

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ IGY-ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ HBsAg

В.Б. Сбойчаков¹, С.В. Борисенко², А.М. Сокурова³

¹Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в мире зарегистрировано свыше 300 млн. человек, больных вирусным гепатитом В [16, 19]. Однако эти данные приблизительны и не отражают истинное число носителей HBsAg, так как при использовании высокочувствительных иммунологических тестов частота носительства HBsAg среди здорового населения может вырасти в 5–6 раз [12]. В России все пациенты, поступающие на стационарное лечение, обязаны обследоваться на наличие HBsAg, а сотрудники медицинских лабораторий – обследоваться на наличие этого маркера ежегодно [2]. Основным методом этиологической лабораторной диагностики вирусного гепатита В помимо клинико-биохимических признаков, является выявление поверхностного антигена вируса – HBsAg (Hepatitis B surface antigen) [1, 3].

Производство диагностических антител к HBsAg является длительным и дорогостоящим. Мы испробовали более гуманную и рентабельную биологическую модель для получения диагностических иммуноглобулинов. Это желточные иммуноглобулины (Ig Y, от англ. yolk) от различных видов птиц. Ig Y не вызывают ложноположительных реакций при тестировании на HBsAg, так как птицы эволюционно представляют собой отдельную ветвь развития, отличную от млекопитающих [10,20]. Получение яиц от иммунизированных птиц, вполне физиологично, в то время как получение сыворотки крови у лабораторных животных-млекопитающих – болезненная процедура, часто окончившаяся летально. Взятие крови в больших объемах часто приводит к смерти животного-донора [6, 17].

Цель исследования. На основе использования литературных данных и собственных исследований изучить возможности использования так называемых желточных антител для индикации HBsAg, как основного маркера вирусного гепатита В.

Материалы и методы. В качестве антигена для иммунизации использовали рекомбинантную вакцину против гепатита В фирмы «Engerix B™» (Бельгия), содержащую HBsAg, сорбированный на гидроокиси алюминия. Для усиления иммунного ответа применяли адъювант «Montanide ISA 70 VG» фирмы «Seppic» (Франция), который смешивали с антигеном до однородной эмульсии.

В качестве птиц-продуцентов использовали 47 перепелок вида *Coturnix japonica* породы «Фараон». Птицы были получены из ОАО «Перепелочка» (поселок Терволово Ленинградской области). Согласно требованиям SPF (specific pathogen free) [21] проверяли перепелок на наличие возбудителей кокцидиоза, сальмонеллёза, лейкоза и саркомы птиц, а также – болезни Гамборо, инфекционного бронхита и ларинготрахеита, реовирусного теносиновита, инфекционной анемии, болезни Ньюкасл, гриппа птиц, респираторного микоплазмоза и инфекционного синовита.

Перепелок иммунизировали дозой 200 мкг однократно в область тимуса. Ежедневно контролировали появление специфических антител (HBsAb) в пробах крови. В течение всего наблюдения у иммунизированных птиц не отмечены постинъекционные осложнения. Патологоанатомическое вскрытие показало, что в месте распределения иммунизирующего антигена воспаление визуально не определялось. Ткани тимуса и мышц перепелок не имели определяемых визуально изменений. Иммунизация птиц HBsAg практически не оказывала влияния на их физиологические функции и не приводила к снижению яйценоскости.

В литературе описано три группы методов получения желточных иммуноглобулинов [8,13,20]. Это, в первую очередь, методы осаждения различными химическими веществами, хроматографические методы (ионообменная хроматография, гель-хроматография) и ультрафильтрация.

Для выделения Ig Y мы использовали метод осаждения сернокислым аммонием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Отделение овоальбуминов от желточных шаров проводили следующим способом. Яйцо после обработки антисептиком вскрывали с «тупой» стороны и его одержимое помещали на марлевую салфетку медицинской плотностью 36 г./м² [4], увлажненную 0,85 % раствором хлорида натрия.

Освобождали желток от белка покачиванием, затем желточную массу разводили дистиллированной водой в 5 раз. После перемешивания центрифугировали 30 минут при температуре +12 °С на центрифуге «MLW k-80» фирмы «Medizin Technik» (Германия) при 2200 об./мин. К супернатанту добавляли равный объём трихлорметана (CHCl_3) и перемешивали в течение 30 мин. Вновь повторяли центрифугирование, но уже при 8000 об./мин. и температуре +4 °С. Искомые Ig Y находились в верхней водной фазе.

Чистота полученных Ig Y определялась электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии лаурилсульфата натрия ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$). При этом белки находились в растворе, содержащем, отрицательно заряженный детергент – лаурилсульфат натрия. По результатам электрофореза обнаружено два вида белков с унифицированными единицами атомной массы 70 и 21 соответственно. Это равно массе «тяжёлых» и «лёгких» цепей Ig Y.

Анализ информации осуществляли с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 for Windows. В основном, использовали методы непараметрической статистики [5, 14].

Результаты. На сегодняшний день основным методом лабораторной диагностики инфекционных заболеваний является иммуноферментный анализ [7, 9, 15]. Далее сконструировали тест-систему на основе твердофазного иммуноферментного анализа для индикации HBsAg в сыворотках крови больных.

Сорбцию выделенных нами IgY в лунках полистироловых планшетов осуществляли в 0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфере (pH 9,5–9,6) в течение ночи (14–16 часов) при температуре +6 °С. Оптимальная концентрация IgY составила 100 мкг/мл. Прочие компоненты для осуществления анализа по индикации HBsAg брали из диагностической тест-системы «Вектоген-HBs-антиген-стрип» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Реакцию осуществляли согласно прилагаемой инструкции производителя.

Учет результатов реакции проводили фотометрически при длине волны 492 нм. Для измерения величин оптической плотности продукта ферментативной реакции применяли вертикальный спектрофотометр (ридер) «Microplate Reader MP-6000» фирмы «Meredith Diagnostics» (Англия).

Для тестирования разработанной нами тест-системы на основе желточных иммуноглобулинов для индикации HBsAg в сыворотках больных использовали 35 сывороток больных с диагнозом «вирусный гепатит В», у которых ранее был выявлен HBsAg. В качестве контрольной группы исследовали 32 сыворотки, полученные от здоровых доноров.

Основными и главными характеристиками диагностических тест-систем являются чувствительность и специфичность. Для определения этих показателей использовали методы непараметрической статистики, в частности, – четырехпольные таблицы взаимной сопряженности (табл. 1).

Таблица 1. Четырехпольная таблица для расчета диагностических показателей тест-системы на основе Ig Y

Исследуемые сыворотки	Серопозитивные в ИФА	Серонегативные в ИФА	Всего
Сыворотки, содержащие HBsAg	ИП (32)	ЛО (3)	ИП+ЛО (35)
Сыворотки, не содержащие HBsAg	ЛП (4)	ИО (28)	ЛП+ИО (32)
Всего	ИП+ЛП (36)	ЛО+ИО (31)	ИП+ЛП+ИО+ЛО (67)

где: ИП – заведомо положительные; ЛП – ложноположительные; ЛО – ложноотрицательные; ИО – заведомо отрицательные.

Чувствительность (Ч), то есть способность разработанного метода давать правильный результат, определяемый как доля истинно положительных результатов среди всех проведенных анализов, выявляли по формуле (1). Специфичность (С) то есть способность разработанного метода не давать при отсутствии заболевания ложноположительных результатов, определяется как доля истинно отрицательных результатов среди здоровых лиц в группе исследуемых (2). Также определяли такие характеристики разработанной нами тест-системы как прогностичность положительного и отрицательного результатов. Эти показатели определяют количество действительно положительных или действительно отрицательных результатов анализа при наличии или отсутствии болезни или носительства HBsAg.

Прогностичность положительного значения вычисляли по (3). Аналогичное отрицательное значение определяли по формуле (4).

Также вычисляли такой интегративный показатель анализа как диагностическую эффективность (комбинация диагностической чувствительности и специфичности теста), который характеризует долю истинных результатов среди всех результатов лабораторного теста (5).

$$Ч = ИП / ИП + ЛО \times 100 \%. \quad (1)$$

$$С = ИО / ИО + ЛП \times 100 \%. \quad (2)$$

$$ПЗ_{+} = ИП / ИП + ЛП \times 100 \%. \quad (3)$$

$$ПЗ_{-} = ИО / ИО + ЛО \times 100 \%. \quad (4)$$

$$ЭФ = ИП + ИО / ИП + ЛП + ИО + ЛО. \quad (5)$$

После несложных расчетов было показано, что чувствительность разработанной нами тест-системы на основе IgY-антител для индикации HBsAg составила 91,4 %, специфичность – 87,5 %, прогнозируемое положительное значение – 88,9 %, отрицательное – 90,3 %, а диагностическая эффективность приблизилась к 90 % (89,6 %).

Дискуссия. Применение в биотехнологии птиц для получения специфических иммуноглобулинов гораздо эффективнее по следующим причинам: птицы эволюционно представляют собой отдельную ветвь развития хордовых организмов, что снижает риск возможных ложноположительных реакций при исследовании биологических жидкостей млекопитающих; получение птичьих яиц – это чисто физиологическое явление, в данном случае никакое насилие над животными не применяется; многие птицы обладают высокой яйценоскостью – до 300 яиц в год, то есть практически по одному яйцу в день, что позволяет получать большое количество Ig Y-антител.

Поскольку молекула Ig Y не имеет шарнирной области, то желточные антитела менее подвержены протеолитической деградации и фрагментации за счет присутствия на ее месте зоны ограниченной гибкости на основе пролиновых и глициновых аминокислотных остатков [18,20]. Более того IgY не взаимодействуют с Fc-рецептором, ответственным за осуществление многочисленных эффекторных функций; не способны активировать комплемент, не связываются с ревматоидным фактором и не обладают перекрестной реактивностью с тканями человека.

При разработке IgY-технологий основным источником сырья служат куры (*Gallus domesticus*), однако куры, как и другие птицы, в связи с более низкой, чем у перепелок температурой тела, гораздо чаще инфицированы различными возбудителями бактериальной и вирусной природы. У кур гораздо сложнее поддерживать статус SPF [21]. Температура тела перепелок на 2 °C выше, чем у других видов птиц и составляет 41–42 °C, поэтому они не чувствительны к большинству птичьих патогенов.

Перепелиные яйца являются высококачественным диетическим продуктом, их также можно позиционировать как функциональные продукты питания (Food for Specific Health Use) [11]. Яйца перепелок буквально насыщены витаминами B₁ и A, минералами (железо и калий). Перепелиные яйца довольно редко вызывают аллергических реакций, поэтому могут быть рекомендованы и детям. Питательная ценность перепелиных яиц в 4 раза выше, чем куриных [10].

Помимо этого, перепелки обладают малой массой тела, что позволяет содержать их на малых производственных площадях. Они также отличаются высокой яичной продуктивностью. Перепелки имеют короткий период полового созревания, яйцекладка у них не зависит от сезона года. Использование перепелок в качестве продуцентов IgY-антител экономически более рентабельно, чем использование других видов животных, поскольку финансовые затраты на единицу массы получаемых антител значительно ниже.

Заключение. Оптимизирована технология получения и очистки желточных антител (IgY). В качестве птиц-продуцентов IgY наиболее целесообразно использовать перепелок вида *Coturnix coturnix japonica*. Показана реальная возможность использования IgY для индикации HBsAg. Особенностью IgY является устойчивость к трипсину и химотрипсину. Это в перспективе открывает возможности для энтеральной этиотропной терапии вирусного гепатита В. IgY-технологии, даже если они и нуждаются в дальнейших совершенствованиях, несомненно, будут иметь большое значение для биотехнологии и медицины во всем мире.

Литература

Приказ Минздрава РФ от 21 октября 2002 г. № 322 «О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека».

Совместный Приказ Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации и Министерства здравоохранения Российской Федерации от 31.12.2020 г. № 988н/1420н «Об утверждении перечня вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные медицинские осмотры при поступлении на работу и периодические медицинские осмотры».

Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 г. № 4 "Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». – Регистрационный № 62500 – 1092 с.

Межгосударственный стандарт ГОСТ 9412–93 «Марля медицинская. Общие технические условия» (введен в действие постановлением Комитета РФ по стандартизации, метрологии и сертификации от 18 января 1995 г. № 6).

Бакаева, О.А. Разработка визуального метода исследования зависимости категориальных переменных на основе таблиц сопряженности / О.А. Бакаева // Образовательные ресурсы и технологии. – 2014 – вып. 1/4. – С. 270–276.

Денисов, А.В. Этические аспекты использования животных в современных экспериментальных исследованиях / А.В. Денисов, В.А. Чепракова, А.В. Анисин, С.И. Безруков // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2018. – № 3 (63). – С. 238–243.

Долгов, В.В. Иммунохимический анализ в лабораторной медицине / В.В. Долгов. – М. – Тверь: ООО «Издательство Трида», 2015. – С. 34–38.

Иванов, А.П. Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций / А.П. Иванов, Т.Д. Клеблеева, О.Е. Иванова // Вопросы вирусологии. – 2020. – № 65(1). – С. 21–26.

Кропанева, М.Д. Нанозимы на основе берлинской лазури и иммуноанализ / М.Д. Кропанева, П.В. Храпцов, М.Б. Раев // Актуальная биотехнология – 2020. – № 3(34). – С. 294–297.

Сбойчаков, В.Б. Перепелиные яйца как диетический продукт и лекарство / В.Б. Сбойчаков, С.В. Борисенко // Мат-лы V Международного Балтийского морского форума. – Калининград: изд-во БГАРФ. – 2017. – С. 146–147.

Сбойчаков, В.Б. Желточные антитела (IgY) для диагностики и терапии инфекционных заболеваний / В.Б. Сбойчаков // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2020. – Т.39, № S3–2. – С. 145–150.

Сологуб, Т.В. Носительство HBsAg: состояние или болезнь? / Т.В. Сологуб, Е.В. Эсауленко, М.Г. Романцов, И.В. Фолитар // Инфекционные болезни. – 2008. – Т.6, № 3. – С. 5–10.

Юдина, А.Н. Способ селективного выделения и очистки иммуноглобулинов (IgY) из желтка яиц сельскохозяйственной птицы / А.Н. Юдина, А.А. Красноштанова // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр., том XXXIV (234). – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2020 – С. 21–24.

Corder, G.W. Nonparametric statistics: a step-by-step approach. Second edition / G.W. Corder, D.I. Foreman // John Wiley & Sons. – 2014. – 452 p.

Engvall, E. The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay / E. Engvall // Clinical Chemistry. – 2010. – № 56(2). – P. 319–320.

Golzar, H. Pre S1 mutations alter the large HBsAg antigenicity of a hepatitis B virus strain isolated in Bangladesh / H. Golzar, M. Muket, N. Nazmul, U. Keiji // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – № 2 (15). – P. 546.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council, National Academy Press, 2011. – 246 p.

Pereira, E.P. / Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health // E.P. Pereira, M.F. van Tilburg, E.O. Florean, M.I. Guedes // Int. Immunopharmacology. – 2019. – № 79. – P. 293–303.

Resolution WHA 63.18. Viral hepatitis. In Sixty-third World Health Assembly // Geneva: World Health Organization. – 2017. – 63 p.

Schade, R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine / R. Schade, E.G. Calzado, R. Sarmiento, P.A. Chacana // Altern. Lab. Anim. – 2005/ – № 33(2). – P. 129–54.

Yeoman, C. J. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract / C. J. Yeoman, N. Chia, P. Jeraldo, M. Sipos, N. D. Goldenfeld, B. A. White // Anim. Health Res. Rev. – 2012. – Vol. 13. – Pp. 89–99.