ класса Y [3, 4]. Ранее мы сообщали о получении препаратов IgY из куриных желтков в качестве иммунных реагентов к вирусу клещевого энцефалита [5], данное сообщение подтверждает эффективность использования АТ птиц для конструирования систем ИФА, предназначенных для определения вирусных антигенов. Приготовление поливалентного иммуносорбента для связывания D-антигена полиовирусов трех типов – достаточно простая процедура: три иммунизации куриц (без адьюванта), обеспечивающие высокий выход IgY (не ниже 10 мг/мл в очищенном препарате одного желтка; специфический IgY составляет примерно 10% общего белка [4]). Отсутствие (на уровне ИФА) перекрестных реакций между D-антигенами полиовируса трех типов оправдывает использование поливалентного иммуносорбента и упрощает конструирование системы ИФА.

При оценке специфической активности иммунных препаратов для конструирования системы ИФА такого рода следует ориентироваться прежде всего на данные функционального теста (реакция нейтрализации), а не на результаты стандартного варианта ИФА для определения содержания АТ, поскольку для полиовирусов корреляция между уровнем РН-титров и титров ИФА низка [10]. Исключение составляют специальные варианты ИФА (например, вариант «Binding Inhibition», симулирующий РН [10]). Представленные в «Результатах» данные по специфической активности иммуносорбента и вторичных IgG (титры вируснейтрализующих АТ) свидетельствуют о том, что данные уровни титров позволяют конструировать систему ИФА с чувствительностью примерно 0,3 ДАГ ЕД/мл, что более чем достаточно для систем такого рода.

Таким образом, представленная система ИФА может использоваться для количественного определения D-антигена в процессе изготовления ИПВ. Система специфична, демонстрирует низкий уровень фона в негативном контроле и четкий специфический сигнал.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Polio Eradication and Endgame Strategic Plan (2013-2018). Available at: <http://www.polioeradication.org/ResourceLibrary/Strategyandwork.aspx>.

2. Simizu B., Abe S., Yamamoto H. et al. Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. *Biologicals*. 2006; 34:151–4.
3. Naak-Frendscho M. Why IgY? Chicken polyclonal antibody, an appealing alternative. *Promega Notes Magazine*. 1994; 46: 11–4.
4. Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ATLA*. 2005; 33:129–54.
5. Ivanov A.P., Vargin V.V. Preparations of IgY from chicken yolk as immune reagents to tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 2010; 2: 46–8. (in Russian)
[Иванов А.П., Варгин В.В. Препараты IgY из куриного желтка как иммунные реагенты к вирусу клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2010; 2: 46–8].
6. Chao-Yang Fu, He Huang, Xiao-Mei Wang et al. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized chickens. *J. Virol. Meth.* 2006; 133: 112–5.
7. Akita E.M., Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Meth.* 1993; 160: 207–14.
8. World Health Organization (WHO). *Manual for the virological investigation of polio [WHO/EPI/GEN97.01]*. Geneva: WHO;1997.
9. Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Tkachenko E.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of arenaviruses. *Arch. Virol.* 1981; 67: 71–4.
10. Ivanov A.P., Dragunsky E.M., Ivanova O.E. et al. Poliovirus-Binding Inhibition ELISA for Evaluation of Immune Response to Oral Poliovirus Vaccine. *Hum. Vaccines*. 2005; 1: 102–05.

Поступила 18.04.13

Received 18.04.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.98:578.833.28]-036.2:613.1(470.45)

Сафронов В.А.¹, Смоленский В.Ю.², Смелянский В.П.³, Савченко С.Т.⁴, Раздорский А.С.¹, Топорков В.П.¹

Оценка динамики эпидемических проявлений лихорадки Западного Нила в Волгоградской области в зависимости от климатических условий, предшествующих началу эпидемического сезона

¹ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 410005, г. Саратов; ²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, г. Москва; ³ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора 400131, г. Волгоград; ⁴ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области, 400049, г. Волгоград.

Приведены результаты анализа эпидемических подъемов лихорадки Западного Нила и климатических условий в Волгоградской области. Выявлены определенные сезонные периоды и пороговые значения температуры и влажности, статистически связанные со вспышечной заболеваемостью в регионе. Обсуждаются вероятные механизмы и методы количественной оценки опосредованного влияния атмосферного тепла на элементы эпидемического процесса.

Ключевые слова: *Волгоградская область; лихорадка Западного Нила; эпидемиологический анализ; прогноз; климатические условия.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2014; 59(6): 42–46.*

Assessment of epidemic manifestations of the West Nile fever in the Volgograd region depending on the climatic conditions

Safronov V. A.¹, Smolenskij V. Ju.², Smeljanskiy V. P.³, Savchenko S. T.⁴, Razdorskij A. S.¹, Toporkov V. P.¹

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 410005, Saratov, Russia; ²Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 127994, Moscow, Russia; ³Volgograd Anti-Plague Institute, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 400131, Volgograd, Russia; ⁴Center for Hygiene and Epidemiology of the Volgograd Region, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 400049, Moscow, Russia

Results of the analysis of the increase in the incidence of epidemic of the West Nile fever and climate conditions in the Volgograd region were presented. Certain seasonal periods and threshold values of temperature and humidity statistically associated with the epidemic rise were identified. The discussion of the probable mechanisms of indirect effects of atmospheric heat on the elements of the epidemic process was carried out.

Key words: *Volgograd region; West Nile fever; epidemiological analysis; forecast; climatic determinants.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2014; 59(6): 42–46. (In Russ.)*

С момента первого обнаружения вируса Западного Нила (ВЗН) в 1937 г. (Уганда, Африка) произошло значительное распространение вызываемой им лихорадки на страны тропической Африки, Азии, Америки и Европы, включая южные регионы европейской части России. В настоящее время наблюдается рост количества пораженных терри-

торий с захватом регионов Приволжского и Центрального федеральных округов, в которых ранее заболеваемости не отмечалось [1]. Учитывая, что вспышки лихорадки Западного Нила (ЛЗН) затрагивают сотни человек, а летальность достигает 15%, можно констатировать, что среди природно-очаговых инфекционных болезней в совре-

Для корреспонденции: Сафронов Валентин Алексеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., e-mail: neuromail@rambler.ru
Correspondence to: Valentin Safronov. PhD. Senior Research Fellow, e-mail: neuromail@rambler.ru