

5. Nikitin I.G., Gogova L.M., Bajkova I.E. et al. Human leukocyte interferon alpha in combination therapy in patients with chronic hepatitis C infected with non-1 genotype virus. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii*. 2009; 1: 33–7. (in Russian)
6. Rauch A., Kutalik Z., Descombes P. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1338–45.
7. Kozina A.N. Vozможnosti personificirovannogo podhoda k lecheniyu gepatita S na osnovanii razrabotannyh geneticheskikh testov opre-

- deleniya varianta polimorfizma gena IL-28B / A.N. Kozina, D.D. Abramov, E.A. Klimova et al. *Lechashchiy vrach*. 2011; 10: 39–43.
8. McCarthy J., Li J., Thompson A. et al. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology*. 2010; 138: 2307–14.
9. Rauch A., Kutalik Z., Descombes P. et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1338–45.

Поступила 25.04.14
Received 25.04.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 578.835.11.083.2

Козлов В.Г.¹, Иванов А.П.¹, Иванова О.Е.¹, Варгин В.В.²

Получение поликлональных энтеровирусных антител (IgY) от куриц и их оценка в качестве альтернативы энтеровирусным нейтрализующим сывороткам кроликов

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

Представлены экспериментальные доказательства эффективности иммунизаций куриц породы леггорн энтеровирусами человека для получения специфических антител (IgY), не уступающих по нейтрализующей активности коммерческим кроличьим энтеровирусным диагностическим сывороткам (ЭДС). В отличие от цитотоксичности большинства ЭДС IgY неактивны по отношению к индикаторным клеткам, используемым в реакции нейтрализации (РН). «IgY-технология» значительно результативнее и экономичнее традиционной иммунизации млекопитающих за счет многократного уменьшения количества продуцентов при одновременном увеличении выхода целевых продуктов, снижения объемов иммуногенов, сокращения продолжительности цикла иммунизации и числа инъекций.

Ключевые слова: энтеровирусные антитела IgY из яичного желтка куриц; энтеровирусные диагностические сыворотки кроликов.

Для цитирования: *Вопросы вирусологии*. 2015; 60 (1): 31–34.

Kozlov V.G.¹, Ivanov A.P.¹, Ivanova O.E.¹, Wargin V.V.²

Production of the polyclonal enterovirus antibodies of chicken (IgY) and its evaluation as alternative to the rabbit enterovirus neutralizing sera

¹ Federal State Enterprise for Manufacture of Bacterial and Viral Preparations, Shumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 142782, Moscow, Russia; ² M.P. Shumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 142782, Moscow, Russia

Experimental data show the usefulness of the Leghorn chicken as a producer of the enterovirus neutralizing antibodies (IgY). The resulting serum is not inferior to the specific activity of the commercial rabbit enterovirus diagnostic sera (EDS) in the neutralization reaction. The IgY have lower backgrounds than mammalian IgG and do not cause toxic effect to cell culture. Compared with the conventional manufacturing method EDS IgY, preparation process is much more effective: the number of serum producers is significantly lower, whereas the yield of the product is higher. Reduction of the volume of the immunogens, immunization cycle, and number of injections is also an advantage of this manufacturing method.

Key words: *enterovirus antibodies from egg yolk (IgY) of chicken; enterovirus-neutralizing diagnostic rabbit sera.*

Citation: *Voprosy virusologii*. 2015; 60(1): 31–34. (In Russ.)

Введение

На протяжении последних десятилетий серьезной проблемой для здравоохранения многих стран стали периодически возникающие распространенные вспышки энтеровирусных заболеваний, многие из которых представляют угрозу для здоровья людей [1, 2]. Вследствие этиологического непостоянства и полиморфизма манифестных форм энтеровирусной инфекции (ЭВИ)

основными источниками диагностической информации являются высокочувствительные лабораторные исследования. В реализуемой на территории Российской Федерации системе эпидемиологического надзора за ЭВИ [3] диагностическое пространство формируется на основе традиционных вирусологических и серологических методов и современных молекулярных методик (обратнотранскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР), микрочипы). Для идентификации энтерови-

Для корреспонденции: Козлов Виталий Григорьевич, канд. мед. наук; e-mail: vgzozlov@mail.ru
Correspondence to: Vitaliy Kozlov, MD, PhD; e-mail: vgzozlov@mail.ru

Энтеровирусы, использованные в экспериментах

Вид. серотип, штамм	Источник и год получения	Титр в Ig ККИД ₅₀ /мл	
		клетки RD	клетки HEp-2-C
A, Коксаки А7, АВ-IV	Институт сывороток, США, 1975	8,3	—
B, Коксаки В2, JVB	ВОЗ, 1974	—	7,3
B, ECHO 3, Morrisey	ВОЗ, 1975	8,3	—
B, ECHO 30, Bastianni	ВОЗ, 1970	6,3	—
C, полиовирус типа 1, Mahoney	ЦНИИЭиГ, ЧССР, 1956	9,0	—
D, энтеровирус 70, J 670/71	ВОЗ, 1992	7,0	—

Примечание. ККИД – клеточная культуральная инфекционная доза.

русов до уровня серотипа практические вирусологические лаборатории обычно прибегают к регламентированной ВОЗ реакции нейтрализации (РН), основанной на подавлении инфекционности тестируемых агентов специфическими сыворотками.

Классическим методом получения нейтрализующих сывороток является гипериммунизация животных. Итог иммунизаций не всегда прогнозируем, поскольку определяется не только надлежащим балансом ключевых факторов иммунного ответа (свойства продуцентов, антигенов, адъювантов, схемы иммунизации), но и практически не поддающимся учету и измерению многочисленными прямыми и косвенными воздействиями окружающей среды. Традиционные проблемы сывороточного производства характерны и для серийного изготовления отечественных энтеровирусных диагностических сывороток (ЭДС), получаемых от рандомбредных (нелинейных) кроликов. Слабая видовая иммунореактивность и выраженная индивидуальность иммунного ответа продуцентов этой категории существенно снижают эксплуатационные характеристики ЭДС.

Известно, что высокой иммунореактивностью к чужеродным белкам обладают птицы, а иммуноглобулины (Ig) птиц класса Y по ряду показателей превосходят функционально аналогичные IgG млекопитающих [4]. Благодаря филогенетической отдаленности доноров и реципиентов IgY не взаимодействуют с белками млекопитающих. Постоянный трансовариальный транспорт антител способствует их накоплению в больших количествах в яичном желтке. Бескровный способ получения IgY соответствует принципам гуманной техники работ с зоологическими объектами [5]. Несмотря на очевидную перспективность использования птиц в качестве эффективных источников специфических антител, ранее их не использовали для изготовления энтеровирусных иммунодиагностических реагентов.

Целью нашей работы было получение энтеровирусных поликлональных антител (IgY) от куриц породы леггорн (КЛ) и определение пригодности IgY для идентификации энтеровирусов в РН.

Материалы и методы

В экспериментах использовали прототипные штаммы иммунологически неравноценных энтеровирусов человека видов А–D из производственной коллекции ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова» РАМН (табл. 1). Специфичность вирусов была подтверждена в РН моноспецифическими сыворотками (ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова» РАМН; Baylor University, USA) и полиспецифическими референс-препаратами («RIVM», Билтховен, Нидерланды).

Объектами иммунизации были 5–6-месячные несущиеся КЛ (птицефабрика «Птичное», Московской обл.). Контрольными продуцентами были 3-месячные кролики породы шиншилла (КШ) рандомбредной категории (ФГБУ «НЦБМТ» РАМН). Все манипуляции с зоологическими объектами осуществляли при строгом соблюдении правил, предписанных для работ с экспериментальными животными.

КЛ и КШ иммунизировали по индивидуальным схемам (табл. 2). Иммунизацию КЛ проводили либо без адъюванта, либо использовали полный или неполный адъювант Фрейнда (Freunds Complete Adjuvant, «Modified Calbiochem Corporation», США; Freunds Incomplete Adjuvant, «DIFCO Laboratories», США). Сбор яиц начинали через 2–3 нед после завершения полного цикла иммунизаций. Яйца сохраняли в течение 2 мес при 4°C. Желтки хранили неопределенно долгое время при -20°C. Экстракцию IgY проводили в соответствии с методом,

применяемым для выделения иммунных продуктов из желтка яиц КЛ, иммунизированных *E. coli* [6]. IgY стерилизовали с помощью фильтров Millipore (0,45 мкм).

Иммунизацию КШ проводили с использованием в качестве адъюванта вазелиново-ланолиновой эмульсии (8,5 частей вазелинового масла и 1,5 части ланолина безводного), стандартно применяемой при изготовлении ЭДС. Сыворотки получали из цельной крови, взятой через 7 дней после завершения полного цикла иммунизации. Сыворотки стерилизовали с помощью фильтров Millipore (0,8–0,22 мкм) и перед употреблением инактивировали в течение 30 мин при 56°C.

Нейтрализующую активность и специфичность полученных иммунных продуктов определяли микрометодом РН [3]. Индикаторной системой РН были предоставленные NIBSC (Великобритания) клетки RD (происходящие из рабдомиосаркомы человека) или клетки HEp-2-C (происходящие из эпителиальной карциномы человека).

Результаты

В предшествующих экспериментах выявлены низкая специфическая активность IgY, полученных в отсутствие адъюванта, и снижение или даже полное подавление яйценоскости КЛ, иммунизируемых совместно с полным адъювантом Фрейнда. Результаты тестирования IgY КЛ, иммунизированных в присутствии неполного адъюван-

Таблица 2

Схемы иммунизации

Условия и объекты иммунизации	Порядок иммунизации					
	1	2	3	4	5	6
	<i>Кролики/курицы</i>					
Интервал между иммунизациями, дни		21/30	14/30	14	35	35
	<i>Кролики</i>					
Объем и путь введения энтеровирусов, неполного адъюванта Фрейнда и вазелиново-ланолиновой эмульсии	Вирус 5,0 мл в/в; вирус + вазелиново-ланолиновая эмульсия 5,0 мл + 5,0 мл в/м	Вирус по 10,0 мл в/в				
	<i>Курицы</i>					
	Вирус + неполный адъювант Фрейнда 1,0 мл + 1,0 мл в/м					

Примечание. в/в – внутривенно; в/м – внутримышечно.

Таблица 3

Характеристики куриных IgY и иммунных сывороток кроликов

Иммунные продукты	Нейтрализующая активность*		Цитотоксичность**	
	IgY***	сыворотки	IgY	сыворотки
Полиовирус типа 1	3200–4800***	3200–6400*** (4800) [†]	<5***	40–320*** (320) [†]
Коксаки А7	400	200–800 (600)	<5	20–40 (40)
Коксаки В2	1200	400–1200 (1200)	<5	10–60 (40)
ЕСНО 3	800	800–3200 (800)	<5	10–30 (20)
ЕСНО 30	600	400–1200 (800)	<5	5–10 (10)
Энтеро-70	200	150–400 (200)	<5	5–10 (10)

Примечание. * – обратные величины разведений, содержащих 1 НЕ; ** – обратные величины разведений, токсичных для индикаторных клеток; *** – диапазон индивидуальных показателей; [†] – показатели нейтрализующей активности смесей сывороток.

та Фрейнда, приведены в табл. 3. Как правило, уровни специфической активности однотипных IgY, выделенных из различных желтков, практически совпадали и были сопоставимы с показателями активности смесей кроличьих сывороток соответствующих типов. В функциональном отношении все IgY соответствовали требованиям, предъявляемым к качеству ЭДС для РН, а именно: 1 нейтрализующая единица (НЕ) определялась в разведении 1:200, 20 НЕ нейтрализовали 32–320 ККИД гомологичных энтеровирусов и не нейтрализовали 32–320 ККИД гетерологичных энтеровирусов. В отличие от цитотоксичности кроличьих сывороток IgY не вызывали неспецифические изменения индикаторных клеток.

Обсуждение

По ряду практических и экономических соображений эффективность производства сывороточных диагностических препаратов определяется максимальным иммунным ответом продуцентов на наименьшее число раздражений минимальными дозами антигена. Этим условиям наиболее полно соответствовала технология изготовления высококачественных энтеровирусных референс-сывороток («RIVM», Нидерланды) на генетически однородных SPF (specific pathogen free) лошадях и кроликах [7]. Однако значительные экономические затраты на соблюдение специализированных зооигиенических условий разведения, содержания и эксплуатации животных-продуцентов препятствовали крупномасштабному производству сывороток «RIVM». Рентабельность производства отечественных ЭДС обеспечивалась за счет использования экономически доступных нелинейных кроликов, содержащихся в открытых (конвенциональных) системах, не защищающих животных от инфекционных агентов. Слабость и неравноценность иммунного ответа этой категории продуцентов с различной эффективностью компенсировали увеличением числа иммунизаций и объемом антигенов, вводимых в кровеносное русло. Агрессивный характер подобных иммунизаций был причиной местных и общих реакций, преждевременно изнашивающих продуцентов и снижающих качество целевых продуктов. В частности, инициируемая внутривенными иммунизациями цитотоксичность ЭДС способствовала ложноотрицательной оценке РН [8].

Эксперименты по иммунизации энтеровирусами КЛ показали возможность стабильного получения специфических антител (IgY) улучшенного качества. Уровни нейтрализующей активности IgY, сопоставимые с аналогичными показателями кроличьих иммунных сывороток соответствующих типов, были достигнуты при двукратном сокращении числа иммунизаций и пятикратном

уменьшении объема вводимого антигена. В отличие от негативных последствий длительно чередующихся внутривенных инъекций и кровопусканий у КШ КЛ легко переносили цикл внутримышечных иммунизаций. Объективным показателем этого было отсутствие неспецифических реакций на IgY со стороны клеток RD и Нер-2-С, исключивших ложноотрицательную интерпретацию результатов реакции нейтрализации. С учетом среднего содержания специфического IgY в яичном желтке и показателей яйценоскости (кладка яйца через 1–2 дня на протяжении 4–5 мес) суммарный выход IgY от каждого продуцента в 5–7 раз превосходил средний объем иммунной сыворотки, получаемой от одного кролика.

Заключение

Несмотря на предварительный характер наших экспериментов по иммунизации ограниченного количества КЛ отдельными представителями всех видов энтеровирусов человека, выявлена корреляция уровней нейтрализующей активности однотипных IgY и ЭДС. Однако изготовление IgY было результативнее и экономичнее сывороточного производства за счет увеличения выхода целевых продуктов при одновременном многократном уменьшении количества продуцентов, объемов иммуногена и сокращения продолжительности цикла иммунизации.

Таким образом, «IgY-технология», улучшающая характеристики иммунодиагностических продуктов без компромисса с состоянием их продуцентов, может рассматриваться в качестве перспективной альтернативы традиционным способам получения антител от млекопитающих. Этот вывод в совокупности с данными о терапевтическом эффекте специфических IgY [9] и юридическими аспектами охраны благополучия животных, законодательно защищенных во многих странах [10], позволяет считать, что получение птичьих антител не долго сохранит статус экспериментальной методики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова О.Е., Еремеева Т.П., Лукашов А.Н., Байкова О.Ю., Морозова Н.С., Мустафина А.Н. Наблюдение за циркуляцией неполомелитных энтеровирусов в Российской Федерации в 1999–2007 гг. *Медицинская вирусология. Тр. ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН*. 2008; XXV: 11–22.
2. Лукашов А.Н., Иванова О.Е., Худякова Л.В. Социально-экономическая значимость энтеровирусной инфекции и ее роль в структуре инфекционной патологии в мире. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2010; 5: 113–20.
3. *Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусом для поддержки программы ликвидации полиомиелита*. Женева: ВОЗ; 2005.
4. Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Parankiewicz-Asplund J., Terzolo H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ALTA*. 2005; 33: 129–54.
5. Russell W.M.S., Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959. London, Methuen & Co LTD: reprinted 1992 by UFAW, South Mimms, UK.
6. 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.
7. *Horse serum for typing of enteroviruses*. National institute of public health and the environment (RIVM), Bilthoven, NL.
8. Козлов В.Г., Викторова Е.Г., Набатников П.А. Цитотоксические свойства кроличьих энтеровирусных диагностических сывороток. Особенности и локализация. *Вопросы вирусологии*. 2009; 1: 22–7.
9. Liou J.F., Chang C.W., Taiiu J.J., Yu C.K., Lei H.Y., Chen L.R., Tai C. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. *Vaccine*. 2010; 28: 8189–96.
10. Каркищенко Н.Н. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биологических исследованиях*. М.; 2010.

REFERENCES

- Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Lukachov A.N., Baykova O.Yu., Morozova N.S., Mustafina A.N. *Observation of non-polio enterovirus circulation in the Russian Federation in 1999–2007. [Nablyudeniye za tsirkulyatsiyey nepoliomielitnikh enterovirusov v Rossiyskoy Federatsii v 1999–2007 gg.]*. Medical Virology (Moscow). Proceedings of the M.P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis RAMS. 2008; XXV: 11–22. (in Russian)
- Lukashev A.N., Ivanova O.E., Khudyakova L.V. *Social and economic significance of enterovirus infection and its role in etiologic structure of infectious diseases in the world. [Sotsial'no-ekonomicheskaya znachimost' enterovirusnoy infektsii i ee rol' v structure infektsionnoy patologii v mire]*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii. 2010; 5: 113–20. (in Russian)
- Recommendations for the epidemiologic surveillance of enteroviruses to support polio eradication. [Rekomendatsii po epidemiologicheskomu nadzoru za enterovirusami dlya podderzhki programmy likvidatsii poliomiellita]. Geneva: WHO; 2005.
- Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Parankiewicz-Asplund J., Terzolo H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ALTA*. 2005; 33: 129–54.
- Russell W.M.S., Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959. London, Methuen & Co LTD: reprinted 1992 by UFAW, South Mimms, UK.
- 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.
- Horse serum for typing of enteroviruses*. National institute of public health and the environment (RIVM), Bilthoven, NL.
- Kozlov V.G., Viktorova E.G., Nabatnikov P.A. *Cytotoxic properties of diagnostic sera to enteroviruses. Specific features and localization. Voprosy virusologii.* 2009; 1: 22–7. (in Russian)
- Liou J.F., Chang C.W., Tailiu J.J., Yu C.K., Lei H.Y., Chen L.R., Tai C. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. *Vaccine*. 2010; 28: 8189–96.
- Karkishchenko N.N. *Guidance on laboratory animals and alternative models in biological studies. [Rukovodstvo po laboratornym zivotnym I al'ternativnym modelyam v biologicheskikh issledovaniyakh]*. M.; 2010. (in Russian)

Поступила 01.08.13

Received 01.08.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 615.38:614.2

Скорикова С.В.¹, Буркитбаев Ж.К.¹, Савчук Т.Н.¹, Жибурт Е.В.²

Распространенность ВИЧ-, ВГС-, ВГВ-инфекций у доноров крови Астаны

¹Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения (РГП на ПХВ) «Научно-производственный центр трансфузиологии» Минздрава Республики Казахстан, 010000, г. Астана, Республика Казахстан; ²ФГБУ Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова Минздрава России, 105203, Москва

Определили распространенность и встречаемость инфекций у 28 248 доноров крови г. Астаны в 2012 г. Расчетный остаточный риск трансфузионного инфицирования составил для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) 1,2; вируса гепатита С (ВГС) 137,7; вируса гепатита В (ВГВ) 125,4 на 1 млн донораций. Высокий риск трансфузионного инфицирования ВИЧ, ВГВ и ВГС стимулирует активное внедрение мер повышения безопасности крови: отбор доноров, повышение чувствительности методов скрининга инфекций, инактивацию патогенов в компонентах крови и рациональное назначение гемотрансфузий в клинике.

Ключевые слова: *кровь; донор; переливание; риск; инфекции; ВИЧ; гепатит; распространенность; встречаемость.*

Для цитирования: *Вопросы вирусологии. 2015; 60 (1): 34–36.*

Skorikova S.V.¹, Burkitaev Zh.K.¹, Savchuk T.N.¹, Zhiburt E.B.²

Prevalence and incidence of infections among blood donors in Astana

¹Research and Production Center of Transfusiology of Republic of Kazakhstan, 010000, Astana, Republic of Kazakhstan; ²Pirogov National Medical Surgical Center, Ministry of Health of the Russian Federation, 105203, Moscow, Russia

The prevalence and incidence of infections among 28,248 blood donors in Astana in 2012 was determined. The estimated residual risk of the transfusion infection was as follows: for HIV – 1,2, HCV – 137,7, HBV – 125,4 per 1 million donations. High risk of transfusion infection with HIV, hepatitis B, and C stimulates the active implementation of the measures for increasing the safety of blood: the selection of donors, increasing the sensitivity of infections screening methods, inactivation of pathogens in blood components and transfusion management appointment at the clinic.

Key words: *blood; donor; transfusion; risk; infections; HIV; hepatitis; prevalence; incidence.*

Citation: *Voprosy virusologii. 2015; 60(1): 34–36. (In Russ.)*

Введение

Общепризнано, что, несмотря на все меры безопасности, остаточный риск передачи инфекции с донорской кровью сохраняется из-за серонегативного окна и других особенностей течения инфекционного процесса [1–5].

Распространенность, превалентность – количество случаев определенной болезни в популяции в определенный момент. В трансфузиологии – количество заболеваний у первичных доноров (чаще в год).

Встречаемость, инцидентность – количество случаев заболевания, возникших в течение определенного вре-

Для корреспонденции: Скорикова Светлана Викторовна; e-mail: tarkiff@mail.ru
Correspondence to: Svetlana Skorikova; e-mail: tarkiff@mail.ru