



Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций

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

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия

Введение. Известные преимущества антител класса Y (IgY) из яичных желтков иммунизированных кур в сравнении с антителами класса G (IgG) лабораторных животных, традиционно используемых в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний, определяют стабильный интерес исследователей к использованию для этих целей IgY (IgY-технологии). За последние 20 лет очевидные преимущества IgY-технологии были продемонстрированы для целого ряда вирусных и бактериальных инфекций.

Цели и задачи. Конструирование систем иммуноферментного анализа (ИФА) на основе специфических IgY для лабораторной диагностики инфекций, вызываемых вирусами клещевого энцефалита, жёлтой лихорадки и полиовирусом.

Материал и методы. Получение препаратов желтков иммунизированных кур, приготовление высокоочищенных препаратов IgY (высаливание, аффинная хроматография), конструирование систем ИФА для определения вирусспецифических антигенов, отработка параметров систем ИФА.

Результаты и обсуждение. Впервые в лабораторной практике были сконструированы системы ИФА, основанные на использовании поликлональных специфических IgY, для лабораторной диагностики актуальных вирусных инфекций человека, вызываемых флавивирусами и энтеровирусами: определены антигены вирусов клещевого энцефалита, жёлтой лихорадки, трёх типов полиовируса. Экспериментально показано, что данные системы ИФА обладают высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет использовать их для полуквантитативного и количественного определения антигенов указанных вирусов в различных материалах (инфицированных клеточных культурах, вакцинных препаратах и т.д.).

Заключение. Разработанные на основе специфических IgY системы ИФА для определения вирусных антигенов могут эффективно использоваться для лабораторной диагностики ряда вирусных инфекций, для валидации и контроля вакцинных препаратов.

Ключевые слова: IgY-технология; иммуноферментный анализ; антигены; вирус клещевого энцефалита; вирус жёлтой лихорадки; полиовирусы; вакцины.

Для цитирования: Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е. Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 21-26.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-21-26>

Для корреспонденции: Иванов Александр Петрович, д-р мед. наук, технолог 1 категории, отдел разработки и внедрения инновационных технологий ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва. E-mail: ivanovalexander1@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция, эксперименты, анализ данных, написание статьи – Иванов А.П.; экспериментальная часть – Клеблеева Т.Д.; анализ данных, написание и редактирование текста – Иванова О.Е.

Поступила 22.01.20

Принята в печать 29.01.20

Experience of application of IgY-technology for laboratory diagnostics of viral infections

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

¹ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819, Russia;

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russia

Introduction. The well-known advantages of class Y antibodies (IgY) from egg yolks of immunized hens in comparison with class G antibodies (IgG) of laboratory animals traditionally used in laboratory diagnosis of infectious diseases determine the stable interest of researchers in using IgY for these purposes (IgY technology). Over the past 20 years, the obvious benefits of IgY technology have been demonstrated for a number of viral and bacterial infections.

Goals and objectives. Construction of ELISA systems based on specific IgY for laboratory diagnosis of infections caused by tick-borne encephalitis virus, yellow fever virus, poliovirus.

Material and methods. Obtaining yolk preparations of immunized chickens, obtaining highly purified IgY preparations (salting out, affinity chromatography), constructing ELISA systems for determining virus-specific antigens, testing the parameters of ELISA systems.

Results and discussion. For the first time in laboratory practice, ELISA systems based on the use of specific polyclonal IgY were designed for laboratory diagnosis of topical human viral infections caused by flaviviruses and enteroviruses: determination of antigens of tick-borne encephalitis virus, yellow fever virus, 3 types of poliovirus.

It was experimentally shown that these ELISA systems have high sensitivity and specificity, which allows them to be used for the semiquantitative and quantitative determination of antigens of these viruses in various materials (infected cell cultures, vaccines, etc.).

Conclusion. The ELISA systems developed on the basis of specific IgY for determination of viral antigens can be effectively used for laboratory diagnosis of a number of viral infections, for the validation and control of vaccine preparations.

Keywords: *IgY-technology; ELISA; antigens, tick-borne encephalitis virus, yellow fever virus, polioviruses, vaccines.*

For citation: Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Ivanova O.E. Experience of application of IgY-technology for laboratory diagnostics of viral infections. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 21-26. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-21-26>

For correspondence: Alexander P. Ivanov, Dr. Sci. Med., 1st category technologist, Department for the development and implementation of innovative technologies, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences. Moscow, 108819, Russia. E-mail: ivanovalexander1@gmail.com

Information about authors:

Ivanov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-4576-7136>

Klebleeva T.D., <http://orcid.org/0000-0003-4288-6818>

Ivanova O.E., <http://orcid.org/0000-0003-1784-4827>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Contribution: concept, experiments, data analysis, writing - Ivanov A.P.; experimental part - Klebleeva T.D.; data analysis, writing, editing - Ivanova O.E.

Received 22 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

В 1893 г. F. Klemperer впервые экспериментально доказал, что иммунизация кур определённым антигеном (в данном случае – столбнячным токсином) приводит к переносу специфических антител в яичный желток [1]. В течение длительного времени это открытие не находило применения в биомедицинских исследованиях, однако этические проблемы экспериментов с лабораторными животными требовали поисков более гуманных подходов. В 1959 г. W. Russell и R. Burch опубликовали принципы гуманной экспериментальной техники [1], и в течение последующих лет многие исследователи пришли к пониманию важности открытия F. Klemperer. В 1996 г. Европейский центр по оценке альтернативных методов (ECVAM) рекомендовал использование антител класса Y (IgY) вместо антител класса G (IgG) млекопитающих как альтернативный подход к исследовательской практике [2], а в 1999 г. IgY-технология была одобрена, например, министерством ветеринарии правительства Швейцарии [1].

Молекулярная структура IgY птиц хорошо изучена и в целом аналогична структуре IgG млекопитающих (IgY птиц – филогенетический предшественник IgG млекопитающих): как и IgG, IgY состоит из двух лёгких и двух тяжёлых цепей. Тяжёлая цепь IgY представлена одним варибельным и четырьмя константными доменами, в отличие от IgG, имеющего три константных домена. Молекулярная масса IgY определена в 167 200 Да (IgG – 160 000 Да) [1]. Несмотря на принципиальное сходство двух аналогов (IgG млекопитающих и IgY), IgY обладает рядом преимуществ, особенно ценных для его использования в диагностических целях (в качестве иммунного реагента): 1) высокая иммунореактивность птиц по отношению к чужеродным белкам инфекционного происхождения (вирусным, бактериальным, паразитарным), а также к белкам токсинов и ядов; 2) низкая

перекрёстная реактивность с белками млекопитающих за счёт большой филогенетической дистанции между птицами и млекопитающими: неспособность IgY активировать систему комплемента млекопитающих и связываться с ревматоидным фактором, Fc-рецепторами обеспечивает низкий уровень неспецифических реакций; 3) феноменально высокое содержание IgY в желтке, т. е. возможность получения IgY в препаративных количествах – из одного яйца можно получить 50–100 мг тотального IgY и до 10% от этой суммы – специфического IgY, что соответствует величине IgG, полученного из сыворотки 50–100 мышей (учитывая тот факт, что курица кладёт одно яйцо в 1–2 дня, общее количество IgY за полный цикл иммунизации может достигать десятков граммов); 4) дешевизна и лёгкость процедуры иммунизации кур, а также принципиальная простота получения препаратов IgY из желтка [1–3].

Целью данного исследования было экспериментальное доказательство эффективности использования IgY-технологии при разработке систем иммуноферментного анализа (ИФА) для лабораторной диагностики актуальных вирусных инфекций человека, вызываемых флавивирусами и энтеровирусами: определение антигенов вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ), жёлтой лихорадки (ВЖЛ), трёх типов полиовируса. Такого рода исследования ранее не проводили [1].

Материал и методы

Получение препаратов IgY. Несущихся кур породы Леггорн (4–6-месячного возраста) иммунизировали 3 раза с интервалом в 2 нед, вводя по 1 мл соответствующего антигена в 4 точки пекторальных мышц без адьюванта [4].

Антигены. Антиген ВКЭ, штамм Софьин, депозит № 116, представлял собой инактивированный формалином концентрат вирусосодержащей культуральной

жидкости инфицированных куриных фибробластов с исходным титром вируса 8 Ig БОЕ/мл; антиген ВЖЛ – инактивированный β -пропиолактоном концентрат культуральной жидкости клеток *Vero*, инфицированных ВЖЛ, штамм 17 D, с исходным титром 6,5 Ig БОЕ/мл; антигены полиовируса: вирусосодержащие осветлённые культуральные жидкости клеток RD, инфицированные «дикими» полиовирусами типа 1 (Mahoney), либо типа 2 (MEF-1), либо типа 3 (Saukett) с титром 8,0 Ig ТЦД/1 мл. Отложенные яйца маркировали и хранили при температуре +4 °С, либо выделяли желтки и хранили при -20 °С. Препараты IgY (из желтков, выделенных через 2 нед после 3-й иммунизации) получали высаливанием сульфатом натрия (Na_2SO_4) по методу E.M. Akita и S. Nakai [5] с последующей очисткой на аффинной колонке HiTrap (GE Healthcare, Швеция), согласно инструкции производителя. Концентрацию тотального IgY определяли при 280 нм. Специфическую активность полученных препаратов IgY определяли: для ВКЭ – собственным вариантом ИФА с использованием в качестве иммуносорбента очищенного белка Е ВКЭ [4]; для полиовирусов – в реакции микронейтрализации против стандартных препаратов «диких» полиовирусов типов 1, 2, 3 (препараты получены из Национального института биологических стандартов и контроля – NIBSC, Великобритания) на культуре клеток HEp-2, согласно протоколу ВОЗ [6]; для ВЖЛ – методом редукции числа бляшек [7]. Препараты IgY стерилизовали фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, хранили при -20 °С в присутствии 50% глицерина и использовали в ИФА в качестве иммуносорбента для определения антигенов соответствующих вирусов, а также метили биотином (IgY против полиовируса типов 1, 2, 3 и против ВЖЛ) и использовали в системах ИФА для определения соответствующих антигенов (IgY → исследуемый антиген → IgY + биотин → стрептавидин-пероксидазный конъюгат).

Биотинилирование IgY проводили, согласно методике, изложенной в руководстве E. Harlow и D. Lane [8]. Препараты IgY + биотин хранили при -20 °С в присутствии 50% глицерина.

Система ИФА для титрования препаратов IgY против ВКЭ. Титрование проводили по собственной методике, изложенной нами ранее [4]. Иммунопанели сенсibilизировали очищенным антигеном ВКЭ в концентрации белка Е 10 мкг/мл (предоставлен М.Ф. Воровичем, ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва), после блокирования свободных сайтов вносили анализируемый IgY в разведениях, начиная с 1 : 4, и параллельно – IgY, выделенный из преиммунного желтка (контроль), инкубировали, вносили коммерческий пероксидазный конъюгат против IgY курицы, инкубировали и затем вносили субстрат (ТМВ).

Система ИФА для определения антигенов ВКЭ, полиовируса типов 1, 2, 3 и ВЖЛ с использованием сенсibilизации твёрдой фазы соответствующим IgY и детекторной антисыворотки. Применяли собственную схему [9]: сенсibilизация твёрдой фазы

IgY против соответствующего антигена → исследуемый антиген → соответствующая детекторная антисыворотка (или иммунный асцит мышей) → коммерческий пероксидазный конъюгат против IgG детекторной сыворотки (иммунного асцита мышей).

Система ИФА для определения антигенов полиовируса типов 1, 2, 3 и ВЖЛ, полностью основанная на использовании соответствующего IgY (в качестве иммуносорбента и детекторных антител, меченных биотином). Иммунопанели Costar (кат. № 9018) сенсibilизировали 18 ч при +4 °С препаратом IgY против соответствующего антигена в концентрации 10–20 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 (Т-ФСБ) и блокирования свободных сайтов 1% сывороткой телёнка (Gibco) в ФСБ в течение 1 ч при +37 °С и 3-кратной отмывки вносили анализируемые антигены в разведениях в ИФА-буфере (1% сыворотка телёнка в ФСБ с 0,05% Tween-20). Негативный контроль антигена – ИФА-буфер. После инкубации в течение 2 ч при +37 °С (или 18 ч при +4 °С) и 5-кратной отмывки вносили соответствующие IgY, меченные биотином в ИФА-буфере в рабочем разведении, подобранном шахматным титрованием. После инкубации в течение 1 ч при +37 °С и 5-кратной отмывки вносили коммерческий стрептавидин-пероксидазный конъюгат (Sigma, кат. № S5512-1MG) в ИФА-буфере в рабочем разведении. Инкубировали 45 мин при +37 °С, отмывали 5 раз и вносили готовый субстрат ТМВ (Sigma, кат. № T0440-100 ml). Инкубировали в течение 30 мин в темноте, реакцию останавливали 2М серной кислотой. Объём вносимых ингредиентов – 0,1 мл (за исключением блокирующего раствора – 0,2 мл и серной кислоты – 0,05 мл). Оптическую плотность (ОП) измеряли при 450 нм (Thermo Scientific Multiskan FC ELISA reader, Thermo Labsystems, Финляндия). Результат считали положительным при значении P/N (ОП опыта/ОП контроля) $\geq 2,1$ [10]. Количество D-антигена рассчитывали по его титру или по отношению к ОП референс-образца (приблизительно). Для точного подсчёта используют метод параллельных линий, для которого необходим референс-образец с максимально достоверным количеством D-антигена.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты

На рисунке представлены результаты титрования в ИФА препарата IgY против ВКЭ (2 нед после трёх иммунизаций антигеном ВКЭ, концентрация тотального IgY 10 мг/мл). При низких значениях ($< 0,1$ о. е.) ОП контрольного образца (IgY из неиммунного желтка) анти-ВКЭ IgY демонстрирует выраженную специфичность с титром не менее 1 : 1,048576, что соответствует примерно 1 нг/мл специфического IgY (примерно 10% от тотального IgY).

Использование полученных препаратов анти-ВКЭ IgY в качестве иммуносорбента для ИФА в опытах

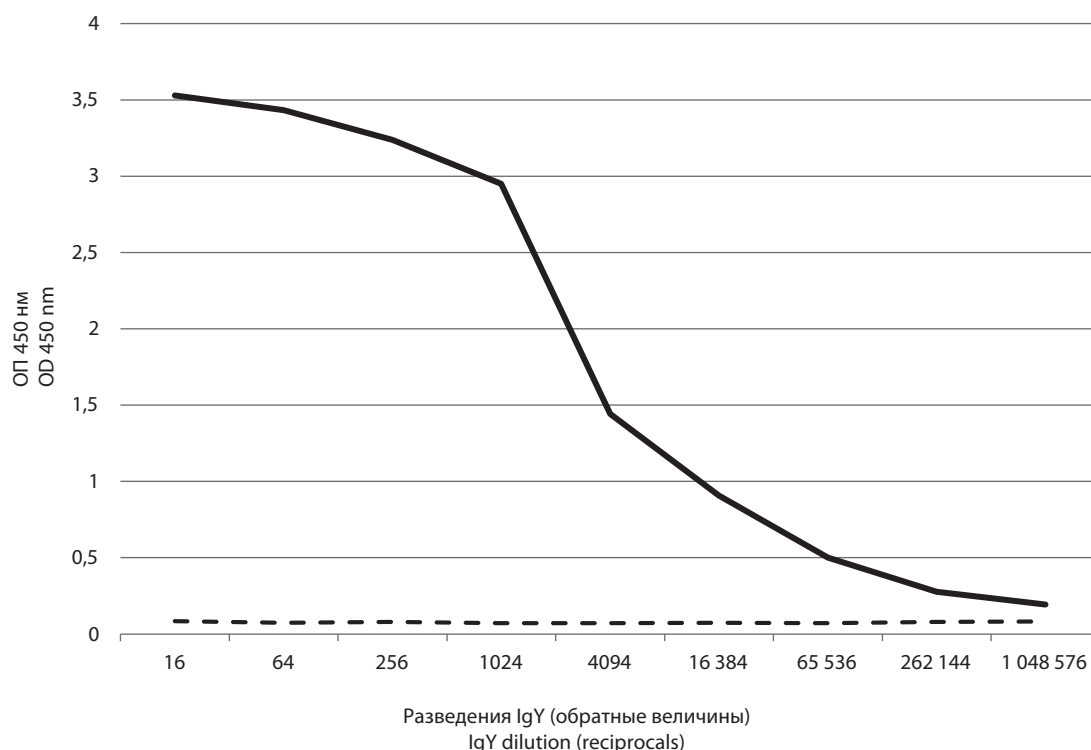
Таблица 1. Титрование D-антигена типов 1, 2, 3 в препарате инактивированной полиовирусной вакцины (С-ИПВ) на основе штаммов Сэбина в системе ИФА: сенсibilизация IgY → антиген → детекторная антисыворотка → антивидовой пероксидазный конъюгат

Table 1. Titration of D-antigen of types 1, 2, 3 in the preparation of inactivated poliovirus vaccine (C-IPV) based on Sabin strains in the ELISA system: sensitization by IgY → antigen → detector anti-serum → antispecies peroxidase conjugate

Тип Type	1 : 4*	1 : 16	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	1 : 4096
1	4,143**	2,839	1,176	0,426	0,190	0,126
NA***	0,096	0,103	0,099	0,096	0,100	0,100
2	1,488	0,724	0,342	0,183	0,138	0,125
NA	0,123	0,120	0,120	0,122	0,122	0,128
3	4,044	3,235	2,069	0,984	0,408	0,221
NA	0,149	0,141	0,145	0,152	0,145	0,145

Примечание. * разведение исследуемого образца; ** оптическая плотность при 450 нм; *** «нормальный» антиген (ИФА-буфер).

Note. * dilution of the test sample; ** optical density at 450 nm; *** «normal» antigen (ELISA buffer).



Результаты титрования в иммуноферментном анализе препарата IgY против вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).

Непрерывная линия – IgY против ВКЭ; пунктирная линия – IgY из неиммунного желтка (негативный контроль).

ELISA titration results of anti-TBE IgY preparation.

Continuous line – IgY anti-TBEV; dashed line – IgY from non-immune yolk (negative control).

по определению антигена ВКЭ (очищенный белок E) продемонстрировало четкие положительные результаты: очищенный белок E определяется в концентрации примерно 25 нг/мл (данные не представлены).

В табл. 1 представлены результаты титрования препарата поливалентной инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина, типы 1–3 (С-ИПВ, лабораторная серия) – определение D-антигена каждого типа в варианте ИФА с сенсibilизацией твердой фазы специфическими IgY против типов 1, 2, 3 и соот-

ветствующими детекторными антисыворотками кроликов. Согласно данным табл. 1, титр D-антигена типа 1 – 1 : 512; типа 2 – 1 : 128; типа 3 – 1 : 1024.

В табл. 2 представлены результаты титрования «диких» штаммов полиовируса (тип 1 – Mahoney, тип 2 – MEF-1, тип 3 – Saukett) – определение D-антигена каждого типа в культуральной жидкости инфицированных клеток *Vero* в варианте ИФА с сенсibilизацией твердой фазы специфическими IgY против типов 1, 2, 3 и соответствующими детекторными IgY, мечеными биотином.

Таблица 2. Титрование штаммов полиовируса (тип 1 – Mahoney, тип 2 – MEF-1, тип 3 – Saukett) – определение D-антигена каждого типа в культуральной жидкости инфицированных клеток *Vero* в варианте ИФА с сенсibilизацией твёрдой фазы специфическими IgY против типов 1, 2, 3 и соответствующими детекторными IgY, меченными биотином

Table 2. Titration of poliovirus strains (type 1 – Mahoney, type 2 – MEF-1, type 3 – Saukett) – determination of the D-antigen of each type in the culture fluid of infected *Vero* cells in the ELISA with sensitization of the solid phase by specific IgY against types 1, 2, 3 and corresponding biotin-labeled IgY as detector

Тип Type	1 : 4*	1 : 16	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	1 : 4096
1	0,952**	0,564	0,267	0,156	0,119	0,109
NA***	0,102	0,104	0,099	0,103	0,103	0,108
2	3,058	3,041	2,493	1,751	1,594	0,882
NA	0,198	0,172	0,165	0,179	0,182	0,184
3	1,053	0,543	0,320	0,215	0,176	0,178
NA	0,166	0,166	0,161	0,162	0,162	0,170

Примечание. * разведение исследуемого образца; ** оптическая плотность при 450 нм; *** «нормальный» антиген (ИФА-буфер).

Note. * dilution of the test sample; ** optical density at 450 nm; *** «normal» antigen (ELISA buffer).

Таблица 3. Титрование компонентов куриного эмбриона (яйца), инфицированного вирусом жёлтой лихорадки (ВЖЛ), штамм 17 D, – определение антигена ВЖЛ в варианте ИФА с сенсibilизацией твёрдой фазы специфическим IgY и соответствующим детекторным IgY, меченным биотином

Table 3. Titration of components of chicken embryo (egg) infected with YF virus, strain 17 D – determination of YF virus antigen in the ELISA variant with sensitization of the solid phase by specific IgY and the corresponding detection IgY labeled with biotin

Образец Sample	Не разведен Not diluted	1 : 2*	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
Аллантоисная жидкость Allantoic fluid	0,238**	0,169	0,156	0,156	0,152	0,150
Тело эмбриона (гомогенат) Embryo body (homogenate)	2,128	1,905	1,741	1,613	1,199	0,806
ВЖЛ*** YF Vac.	1,957	1,398	0,603	0,348	0,241	0,200
NA****	0,153	0,151	0,148	0,151	0,153	0,149

Примечание. * разведение исследуемого образца; ** оптическая плотность при 450 нм; *** коммерческая живая вакцина вируса жёлтой лихорадки (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва); **** «нормальный» антиген (ИФА-буфер).

Note. * dilution of the test sample; ** optical density at 450 nm; *** commercial live yellow fever virus vaccine (Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia); **** «normal» antigen (ELISA buffer).

Из данных табл. 2 следует, что титр D-антигена типа 1 – 1 : 128; типа 2 \geq 1 : 4096; типа 3 – 1 : 64.

В табл. 3 представлены результаты титрования компонентов куриного эмбриона (яйца), инфицированного ВЖЛ, штамм 17 D, – определение антигена ВЖЛ в варианте ИФА с сенсibilизацией твёрдой фазы специфическим IgY и соответствующим детекторным IgY, биотином. Из данных таблицы следует, что в аллантоисной жидкости антиген ВЖЛ не определяется; в гомогенате тела эмбриона титр антигена ВЖЛ более 1 : 32 (~ 1 : 64 – 1 : 128); в коммерческой живой вакцине против жёлтой лихорадки титр антигена ВЖЛ – 1 : 8.

Чувствительность представленных вариантов ИФА составляет 2–3 Ig БОЕ/мл (для ВКЭ и ВЖЛ) и 3 Ig ТЦД/мл (для полиовируса).

Обсуждение

IgY-технология находит всё большее применение в исследовательской практике (в основном за рубе-

жом [1–3]), и представленные нами результаты показывают, что это оправданно: выраженная иммунореактивность кур, простота, дешевизна и атравматичность иммунизации (важнейший этический момент), большой выход и лёгкость получения препаратов IgY с высокой активностью и специфичностью. Поликлональные антисыворотки (или препараты IgG) млекопитающих, как правило, создают проблемы с перекрёстной реактивностью при использовании их в иммунологических тестах, особенно для детекции антигенов в виде клеточных или тканевых суспензий, включая кровь. Использование моноклональных антител, например, в системах ИФА для детекции сложных антигенов, менее эффективно вследствие узкой специфичности моноклональных антител (нередко приходится использовать «коктейли» из них для более широкой эпитопной специфичности). Поликлональные IgY представляются эффективной моделью для решения такого рода проблем. В данном сообще-

нии мы представили варианты систем ИФА на основе препаратов IgY для определения антигенов указанных вирусов. Системы ИФА для определения D-антигена полиовирусов и ВЖЛ уже используются при разработке экспериментальных серий инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина (С-ИПВ) [11] и инактивированной вакцины ВЖЛ [12].

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 5-8, 10 см. REFERENCES)

4. Иванов А.П., Варгин В.В. Препараты IgY из куриного желтка как иммунные реагенты к вирусу клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(2): 46-8.
9. Иванов А.П., Козлов В.Г., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е., Киктенко А.В. Система иммуноферментного анализа на основе специфических антител класса Y (IgY) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инактивированных полиовирусных вакцинах. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(6): 39-42.
11. Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е., Ипатова Е.Г., Гмыль Л.В., Ишмухаметов А.А. Экспериментальные подходы к разработке инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(4): 59-64. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-59-64>
12. Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Синогина А.А., Ишмухаметов А.А. Разработка инактивированной культуральной вакцины против желтой лихорадки. В кн.: *Материалы XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»*. М.; 2019: 68-9.

REFERENCES

1. Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Porankiewicz-Asplund J., Terzolo H.P. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern. Lab. Anim.* 2005; 33(2): 129-54. DOI: <http://doi.org/10.1177/026119290503300208>
2. Schade R., Hendriksen C., Staak C., Erhard M. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *Altern. Lab. Anim.* 1997; 24(6): 925-34.

3. Haak-Frendscho M. Why IgY? Chicken polyclonal antibody, an appealing alternative. *Promega Notes Magazine*. 1994; 46: 11-4.
4. Ivanov A.P., Vargin V.V. Chicken yolk IgY preparations as immune reagents to tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(2): 46-8. (in Russian)
5. 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(2): 207-14. DOI: [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-b](http://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-b)
6. World Health Organization. Manual for the virological investigation of polio [WHO/EPI/GEN97.01]. Geneva: WHO; 1997.
7. Mercier-Delarue S., Durier C., Colin de Verdière N., Poveda J.D., Meiffredy V., Garcia MDF., et al. Screening test for neutralizing antibodies against yellow fever virus, based on flavivirus pseudotype. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0177882. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0177882>
8. Harlow E., Lane D. *Antibodies: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.
9. Ivanov A.P., Kozlov V.G., Klebleeva T.D., Ivanova O.E., Kiktenko A.V. 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. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(6): 39-42. (in Russian)
10. Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Tkachenko E.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of arenaviruses. *Arch. Virol.* 1981; 67(1): 71-4. DOI: <http://doi.org/10.1007/BF01314603>
11. Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Ivanova O.E., Ipatova E.G., Gmyl' L.V., Ishmukhametov A.A. Experimental approaches to the development of inactivated poliovirus vaccine based on Sabin strains. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2016; 15(4): 59-64. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-59-64> (in Russian)
12. Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Sinyugina A.A., Ishmukhametov A.A. Development of inactivated yellow fever cultural vaccine. In: *Materials of the XI Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases with International Participation «Infectious Diseases in the Modern World: Evolution, Current and Future Threats» [Materialy XI Ezhegodnogo Vserossiyskogo Kongressa po infektsionnym boleznyam s mezhdunarodnym uchastiem «Infektsionnye bolezni v sovremennom mire: evolyutsiya, tekushchie i budushchie угрозы»]*. Moscow, 2019: 68-9. (in Russian)