

9. Baranova E., Solov Ev P., Panfertsev E., Baranova A., Feduykina G., Kolombet L., Morshed M.G., Biketov S. Rational design of antigens to improve the serodiagnosis of tick-borne borreliosis in central regions of Russia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014, 807: 9-21.
10. Ivanova L., Christova I., Neves V. et al. Comprehensive seroprofiling of sixteen *B. burgdorferi* OspC: implications for Lyme disease diagnostics design. *Clin. Immunol.* 2009, 132 (3): 393-400.
11. Magnarelli L.A., Ijdo J.W., Padula S.J. et al. Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38 (5): 1735-1739.
12. Makhani N., Morris.S.K., Page A.V. et al. A twist on Lyme: the challenge of diagnosing European Lyme neuroborreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49: 455-457.
13. Mathiesen M.J., Hansen K., Axelsen N. et al. Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii*. *Med. Microbiol. Immunol.* 1996, 85 (3): 121-129.
14. Mavin S., Evans R., Milner R.M. et al. Local *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* strains in a single mixed antigen improves western blot sensitivity. *J. Clin. Pathol.* 2009, 62: 552-554.
15. Stanek G., Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex—clinical significance of genomic species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17 (4): 487-493.
16. Wang I.N., Dykhuezen D.E., Qiu W. et al. Genetic diversity of OspC in local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics.* 1999, 151 (1): 15-30.
17. Wilske B., Jauris-Heipke S., Lobentanzer R. et al. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33 (1): 103-109.
18. Wilske B.V., Fingerle U., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007, 49 (1): 13-21.

*Поступила 10.08.15*

Контактная информация: Караваев Виталий Семенович, к.м.н.,  
630117, Новосибирск, ул. академика Тимакова, 2, р.т. (383)332-56-58

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*А.А.Печельюк<sup>1</sup>, Ю.Н.Тараканова<sup>1</sup>, А.Д.Дмитриев<sup>1</sup>,  
Ю.С.Массино<sup>1</sup>, О.Л.Сегал<sup>1</sup>, В.Ф.Лавров<sup>1,2</sup>, Д.А.Дмитриев<sup>1</sup>*

## **АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IgY КУР В СЭНДВИЧ-МЕТОДЕ ТЕСТИРОВАНИЯ НВsAg**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

*Цель.* Изучение антигенсвязывающей способности поликлональных антител (ПКА) кур по сравнению с моноклональными антителами (МКА) мышей на модели взаимодействия с НВsAg. *Материалы и методы.* Использовали мышинные МКА 18С8 и МКА F3/F4 (IgG), эффективные в иммуноферментном сэндвич-методе определения НВsAg (с минимальной детектируемой дозой 0,017 нг/мл), и аффинно-очищенные анти-НВsAg ПКА кур (IgY), полученные от двух иммунизированных птиц (ПКА №1 и ПКА №2). Способность антител связывать НВsAg оценивали по аналитической чувствительности (угловым коэффициентам кривых связывания) твердофазных иммуноферментных систем с использованием МКА мышей и ПКА кур. *Результаты.* В модельных опытах по связыванию меченого пероксидазой НВsAg ПКА № 2 обеспечивали после адсорбции на полистироловые планшеты статистически значимое 40% увеличение аналитической чувствительности, по сравнению с «эталонными» иммобилизованными МКА 18С8. Однако переход от модельных опытов к применению ПКА № 1 и ПКА № 2 в сэндвич-методе определения НВsAg вместо иммобилизованных МКА 18С8 или детектирующих МКА F3/F4 во всех случаях, напротив, приводил к снижению аналитической чувствительности. *Заключение.* Предположили, что меньшая гибкость ПКА кур может затруднять бивалентное взаимо-

действие в сэндвич-методе, приводя к образованию менее стабильных иммунных комплексов. Не отрицая ценности IgY для создания иммунохимических диагностических методов, данные факты и предположения указывают на необходимость более глубокого выяснения наилучших областей их применения.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 44—51

Ключевые слова: IgY кур, сэндвич-метод иммуноферментного анализа, аналитическая чувствительность, HBsAg

A.A.Pechelyulko<sup>1</sup>, Yu.N.Tarakanova<sup>1</sup>, A.D.Dmitriev<sup>1</sup>,  
Yu.S.Massino<sup>1</sup>, O.L.Segal<sup>1</sup>, V.F.Lavrov<sup>1,2</sup>, D.A.Dmitriev<sup>1</sup>

## ANALYSIS OF EFFECTIVENESS OF USING IgY FROM CHICKEN IN SANDWICH METHOD OF HBsAg TESTING

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, Moscow, Russia

*Aim.* Study antigen-binding ability of polyclonal antibodies (PCA) of chicken compared with monoclonal antibodies (MCA) of mice in the model of interaction with HBsAg. *Materials and methods.* Mice MCA 18C8 and MKA F3/F4 (IgG) were used, effective in enzyme immunoassay sandwich method of HBsAg determination (with a minimal detection dose of 0.017 ng/ml), and affinity purified anti-HBsAg PCA of chicken (IgY), obtained from 2 immunized birds (PCA No. 1 and PCA No. 2). The ability of antibodies to bind HBsAg was evaluated by analytical sensitivity (slope of binding curve) of solid-phase enzyme immunoassay system using mice MCA and chicken PCA. *Results.* PCA No. 2 has provided a statistically significant 40% increase of analytical sensitivity, compared with «standard» immobilized MCA 18C8, in model experiments of binding of peroxidase-labeled HBsAg. However, transition from model experiments to use of PKA No. 1 and PKA No. 2 in sandwich method of determination of HBsAg instead of immobilized MCA 18C8 or detecting MCA F3/F4 in all the cases, on the contrary, resulted in a decrease of analytical sensitivity. *Conclusion.* A lower flexibility of chicken PCA was assumed to be able to impede bivalent interaction in sandwich method, resulting in formation of less stable immune complexes. Without challenging value of IgY for the creation of immunochemical diagnostic methods, these facts and assumptions indicate a necessity of a deeper elucidation of the best areas of their application.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 44—51

Key words: chicken IgY, enzyme immunoassay sandwich method, analytical sensitivity, HBsAg

## ВВЕДЕНИЕ

Использование поликлональных антител (ПКА) птиц (IgY) в иммунохимических исследованиях и при конструировании тест-систем, предназначенных для лабораторной диагностики инфекционных, в том числе, вирусных заболеваний — сравнительно новое и, как считается, перспективное направление иммунохимии, получившее название «IgY-технологии». Предполагается, что ПКА кур имеют ряд преимуществ по сравнению с антителами другой видовой специфичности. В частности, возникает возможность получения антител с эпитопной специфичностью, отличающейся от таковой у антител, получаемых у мышей, кроликов и других млекопитающих, эти антитела имеют низкую неспецифическую кроссреактивность с антигенами млекопитающих, включая человека. Кроме того, существенное значение имеет относительно невысокая стоимость метода их получения, а также биоэтические преимущества его использования — возможность получения значительного количества IgY из эмбрионов (яиц) птиц, не нанося страданий лабораторным животным [3, 8, 9]. За прошедшие годы опубликован

ряд сообщений об успешной разработке эффективных иммунохимических тест-систем для определения онкомаркеров, гормонов, бактериальных и вирусных антигенов с помощью куриных ПКА [8, 9]. Известно, что структура молекулы IgY существенно отличается от структуры IgG, в частности, антитела кур не имеют шарнирного участка, ввиду чего менее гибки, чем IgG. Можно предположить, что эти особенности строения при определенных условиях могут оказывать влияние на формирование иммунных комплексов [8]. Поэтому представляется необходимым более детальное изучение эффективности куриных ПКА в иммунохимических тестах, в частности, твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). В настоящем исследовании данный вопрос анализировали с помощью сэндвич-метода определения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). В качестве модели сравнения был выбран полученный нами ранее высокочувствительный иммуноферментный сэндвич-метод определения HBsAg с минимально детектируемой дозой антигена 0,017 нг/мл [1, 4]. В задачу работы входило выяснение вопроса о возможности замены одного из компонентов мышиных моноклональных антител (МКА) этого сэндвич-метода на ПКА кур без снижения его аналитической чувствительности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделенный из сыворотки крови HBsAg, экспрессированный в *Pichia pastoris* рекомбинантный HBsAg серотипа ауw (S-полипептид), рекомбинантный HBsAg, конъюгированный с пероксидазой хрена и раствор тетраметилбензидина (ТМБ) произведены НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород). Также использовали 96-луночные полистироловые планшеты «MaxiSorp» фирмы «Nunc» (Дания), стрептавидин-пероксидазу фирмы «Biosource» (США), LC-LC-биотин фирмы «Pierce» (США), BrCN фирмы «Fargmacia» (Швеция), другие реактивы фирмы «Sigma» (США).

Получение мышиных МКА описано нами ранее [1]. Используемые в настоящей работе МКА распознают как рекомбинантный, так и нативный HBsAg в реакции иммуноблоттинга и ИФА (формат сэндвич-метода) [1]. МКА получали из асцитной жидкости брюшной полости мышей и с помощью хроматографии на ДЕАЕ-сефарозе доводили до чистоты более 95% по описанной ранее методике [1, 5].

Для иммунизации кур использовали HBsAg, выделенный из сыворотки крови. Иммунизацию птиц проводили с интервалом 10 дней. Для первой иммунизации 0,75 мл раствора антигена (150 мкг) эмульгировали в 0,15 М NaCl с 0,75 мл полного адьюванта Фрейнда и подкожно вводили курам в 8 — 10 точек спины (75 мкг на одну птицу). В дальнейшем использовали неполный адьювант Фрейнда. Антитела выделяли из яиц, собранных после четвертого раунда иммунизации. Антитела выделяли из желтков яиц иммунизированных антигеном кур по методу Polson A. et al. [7] и затем подвергали аффинной очистке по описанной ранее методике [5] на BrCN-сефарозе, конъюгированной с рекомбинантным HBsAg в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Концентрацию ПКА кур в полученной фракции определяли спектрофотометрически. В работе использовали очищенные антитела ПКА № 1 и ПКА № 2, полученные от двух разных кур.

МКА 18C8 адсорбировали на поверхность планшетов (3 мкг/мл, 100 мкл на лунку, 16 — 20 часов при комнатной температуре) в 0,1 М глицин-HCl буфере pH 2,8. ПКА № 1 кур адсорбировали в 0,1 М глицин-HCl буфере pH 2,8 (6 мкг/мл), ПКА № 2 кур — в 0,025 М Na-фосфатный буфере, pH 7,5 (12 мкг/мл). Прочие условия были, как указаны выше. Насыщенные антителами планшеты инкубировали 120 мин при 42°C с разведениями рекомбинантного HBsAg, меченного пероксидазой хрена (1 — 64 нг/мл) в 0,025 М Na-фосфатном буфере (pH 7,5), со-

держателем 0,15 М NaCl, 0,2% БСА и 0,05% твина 20 (ELI-буфер). Иммуные комплексы, содержащие пероксидазу, регистрировали после реакции с ТМБ на планшетном сканере при 450 нм, как описано ранее [4].

Антитела адсорбировали на поверхность полистироловых планшетов, как описано выше в следующих буферах (концентрация антител составляла 10 мкг/мл): 0,1 М глицин-HCl буфер, pH 2,8; 0,025 М Na-фосфатный буфер, pH 7,5 и 0,05 М Na-гидрокарбонатный буфер pH 9,5. Затем определяли активность адсорбированных антител по связыванию с меченым пероксидазой рекомбинантным HBsAg, как описано выше.

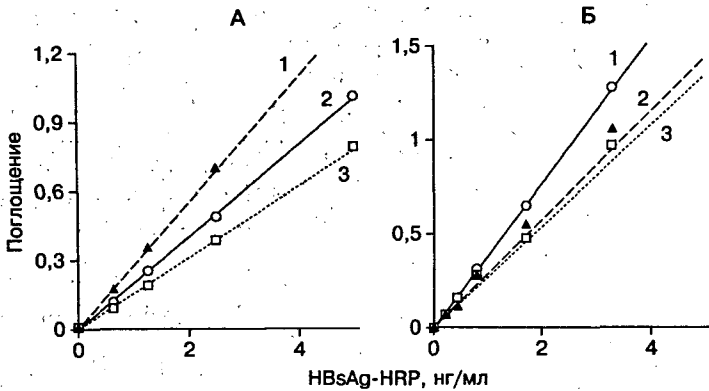
Растворами тестируемых антител (1, 2, 3, 6, 12 и 24 мкг/мл) в буфере с оптимальным pH адсорбции насыщали полистироловые планшеты и определяли антигенсвязывающую активность, как описано выше.

Полистироловые планшеты насыщали антителами (МКА 18С8 или ПКА кур), как описано выше. Инкубационная смесь в конечном объеме 100 мкл включала 50 мкл стандарта (рекомбинантного HBsAg), разведенного в ELI-буфере (1 — 16 нг/мл) и 50 мкл раствора биотинилированных детектирующих антител в ELI-буфере в концентрациях 50 нг/мл F3/F4; 500 нг/мл ПКА № 1; 500 нг/мл ПКА № 2. Антитела биотинилировали, следуя рекомендациям фирмы «Pierce», как описано нами ранее [4]. Планшеты инкубировали 120 мин при 42°C. После отмывки в лунки добавляли раствор (50 нг/мл) стрептавидин-пероксидазы в ELI-буфере с 1% казеина. После инкубации (30 мин, 42°C) и отмывки иммуные комплексы окрашивали тетраметилбензидином (ТМБ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящей работе проанализировали эффективность двух образцов ПКА кур (ПКА № 1 и ПКА № 2), полученных от двух иммунизированных HBsAg птиц, в сравнении с ранее описанными МКА желтой, специфичными к HBsAg [1, 4]. Концентрация специфических ПКА в желтке составила 50 мкг/мл. Сравнение МКА и ПКА кур проводили на модели определения HBsAg в твердофазном ИФА. В качестве эталона сравнения были выбраны мышинные МКА 18С4 и МКА F3/F4 и ранее сконструированный на их основе сэндвич-метод определения HBsAg с минимальной детектирующей дозой около 0,017 нг/мл HBsAg [1, 4]. В данном тесте в качестве иммобилизованных антител используются высокоэффективные МКА 18С8, а в качестве детектирующих антител — МКА F4/F3, конъюгированные с биотином. Специфичность этого сэндвич-метода была продемонстрирована нами ранее на стандартной панели HBsAg-положительных и HBsAg-отрицательных сывороток, предоставленных НПО «Диагностические системы» [1].

На первом этапе для оценки антигенсвязывающей способности ПКА кур их сравнили после адсорбции на твердую фазу с эталонными мышинными МКА 18С8, которые характеризуются высокой эффективностью в качестве иммобилизованных антител в сэндвич-методе определения HBsAg [1, 4]. В качестве параметра сравнения использовали тангенсы угла наклона линейных участков кривых связывания (обозначенных буквой  $k$ ) рекомбинантного HBsAg (меченного пероксидазой хрена) с адсорбированными на полистироловых планшетах антителами (МКА или куриными ПКА), как показано на рис., на примере одного из опытов. Этот метод (сравнение угловых коэффициентов кривых) является общепринятым способом количественной характеристики аналитической чувствительности [6]. В табл. 1 представлены сводные данные по результатам сравнения угловых коэффициентов ( $k$ ) кривых связывания меченого HBsAg с иммобилизованными МКА 18С8, ПКА № 1 и ПКА № 2. При этом важно подчеркнуть, что эти сравнения проводили при оптимальных для каждого антитела условиях пассивной адсорбции (pH адсорбционных буферов и концентрации антител), которые определялись заранее (табл. 1). Прямая адсорбция является наиболее распространенным спо-



**Связывание HBsAg с мышиными МКА 18С8 и ПКА кур в различных вариантах твердофазного ИФА.**

А. Связывание рекомбинантного HBsAg, меченного пероксидазой, с иммобилизованными (при оптимальных рН адсорбции и насыщающих концентраций Ig) МКА 18С8 и куриными ПКА № 1 и ПКА № 2. Типичные кривые связывания: (1) для ПКА № 2,  $y=0,28x$ ; (2) для МКА 18С8,  $y=0,20x$ ; (3) для ПКА № 1,  $y=0,16x$ . Б. Связывание HBsAg с иммобилизованными (при оптимальных рН адсорбции и насыщающих концентраций Ig) МКА 18С8 и куриными ПКА № 1 и ПКА № 2 в сэндвич-методе. Типичные кривые связывания: (1) для МКА 18С8,  $y=0,38x$ ; (2) для ПКА № 2,  $y=0,29x$ ; (3) для ПКА № 1,  $y=0,2$ .

собом иммобилизации антител на поверхность твердой фазы, что обусловлено простотой методики и ее невысокой стоимостью [2]. Однако известно, что до 90% МКА после адсорбции на поверхность полистироловых планшетов денатурируется, утрачивая способность связывать антиген [2, 4]. Также показано, что аналитическая чувствительность твердофазных систем во многом зависит от биологической активности иммобилизованных антител [2], а одним из важных факторов, оказывающих влияние на сохранение этой активности, является, в частности, рН адсорбционных буферов [4]. Учитывая это, важно было определить оптимальные значения рН адсорбции для каждого из антител. Ранее нами было уже установлено, что пассивная адсорбция МКА 18С8 на полистироловые планшеты при рН 2,8 приводит к значительно лучшему сохранению их активности по сравнению с иммобилизацией при рН 7,5 или 9,5 [1, 4]. Для определения оптимальных значений рН-адсорбции для ПКА кур сравнивали угловые коэффициенты ( $k$ ) кривых связывания меченного пероксидазой рекомбинантного HBsAg с антителами, иммобилизованными при различных рН (в глициновом, рН 2,8; Na-фосфатном, рН 7,5 и карбонатном, рН 9,5 адсорбционных буферах). Тестируемые антитела сорбировали в концентрации 10 мкг/мл, что для большинства антител является избыточной насыщающей концентрацией [2]. Оказалось, что для ПКА № 1 оптимальной оказалась адсорбция в глициновом буфере с рН 2,8, что обеспечивало статистически значимое (примерно на 30%) повышение аналитической чувствительности, по сравнению с адсорбцией при рН 7,5, в то время как для ПКА № 2 оптимальной была адсорбция при рН 7,5 (табл. 1). Для определения оптимальной насыщающей концентрации адсорбируемых антител также строили кривые связывания

Таблица 1. Угловые коэффициенты ( $k$ ) линейных участков кривых связывания HBsAg, меченного пероксидазой хрена, с мышиными МКА 18С8 и ПКА № 1 и ПКА № 2 кур, иммобилизованными на поверхности полистироловых планшетов при оптимальных рН адсорбции и насыщающих концентраций антител

Тестируемые антитела	Оптимальный рН адсорбции	Оптимальная концентрация сорбируемых антител (мкг/мл)	Коэффициент кривой связывания ( $k \times 10$ ) ( $n=8$ )
ПКА № 1	2,8	6	$1,62 \pm 0,13$
ПКА № 2	7,5	12	$2,83 \pm 0,08$
МКА 18С8	2,8	3	$2,07 \pm 0,07$

вания меченого HBsAg с иммобилизованными ПКА № 1 и № 2 при различных концентрациях антител в адсорбционных буферах, имеющих оптимальные для иммобилизации рН. Значения оптимальных концентраций антител в адсорбционных буферах для ПКА № 1, ПКА № 2 и МКА 18С8 составили 12, 6 и 3 мкг/мл, соответственно (табл. 1). Дальнейшее увеличение концентраций антител в буферах не улучшало связывания твердой фазы с антигеном.

Как можно видеть из табл. 1 и рис. А, максимальную активность при связывании с меченым пероксидазой HBsAg продемонстрировали куриные ПКА № 2 ( $\kappa=0,283\pm0,008$ ). При их использовании аналитическая чувствительность метода возросла примерно на 40% по сравнению с МКА 18С8 ( $\kappa=0,207\pm0,007$ ). В то же время, ПКА № 1 имели более слабую антигенсвязывающую активность, чем МКА 18С8.

На следующем этапе мы проанализировали эффективность ПКА № 1 и ПКА № 2 при их использовании в качестве иммобилизованных или детектирующих антител в сэндвич-методе определения HBsAg, по сравнению с МКА 18С8 и МКА F3/F4. Описанный подход иллюстрирует рис. Б. На нем представлены результаты одного из экспериментов, в котором МКА 18С8 и куриные ПКА адсорбировали (в оптимальных условиях) на поверхность планшетов, а в качестве детектирующих антител использовали МКА F4/F3, меченные биотином. В качестве критерия эффективности антител, как и в предыдущих опытах, использовали аналитическую чувствительность, определяемую по угловым коэффициентам кривых связывания ( $\kappa$ ). Сводные данные по аналитической чувствительности сэндвич-метода определения HBsAg с использованием различных комбинаций иммобилизованных и детектирующих антител представлены в табл. 2. Как можно видеть, замена МКА на ПКА кур ни в одном из вариантов сэндвич-метода не приводила к улучшению его аналитической чувствительности (возрастанию  $\kappa$ ). Так, если ПКА использовались в качестве иммобилизованных антител (эксперимент № 1), а детектирующими были меченные биотином МКА F3/F4, наблюдалось снижение аналитической чувствительности примерно на 30%. В эксперименте № 2 (меченные биотином ПКА кур — детектирующие, МКА 18С8 — иммобилизованные антитела) значения  $\kappa$  уменьшались в 15 — 20 раз, несмотря на — высокую концентрацию в инкубационной смеси меченых куриных ПКА (250 нг/мл).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нам удалось получить аффинно-очищенные ПКА кур, которые после адсорбции на твердую фазу показали в определенных условиях, а именно, в опытах по связыванию с меченым пероксидазой HBsAg более высокую эффективность, чем эталонные МКА мышей 18С8. С другой стороны, вопреки ожиданиям мы не обнаружили преимуществ ПКА кур по сравнению с мышинными МКА, ни в качестве иммобилизованных, ни в качестве детектирующих антител при их испытании в «полном» сэндвич-методе определения HBsAg. Причины такого несовпадения не ясны, однако можно предположить, что в определенной степени это связано с особенностями структуры молекул IgY, не имеющих шар-

Таблица 2. Эффективность мышинных моноклональных антител и поликлональных антител кур в сэндвич-методе определения HBsAg

№ эксперимента	Адсорбированные антитела	Антитела, меченные биотином (конъюгат)	Концентрация конъюгата в инкубационной смеси (нг/мл)	Коэффициент калибровочной кривой $\times 10$ (n=8)
I	МКА 18С8	МКА F4/F3	25	3,84±0,15
	IgY № 1			2,68±0,10
	IgY № 2			2,86±0,08
II	МКА 18С8	IgY № 1	250	0,23±0,06
		IgY № 2	250	0,14±0,01

нирной области и поэтому менее «гибких» по сравнению с молекулами IgG [8]. В результате при использовании ПКА кур в сэндвич-методе, возможно, возникают стерические препятствия к бивалентному взаимодействию антител с молекулами антигенов, уменьшая прочность иммунных комплексов. Известно, что в сэндвич-методе образуются комплексы с линейной и циклической структурой, причем последние, возникающие за счет бивалентного связывания, более стабильны [5].

Обращает на себя внимание также тот факт, что куриные ПКА № 1 лучше связывали HBsAg после их иммобилизации в адсорбционных растворах с pH 2,8, по сравнению с традиционными буферами, имеющими pH 7,5 и 9,5. Это несколько неожиданный факт, хотя ранее были описаны МКА млекопитающих, лучше сохраняющие свою активность при адсорбции в буферах с очень низкими или очень высокими значениями pH, чем в буферах с pH 7,5 и 9,5, чаще всего используемых в твердофазном ИФА [4]. В частности, адсорбция МКА 18С8 при pH 2,8 приводила к увеличению аналитической чувствительности сэндвич-метода определения HBsAg, сопровождавшейся снижением на порядок минимально детектируемой дозы HBsAg, по сравнению с иммобилизацией в буферах с pH 9,5 и 7,5 [1, 4]. Однако известно, что IgY птиц менее устойчивы к денатурации в кислых условиях, чем IgG млекопитающих [8, 9]. Тем не менее, полученные результаты предполагают, что куриные ПКА, также как и МКА мышей, гетерогенны в отношении чувствительности к pH адсорбции, что необходимо учитывать при их применении. Некоторые авторы также сообщали об относительной кислотоустойчивости полученных ими ПКА кур в условиях их экспериментов [3].

Получены ПКА кур, показавшие после их адсорбции на полистироловые ИФА планшеты, более высокую способность связывать меченный пероксидазой HBsAg по сравнению с эталонными мышинными МКА 18С8, эффективными в качестве иммобилизованных антител в сэндвич-методе определения HBsAg. Однако переход от сравнений в указанных модельных опытах к применению ПКА кур в сэндвич-методе определения HBsAg, в том числе, замена ими МКА 18С8, привел не к ожидаемому увеличению, а напротив, снижению аналитической чувствительности данного метода. Возможно, это связано с меньшей «гибкостью» молекул IgY, по сравнению с IgG, что затрудняет бивалентное связывание и образование высокоавидных циклических иммунных комплексов. Данные факты и предположения не могут отрицать возможности использования ПКА птиц, в частности кур, в лабораторной диагностике инфекционных, в том числе, вирусных болезней. Скорее всего, они указывают на необходимость более глубокого изучения их физико-химических свойств и определения адекватных поставленным задачам областей применения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлева Д.А., Дмитриев А.Д., Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Павлова Е.В., Пыренкова И.Ю., Смирнова М.Б., Сегал О.Л., Тараканова Ю.Н., Уланова Т.И., Фартушная О.Н., Шарипова И.Н., Коляскина Г.И., Лавров В.Ф. Использование pH-чувствительных иммобилизованных моноклональных антител для оптимизации иммуноферментного сэндвич-метода определения поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg). Журн. микробиол. 2010, 2: 85-89.
2. Butler J.E., Ni L., Nessler R. et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. J. Immunol. Methods. 1992, 150: 77-90.
3. Camenisch G., Tini M., Chilov D. et al. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . FASEB J. 1999, 13: 81-88.
4. Dmitriev A.D., Tarakanova J.N., Yakovleva D.A., Dmitriev D.A., Phartooshina O.V., Kolyaskina G.I., Massino Yu.S., Borisova O.V., Segal O.L., Smirnova M.B., Ulanova T.I., Lavrov V.F. Monoclonal antibodies requiring coating buffer with low pH for efficient antigen capture in

- sandwich ELISA: the rarities or practically important phenomena? J. Immunoassay. Immunochem. 2013, 34: 414-437.
5. Nikulina V.A., Kizim E.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova M.B., Avilov V.V., Saprigin D.B., Smotrov S.P., Tichtchenko V.A., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. Synergistic effects in antigen-capture ELISA using three monoclonal antibodies directed at different epitopes of the same antigen. Clin. Chim. Acta. 2000, 299: 25-44.
  6. Pardue H.L. The inseparable triad: analytical sensitivity, measurement uncertainty, and quantitative resolution. Clin. Chem. 1997, 43: 1831-1837.
  7. Polson A., von Wechmar M.B., Fazakerley G. Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. Immunol Commun. 1980, 9: 495-514.
  8. 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. Altern. Lab Anim. 2005, 33: 129-154.
  9. Spillner E., Braren I., Greunke K. et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. Biologicals. 2012, 40: 313-22.

Поступила 20.08.15

Контактная информация: Дмитриев Дмитрий Александрович, к.б.н.,  
115088, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*Е.В.Сорокина<sup>1</sup>, Н.К.Ахматова<sup>1</sup>, С.А.Сходова<sup>1</sup>, Е.Л.Чалая<sup>2</sup>, С.А.Масюкова<sup>2</sup>*

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ РАННЕЙ ЭРИТЕМНОЙ СТАДИИ БОЛЕЗНИ ЛАЙМА С УЧЕТОМ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУНОГЕНЕЗА**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Медицинский институт усовершенствования врачей высшего профессионального образования Московский государственный университет пищевых производств, Москва

*Цель.* Изучение врожденного и адаптивного иммунитета у больных мигрирующей эритемой, клинической эффективности комбинированной терапии с применением вакцин. Иммуновак и динамики иммунологических показателей в результате терапии. *Материалы и методы.* Обследованы 37 взрослых пациентов с мигрирующей эритемой. Больные были разделены на 2 группы: 1 гр. (14 чел.) — Иммуновак интраназально-подкожным методом на фоне базисной терапии; 2 гр. (23 чел.) — терапия доксициклином 200 мг/сут 21 день. Перед началом лечения и через 1 месяц после терапии у больных были изучены: фагоцитарная активность нейтрофилов крови; экспрессия TLRs на мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (МЛПК) и клетках кожи в очагах методом проточной цитометрии с применением МАТ к TLR2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 с использованием проточного цитометра FC-500; субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови; уровень про-, противовоспалительных и регуляторных цитокинов в сыворотке крови методом ИФА; IgG, IgM, IgA в сыворотке крови. *Результаты.* У больных мигрирующей эритемой выявлен высокий уровень экспрессии TLR2, 4, 7, 8 на клетках кожи в очагах, TLR2, 4 — на клетках крови; низкое содержание CD95+ и CD25+, высокий уровень в сыворотке IL-1b, IL-2 и IL-4, повышение уровня общего IgE. Иммуновак способствовал повышению CD95+ и CD25+, синтезу IFN-γ, в большей степени снижал уровень общего IgE, чем базисная терапия. *Заключение.* Включение в терапию больных мигрирующей эритемой Иммуновак способствует повышению клинической эффективности и коррелирует с коррекцией иммунологических нарушений.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 51—56

Ключевые слова: мигрирующая эритема, Toll-подобные рецепторы, вакцина Иммуновак