

УДК 619.615.383: 591.339: 615.375

IgY-технологии. Желточные антитела птиц

© 2017 г. В.С. КАПЛИН*, О.Н. КАПЛИНА

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора,
Новосибирская обл., Кольцово 630559

*e-mail: kaplin_vs@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 08.06.2016

Принята в печать 13.07.2017

Данный обзор посвящен относительно новому направлению в иммунологии – IgY-технологиям, т.е. получению и использованию специфических антител из желтков яиц иммунизированных птиц. В связи с неинвазивностью данного подхода эти технологии признаны серьезной альтернативой получению антител из сыворотки крови млекопитающих. Более того, количество антител, которое можно получить от одной курицы в 15–17 раз больше, чем от одного кролика за тот же период. Желточные антитела успешно используются для пассивной иммунизации человека и сельскохозяйственных животных. IgY-антитела обладают большей авидностью, чем IgG-антитела млекопитающих, что дало возможность использовать их в иммунодиагностике. В связи с вышесказанным, IgY-технологии представляют исследовательский и практический интерес.

Ключевые слова: IgY-технологии, IgY-антитела, желточные антитела, пассивная иммунизация.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-2-29-40

В 1893 г. Ф. Клемперер (F. Klemperer) [1] впервые описал феномен передачи специфических антител против столбнячного токсина из сыворотки иммунизированных кур в яичный желток. Однако это открытие не было по достоинству оценено современниками. Лишь начиная с 1959 г., когда были опубликованы «Принципы гуманной экспериментальной техники» [2], интерес к открытию Ф. Клемперера стал возрастать. Изучение молекулярной структуры куриных антител проводилось рядом исследователей; интересно, что они называли обнаруженные иммуноглобулины IgG, так же, как обозначается основной класс иммуноглобулинов млекопитающих. Г.А. Лесли и Л.В. Клем (G.A. Leslie, L.W. Clem) в 1969 г. предложили название IgY (yolk – желток) [3], после того, как они смогли показать различия между иммуноглобулинами, обнаруженными в куриных яйцах, и IgG млекопитающих.

IgY является основным классом иммуноглобулинов, который был обнаружен как в сыво-

ротке крови, так и в желтках яиц птиц, рептилий и земноводных [4]. Яичный желток – обильный источник иммуноглобулинов, общее содержание которых превышает 100 мг на одно куриное яйцо. Кроме того, выделение IgY из яичного желтка – процедура относительно простая.

Такое большое содержание и многообразие птичьих антител дало возможность использовать их для пассивной иммунизации. Эксперименты на животных и на человеке выявили большой потенциал пассивной иммунизации в защите от разнообразных вирусных и бактериальных патогенов. В частности, убедительные результаты были получены при полевых испытаниях на телятах, поросятах, утках, рыбах, креветках и других сельскохозяйственных животных [5, 6]. Клинические испытания, проведенные на добровольцах, показали, что при многолетнем пероральном введении IgY-антитела сохраняют эффективность, к ним не возникает привыкание и они не оказывают токсического действия [5, 7–10].

Список сокращений: ИФА – иммуноферментный анализ; ПЭГ – полиэтиленгликоль; НАМА (Human Anti-Mouse IgG Antibodies) – человеческие антимышиные антитела; IgY (Immunoglobulins of Yolk) – иммуноглобулины желтка; PBS (Phosphate-Buffered Saline) – физраствор, забуференный фосфатом; RF (Rheumatoid Factor) – ревматоидный фактор.

Антитела как реагент занимают ведущее место в иммунологических анализах. Традиционно их получали от млекопитающих различных видов. Начиная примерно с 1980 г. стали регулярно появляться публикации о применении в иммунологических исследованиях птичьих желточных антител. Единственным видом птиц, антитела которого изучены достаточно хорошо, является курица; тем не менее, утиные, перепелиные и даже страусиные желточные антитела с успехом используются в аналитической иммунохимии [11–13]. В 1995 г. производство желточных антител стали называть “IgY-технологией” [14]; термин получил международное признание и используется для описания производства и применения этого типа антител.

Имуноглобулин Y имеет свои отличительные черты, которые важны для использования в различных областях исследований, особенно в диагностике. Аффинность желточных антител выше аффинности IgG-антител млекопитающих; они не дают ложных результатов, так как не взаимодействуют ни с комплементом, ни с ревматоидным фактором, ни с человеческими антимышечными антителами (НАМА), отрицательное влияние которых на качество иммуноферментного анализа с каждым годом увеличивается. Разумное сочетание птичьих IgY и IgG млекопитающих в одном диагностикуме приводит к повышению его чувствительности и специфичности и снижению фона определений.

Применение IgY-технологий невозможно без разработки процедур выделения и очистки птичьих IgY. Поэтому помимо обсуждения свойств и возможностей применения этих антител данный обзор содержит также описание наиболее эффективных методик выделения и очистки куриных и перепелиных желточных иммуноглобулинов.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА IgY

Имуноглобулин IgY является преобладающим низкомолекулярным сывороточным изотипом иммуноглобулином амфибий, рептилий и птиц. Его концентрация в сыворотке кур-несушек составляет от 5 до 15 мг/мл [15]. По первичной структуре IgY очень похож на IgE млекопитающих: его тяжелая цепь состоит из четырех постоянных и одного переменного доменов (у млекопитающих IgG содержит три постоянных и один переменный домен). IgY кур имеет молекулярную массу ~180 кДа (коэффициент седиментации 7,8 S),

а IgG млекопитающих ~150 кДа (коэффициент седиментации 7,0 S). Молекула IgY состоит из двух идентичных тяжелых (H) и двух идентичных легких (L) цепей, которые связаны дисульфидными мостиками. Молекулярная масса тяжелой цепи IgY составляет ~68 кДа, легкой цепи ~18 кДа. Масса тяжелой и легкой цепей IgG примерно равна – 50 кДа и 25 кДа, соответственно [8]. В состав легких цепей иммуноглобулинов IgY кур и уток входят только λ -цепи [16].

Fc-фрагмент иммуноглобулинов является местом осуществления большинства биологических эффекторных функций. H-цепь IgY содержит две углеводные боковые цепи в отличие от одной цепи у IgG. Эти углеводные фрагменты расположены на доменах Cv2 и Cv3 тяжелой цепи, в отличие от IgG, у которого они связаны с Cv2-доменами. Кроме того, IgY отличается от любого иммуноглобулина млекопитающих по составу сахаридов; он содержит олигосахариды типа $\text{Glc}_1\text{Man}_{7,9}\text{GlcNAc}_2$ [17].

У гусинообразных иммуноглобулины представлены двумя изоформами – полная (IgY) и усеченная (IgY Δ Fc), в то время как у кур существует только полная изоформа. Обе изоформы являются продуктом одного гена. Тяжелая цепь IgY(Δ Fc) гусинообразных усечена на два домена с C-конца – она утратила домены Cv3 и Cv4 [18] и имеет молекулярную массу 120 кДа (коэффициент седиментации 5,7 S). Следовательно, и функции IgY(Δ Fc) также изменены. IgY(Δ Fc) не способен к опсонизации и фиксации комплемента [14, 19] и, предположительно, играет роль в нейтрализации только свободных антигенов. Соотношение полной и усеченной форм IgY в сыворотке утки непостоянно и составляет от 15–25% до 85–75% при гипериммунизации бычьим сывороточным альбумином [19].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА IgY

Изоэлектрическая точка (pI) IgY (5,7–7,6) ниже изоэлектрической точки IgG (6,1–8,5); IgY более гидрофобен, чем IgG [20].

Коэффициенты молярной экстинкции IgY курицы и IgG кролика различны (1,36 против 1,43) [21].

Время биологического полураспада молекул IgY в сыворотке кур составляет 36–65 ч [22, 23], в то время как период полураспада IgG кролика и IgG человека составляет 7 сут и 21 сут, соответственно. IgY-антитела появляются в яичном желт-

ке с задержкой на 3–4 дня по сравнению с их появлением в крови кур. Также было установлено, что существуют циркадные ритмы уровня IgY в сыворотке и в желтке кур: цикл колебаний уровня IgY в сыворотке составляет 4 сут, а в желтке – 7 сут [24].

Птичьи антитела проявляют довольно высокую термостабильность. При 4°C в присутствии азида натрия они могут храниться несколько лет без потери специфической активности. Также они сохраняют свою активность в течении 6 мес при комнатной температуре, в течение одного месяца при температуре 37°C и в течении 15 мин при 70°C [25].

Молекула IgY относительно устойчива к трипсину и химотрипсину, но неустойчива к пепсину. Так, активность IgY полностью утрачивалась в результате переваривания пепсином, но сохранялась на уровне 39% и 41% после 8 ч инкубации с трипсином или химотрипсином, соответственно [24].

Стафилококковый белок А, стрептококковый белок G, белок L из пептострептококка – это бактериальные белки, которые широко используются для аффинного выделения IgG млекопитающих. Стафилококки и стрептококки часто встречаются в бактериальных образцах. Они могут связываться с антителами и вызывать ошибочные результаты при иммунном анализе. Куриные антитела не реагируют ни с одним из указанных контаминантов и могут поэтому быть использованы для решения проблем, связанных с интерференцией Fc-рецепторов [26].

Относительно недавно был обнаружен трансмембранный белок M из человеческой микоплазмы, который оказался идеальным средством для очистки антител млекопитающих и птиц. Использование колоночной аффинной хроматографии с иммобилизованным белком M дает возможность отказаться от многостадийной процедуры при выделении IgY из яичных желтков птиц [27].

К недостаткам IgY-технологий можно отнести затруднения с образованием иммунных осадков (преципитатов) при смешивании раствора антигена с раствором антитела. Динамика образования осадка напоминает кривую, полученную с лошадиными антителами, а именно, осадок быстро растворяется в присутствии избытка антигена. Для увеличения уровня преципитации необходимо повышать молярность раствора NaCl с 0,15 M до 1,5 M [20].

ПРЕИМУЩЕСТВА ПОЛУЧЕНИЯ IgY ПЕРЕД ПОЛУЧЕНИЕМ IgG

Одним из основных требований по содержанию лабораторных животных является их благополучие и сведение к минимуму числа болезненных манипуляций. IgY-технологии отвечают этому требованию, так как получение куриных антител сводится к неинвазивному сбору яиц (по сравнению со стрессовыми кровотечениями у животных при получении сыворотки). Хранить яйца можно при 4°C в течение 6 мес и более без потери активности антител. IgY-технологии также имеют большие экономические преимущества, так как затраты на содержание кур ниже, чем на содержание кроликов. Кроме того, количество IgY, полученное от одной курицы, примерно соответствует количеству IgG, полученному от овцы или козы. Иными словами, одна курица способна произвести примерно 17–35 г IgY в год, причем 2–10% этих иммуноглобулинов являются антигенспецифичными в отличие от IgG млекопитающих, уровень специфичности которых не превышает 1–5% [15, 28, 29]. Куриный IgY проявляет высокую avidность (10^9 л/моль) уже после первой иммунизации. Для того, чтобы достичь аналогичных значений avidности у овцы, например, она должна получить не менее четырех бустерных инъекций [30]. Стоимость 1 г куриных антител составляет примерно 10 долл., в то время как 1 г IgG млекопитающих стоит 20000 долл. [31].

Поистине огромное количество антител, доступных благодаря IgY-технологиям, и их низкая себестоимость открывают возможности для применения IgY-антител в новых областях, таких как иммунотерапия и иммунопрофилактика.

IgY-ТЕХНОЛОГИИ В ВЕТЕРИНАРИИ

Пассивная иммунизация может быть описана как процесс, с помощью которого предварительно сформированные антитела вводятся в организм животного и снижают или полностью подавляют инфекцию. Млекопитающие кормят потомство молозивом или молоком, в которых содержится большое количество антител – это естественная пассивная иммунизация. В яйцах птиц кроме питательных веществ обнаружено большое количество антител классов IgY, IgA и IgM, которые защищают будущего птенца от инфекций. Это тоже естественная пассивная иммунизация. Важно, что использование гетерологичных (кури-

ных) антител при лечении и профилактике заболеваний других животных дает быстрый и надежный результат без осложнений.

Успешное терапевтическое применение IgY-антител против патогенных штаммов *Escherichia coli* описано при лечении телят и поросят. Исследования с использованием обеих групп модельных животных в промышленных условиях были проведены несколькими коллективами ученых [32–36]; результаты подтвердили эффективность IgY-терапии.

В качестве патогена использовали энтеротоксигенный штамм *E. coli*. Контрольные телята получали яичный порошок от неиммунизированных кур с добавлением молока. В этой группе в результате инфекции была отмечена тяжелая диарея и обезвоживание, а смертность составляла 100% через 72 ч после заражения. Экспериментальную группу телят кормили молоком, содержащим порошок яичного желтка от иммунизированных кур; у них отмечали переходную диарею, 100%-ную выживаемость и значительное увеличение массы тела в течение всего исследования [32].

В качестве другой модели использовали 3-дневных поросят. Опытные животные получали желточный порошок от кур, иммунизированных энтеротоксигенным штаммом *E. coli* K88, а контрольные – порошок от неиммунизированных кур. Результаты показали, что после скармливания иммунных желтков симптомы диареи исчезали через 24 ч; контрольные животные продолжали испытывать сильную диарею, которая в 62% случаев заканчивалась летальным исходом [32].

Утятам пекинской породы ежедневно добавляли в питьевую воду яичные желтки кур, иммунизированных *Salmonella enteritidis*. Эксперимент продолжался 28 сут. Показано, что пассивная оральная иммунизация может служить инструментом для защиты домашней птицы при однократной инфекции сальмонеллой [37].

Для оценки лечения у коров маститов (клинического и экспериментального), вызванных инфекцией *Staphylococcus aureus*, использовали интрамаммарные инфузии специфических куриных IgY-антител. В качестве контроля проводили аналогичные инфузии пенициллина. При использовании IgY излечение зафиксировано в 83,3% и 50% случаев при клинической и экспериментальной инфекции, соответственно, а при терапии пенициллином – в 66,7% и 33,3% случаев, соответственно. Эти результаты показали, что куриные IgY могут служить альтернативой антибиотикам при терапии маститов [38].

Vibrio splendidus является одним из самых вредных, широко распространенных и высоковирулентных патогенов, который вызывает синдром изъязвления кожи у дальневосточного трепанга. Целые клетки бактерии *V. splendidus* были использованы в качестве иммуногена. IgY получали из яичных желтков иммунизированных этим патогеном кур-несушек. Твердофазный иммуноферментный анализ показал высокую специфичность при анализе IgY-антител против *V. splendidus* (максимальный титр антител 320000). Защитный эффект антител оценивали после внутрибрюшинных инъекцией трепангам анти-*V. splendidus* IgY-антител; он выражался в 80%-ном выживании в течение 11-дневного периода эксперимента. Этот показатель был значительно выше, чем у животных контрольной группы, которые получали IgY от неиммунизированных кур ($P < 0,05$) [39].

В обзорах Kovacs-Nolan и Mine, а также Kumaran и Citarasu [5, 6] описаны данные по успешной пассивной иммунизации IgY-антителами при лечении и профилактике ряда инфекций, вызванных *E. coli*: сальмонеллеза, инфекционного бурсита, кокцидиоза (цыплята), бычьего ротавируса (коровы), вирусной диареи (свиньи), парвовируса (собаки) и некоторых других заболеваний.

IgY-ТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

Муковисцидоз. Одним из самых успешных клинических применений IgY-технологий было подавление инфекции синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*), колонизирующей дыхательные пути пациентов с муковисцидозом (кистозным фиброзом). Хронические инфекции, вызванные этой бактерией, могут привести к дыхательной недостаточности и преждевременной смерти. В группе пациентов из Швеции была применена методика пассивной иммунизации с использованием полоскания рта специфическими IgY-антителами. У пациентов, получавших IgY-терапию в течение 12 лет, удалось снизить прием антибиотиков, и только в двух случаях в выделениях пациентов был выявлен возбудитель. В мокроте пациентов контрольной группы были обнаружены 13 культур возбудителя заболевания, при этом 24% из этих пациентов стали хрониками по синегнойной инфекции. Этот самый длительный эксперимент по приему IgY, кроме прочего, показал безвредность и эффективность данной терапии [40].

Helicobacter pylori – спиральный грамотрицательный микроаэрофильный патоген, обычный обитатель желудка и слизистой оболочки двенад-

цатиперстной кишки. Микроорганизм считается одним из наиболее распространенных в человеческой популяции патогенов. По некоторым данным, он заражает более 50% населения во всем мире и признается этиологическим агентом гастрита и язвенной болезни; его также связывают с развитием аденокарциномы желудка и лимфомы. Применение антибиотиков решает проблему лишь отчасти. Необходимы альтернативные методы лечения, основанные на контролируемом снижении активности *H. pylori*.

В Японии был разработан функциональный продукт – питьевой йогурт, с антителами против уреазы *H. pylori*. Состав йогурта был рассчитан таким образом, чтобы на один прием приходилось 2 г желтков иммунизированных кур. Для оценки наличия *H. pylori* в желудке человека был использован изотопный метод определения ^{13}C в выдыхаемом воздухе, базирующийся на способности уреазы указанной бактерии превращать мочевины в аммиак, который нейтрализует микросреду в слизистой оболочке желудка. В эксперименте участвовали 174 добровольца. Дыхательные тесты проводили на 4, 8 и 12-й неделе после начала лечения. Результаты тестов показали значительные изменения, начиная с 8-й недели. Уровень C^{13} в CO_2 снижался на 55,1% на 8-й неделе и на 57,2% на 12-й неделе [41]. Хотя полная ликвидация патогенного заселения в желудке, по-видимому, невозможна, уменьшение бактериальной нагрузки привело к улучшению качества жизни инфицированных пациентов. Другие клинические исследования с использованием куриных антител против уреазы *H. pylori*, проведенные на Тайване [42] и в Корее [43], показали аналогичные результаты.

Ротавирусная диарея. В рандомизированном двойном слепом исследовании 79 детям с установленной ротавирусной диареей назначали 10 г гипериммунного яичного желтка ежедневно в четырех равных дозах в течение 4 дней (опытная группа) либо аналогичный препарат, полученный от непривитых кур (контрольная группа). Ежедневно наблюдали частоту стула, а также количество и наличие ротавируса в кале в течение 4 дней. В опытной группе, получавшей IgY, было отмечено значительное снижение объемов стула (до 87 ± 59 мл), в контрольной группе – до 120 ± 75 мл. В эксперименте наблюдали заметное уменьшение потребления воды – до 84 ± 46 мл/кг массы/сут, а в контрольной группе – до 122 ± 72 мл/кг массы/сут. При этом клиренс вируса на 4-й день составил 73% в опытной группе против 46% в

контрольной. Эти результаты показывают положительную роль IgY в лечении ротавирусной диареи у детей [44].

В ряде обзоров описаны результаты клинических испытаний эффективности лечения и профилактики некоторых заболеваний человека: кариеса молочных зубов у школьников, вызванного *Streptococcus mutans*; периодонтита; угревой сыпи; кандидоза, вызванного *Candida albicans* и ряда других инфекций. Есть также сведения о проведении испытаний на животных по пассивной иммунизации при лечении и профилактике таких заболеваний как целиакия, грипп, СПИД, язвенный колит, особо опасные инфекции, а также при укусах ядовитых животных и действии токсинов [5, 7–10].

Пассивная иммунизация с использованием желточных антител (IgY), становится все более привлекательной в плане эффективности и стоимости. Возможность получения большого количества нейтрализующих антител ставит IgY-технологии на лидирующие позиции при лечении и профилактике многих заболеваний.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЖЕЛТОЧНЫХ АНТИТЕЛ ПТИЦ В ДИАГНОСТИКЕ

Поскольку птицы филогенетически разошлись с млекопитающими довольно давно, курица является в ряде случаев лучшим источником антител против антигенов млекопитающих, чем сами млекопитающие. Это особенно актуально для высоко консервативных белков, таких как гормоны, демонстрирующие небольшие различия в аминокислотном составе между близкородственными видами [45]. В ИФА использование филогенетически разных источников антител (вторых антител от млекопитающих, первых антител от кур) может привести к усилению сигнала в 3–5 раз по сравнению с использованием в обоих случаях антител млекопитающих [46], что свидетельствует о повышении чувствительности тест-системы.

IgY и IgG сопоставимы по антигенсвязывающей специфичности, и они оба помогают обнаружить антигены с высокой индивидуальностью [47]. Однако у IgY есть ряд преимуществ по сравнению с IgG. Так, например, куриные антитела связываются с большим количеством эпитопов на белках млекопитающих, что приводит к усилению сигнала в иммунологическом анализе [45]. Использование IgY может также существенно уменьшить помехи, возникающие из-за пере-

крестных реакций. Перекрестная реактивность может наблюдаться между несколькими IgG-антителами от разных видов млекопитающих. IgY настолько отличается от IgG, что указанный фон снижается до минимальных значений [48].

Взаимодействие антител с компонентами комплемента

В большинстве иммунологических анализов используется захват антител и их взаимодействие с твердой фазой. Когда анализируемый образец сыворотки добавляют к антителам, система комплемента в образце активируется и антитела на твердой фазе взаимодействуют с одним из компонентов комплемента. Активированный C1q-компонент комплемента взаимодействует с Fc-фрагментом антитела на твердой фазе, не вызывая существенных помех в иммунном анализе. Активированные компоненты C3b и C4b, напротив, блокируют Fab-фрагменты антител, что приводит к снижению сигнала. Было показано, что активация комплемента может помешать связыванию антигена с антителом при иммунометрии тиреотропного гормона и уменьшить реальные значения сигнала до 40% [49, 50].

Известно, что во время хранения система комплемента инактивируется в разной степени в различных образцах, что вызывает аналитическую ошибку при иммуноферментном анализе этих образцов. Куриные антитела не активируют систему комплемента человека и, таким образом, могут способствовать снижению помех при иммунологическом анализе [51].

Взаимодействие антител с ревматоидным фактором и человеческими анти-мышинными IgG-антителами

Наличие RF и НАМА в анализируемых образцах – наиболее известные причины ложноположительных или ложноотрицательных реакций при иммунологическом анализе [52, 53]. RF – это аутоантитела (как правило класса M), которые реагируют с Fc-фрагментами IgG человека. Эти антитела часто встречаются у больных с ревматоидным артритом, но могут присутствовать и в сыворотке пациентов со многими другими заболеваниями [54]. Все большее число пациентов подвергаются лечению мышинными моноклональными антителами. Эта процедура часто вызывает образование у пациента ответных антител. Широкое

использование моноклональных и поликлональных антител в иммунотерапии увеличивает количество пациентов, у которых в сыворотке содержатся НАМА.

RF или НАМА могут реагировать как с иммобилизованным антителом, так и с антителом обнаружения при сэндвич-анализе, имитируя антигенную активность и искажая результаты. Они могут также взаимодействовать с антителом обнаружения, приводя к образованию иммунных комплексов, которые влияют на активность антител. НАМА способны реагировать с антигенсвязывающим эпитопом и ингибировать его реакцию с антигеном. Ошибки, вызванные анти-IgG-антителами, были обнаружены в 40% образцов сыворотки здоровых людей при иммуноферментном анализе [55]. Помехи, вызванные RF и НАМА, имеют тенденцию к увеличению по мере повышения чувствительности анализа.

RF и НАМА искажают результаты нефелометрии и турбидиметрии при изменении размеров комплекса антиген-антитело [56].

Куриные IgY-антитела не реагируют с RF или НАМА, и их применение способствует снижению помех, обусловленных этими факторами [50, 51].

Анализ взаимодействия Fc-рецепторов млекопитающих с иммуноглобулинами

Fc-рецепторы для домена IgG обеспечивают важную связь между специфичным гуморальным ответом и клеточной ветвью иммунной системы. Связывание IgG с Fc-рецепторами может вызвать множественные биологические ответы – фагоцитоз, эндоцитоз, антителозависимую клеточную цитотоксичность, высвобождение медиаторов воспаления, а также усиление презентации антигена [57].

Для анализа взаимодействия Fc-рецепторов с иммуноглобулинами в клинических лабораториях используется, в частности, проточная цитометрия, которая позволяет обнаруживать белки на поверхности клеток. В этой системе меченые антитела используются для детекции специфических маркеров. Когда антитело реагирует с антигеном, образуется иммунный комплекс. Иммунные комплексы, содержащие антитела млекопитающих, могут взаимодействовать с Fc-рецепторами или компонентами комплемента на клетках, что может привести к клеточной активации и изменению в экспрессии генов поверхностных белков. Было показано, что образование иммунных

комплексов, содержащих антитела млекопитающих, может послужить причиной ошибочных результатов, например, при измерении степени активации тромбоцитов [58]. Показано также [58], что куриные антитела в подобных взаимодействиях не участвуют.

Анализ взаимодействия бактериальных Fc-рецепторов с иммуноглобулинами

Стафилококковый белок А и стрептококковый белок G являются Fc-связывающими бактериальными протеинами, которые широко используются в иммунохимии благодаря их способности реагировать с IgG млекопитающих.

Стафилококки и стрептококки часто обнаруживаются в бактериальных препаратах; они могут связываться с антителами обнаружения, что приводит к ошибочным результатам анализа. Из-за иммунологического сходства Fc-рецепторов IgG часто связываются с другими иммуноглобулинами млекопитающих, но не с птичьими IgY. Куриные антитела не реагируют с белками А и G [59] и, таким образом, нивелируют проблемы, связанные с измерением антигенной активности бактериальных Fc-рецепторов.

В литературе описано много примеров использования IgY-антител в ИФА, автордиографии, конкурентном иммуноферментном ингибировании, двойной иммунопреципитации, ингибировании гематглютинации, иммуноанализе, иммуноблоттинге, иммуноэлектрофорезе, иммуногистохимии, латекс-агглютинации, радиоиммуноанализе, радиальной иммунодиффузии, ракетном иммуноэлектрофорезе, зональном электрофорезе и др. [59–62]. Практика показывает, что применение птичьих антител в иммунологическом анализе создает предпосылки не только для повышения чувствительности методов, но и, например, для минимизации помех (ложных сигналов), которые все чаще затрудняют использование аналитических иммунологических методов.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПТИЧЬИХ ЖЕЛТОЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Как уже говорилось выше, применение куриных IgY-антител является более удобным по сравнению с IgG-антителами млекопитающих. Во-первых, это неинвазивный способ извлечения антител, во-вторых, от одной курицы можно получить в 15–17 раз больше иммуноглобулинов,

чем от одного кролика за тот же период [14, 23]. Дополнительное преимущество применения IgY состоит в филогенетической дистанции, которая разделяет птиц и млекопитающих, что позволяет производить специфические антитела против консервативных антигенов (гормонов) [63].

В обзоре Ren et al. [64] рассмотрены основные методы выделения IgY из желтков птиц.

Технологию выделения куриных желточных иммуноглобулинов можно разбить на два этапа: первый – выделение IgY путем удаления липидов и перевода иммуноглобулинов в водорастворимую фракцию; второй – дальнейшая очистка иммуноглобулинов с помощью осаждения, хроматографии или фильтрации.

Методы выделения IgY

В большинстве работ использовалось ручное отделение яичного желтка, что обеспечивает полное разделение желтка и белка яйца. Лишь в нескольких публикациях (см., например, [65]) описана промышленная очистка яичного желтка, который, однако, был на 20% загрязнен яичным белком.

Из научной литературы известны многочисленные методы удаления липидов из желтка яиц птиц [66], однако наиболее эффективными считаются осаждение полиэтиленгликолем, разбавление водой (с регулированием pH и без), разбавление водой с замораживанием и без, осаждение или экстракция органическими растворителями и др.

Polson et al. [14] были первыми, кто ввел использование полиэтиленгликоля (ПЭГ) (до конечной концентрации 3,5%) для извлечения IgY из яичного желтка. Они улучшили свой метод [67], увеличив разбавление желтков буфером с 2:1 до 4:1. Позже Polson модифицировал протокол из-за относительно низкого выхода IgY после обработки ПЭГ (50% от общего содержания) [68]. В измененной методике был использован хлороформ в качестве растворителя для липидов. Несмотря на то, что хлороформ является денатурирующим агентом, иммуноглобулины, полученные этим методом, не теряли активность.

Jensenius et al. [63] впервые ввели в методику с использованием декстрансульфата упрощение в виде разведения яичного желтка водой. Липиды желтков агрегируют при 10-кратном разведении водой после замораживания и оттаивания. Путем центрифугирования удалось удалить достаточно большое количество липидов, чтобы

приступить к дальнейшей очистке куриных иммуноглобулинов.

Akita и Nakai [69] более подробно изучали вопрос о разведении желтков водой. Установление $\text{pH} < 5,0$ снижало количество выделенных иммуноглобулинов с 93% до 75%. При $\text{pH} 5-5,2$ уровень липидов в водорастворимой фракции становился минимальным, а содержание IgY, наоборот, достигало максимального значения.

Судя по опубликованным данным, использование хлороформа или разбавление водой являются наиболее эффективными методами выделения IgY.

Методы очистки IgY

Полученный на первой стадии очистки концентрат обычно содержит другие водорастворимые белки вместе с некоторыми незначительными примесями липидов или липопротеинов. Для устранения этих загрязнений могут быть использованы три способа очистки: осаждение, хроматография и фильтрация.

Преципитация солями, или высаливание, представляет собой традиционную технику очистки белков. Для IgY, в частности, были использованы сульфат аммония и сульфат натрия; при этом заметных различий в эффективности осаждения и чистоте препарата не наблюдали [70]. Процедуру, как правило, повторяют один или два раза, что коренным образом повышает чистоту IgY.

Наиболее высокий уровень содержания IgY и чистоты препарата достигается при осаждении антител желтка с добавлением ПЭГ [69] (до 12%, как в методе Polson A. с соавт. [67]). ПЭГ, кроме того, имеет дополнительное преимущество – он может использоваться при комнатной температуре, что снижает риск денатурации белка.

Hodek et al. [71] описали оригинальный и простой метод очистки куриных IgY. После замораживания и оттаивания, как рекомендовали Akita и Nakai [69], к образцу добавляли NaCl до конечной концентрации 8,8% (1,5 М) и pH раствора доводили до 4,0. Преципитация продолжалась в течение 2 ч. После центрифугирования и растворения осадка получался довольно чистый препарат куриного IgY (97%), что было показано с помощью электрофореза.

Для дальнейшей очистки IgY могут быть использованы различные хроматографические методы [66]; особенно эффективным из них представляется аффинная хроматография. Поскольку

бактериальные белки А, G и L не взаимодействуют с IgY, использовать их для аффинной очистки желточных антител невозможно.

Как уже отмечалось, трансмембранный белок М из человеческой микоплазмы обладает сильным сродством к иммуноглобулинам млекопитающих и птиц. Аффинная хроматография с использованием белка М является хорошей альтернативой другим вариантам очистки IgY и позволяет получать довольно чистый продукт [21].

В литературе описаны и другие способы очистки специфических IgY-антител с помощью аффинной хроматографии, которые мало отличаются от стандартных вариантов этой процедуры. Для элюции IgY-антител применяют щелочные [72] или кислотные [73] растворы.

Для крупномасштабного промышленного процесса наиболее приемлемыми являются методы очистки IgY с использованием традиционной фильтрации и ультрафильтрации [74].

Тем не менее, методика высаливания, в том числе с помощью NaCl, оказалась эффективнее с точки зрения затрат.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ IGY

Авторами были испытаны несколько вариантов выделения и очистки куриных IgY. Наиболее простой и в то же время эффективный способ выделения – разбавление водой. Вариант использования этого метода (постадийное описание) с некоторыми изменениями и дополнениями по сравнению с оригинальным протоколом [71] приведен в таблице.

Заметим, что для выделения и очистки IgY из перепелиных яиц описанная методика, как показали эксперименты, не подходит. Поэтому отделение липидов перепелиных желтков было проведено с использованием хлороформа (см. таблицу).

Использование этих методик дало нам возможность выделить и очистить антитела против пероксидазы хрена, химозина, осповакцины, *Streptococcus mutans* и др. При этом выход IgY из одного куриного яйца составил 80–140 мг.

Таким образом, использование желточных антител птиц предоставляет широкие возможности в области экспериментальной иммунологии, создания диагностических средств, в медицине при лечении и профилактике вирусных, бактериальных заболеваний и токсических поражений, а также в ветеринарии для профилактики болезней и лечения сельскохозяйственных животных.

Постадийное описание методов выделения и очистки IgY птиц (по [71] с изменениями и дополнениями) и перепелиных иммуноглобулинов по оригинальной методике**Stage-by-stage description of methods for isolation and purification of chicken IgY (according to [71] with modifications and supplements) and quail immunoglobulins (by the original protocol)**

Стадия	Очистка IgY из	
	куриных яичных желтков	перепелиных яичных желтков
1	Отделение желтка от белка	Отделение одного желтка (2,5–4,5 мл) от белка
2	Разбавление желтка водопроводной или дистиллированной водой в 6–10 раз	Разведение желтка с помощью PBS до общего объема 9 мл. Тщательное перемешивание
3	Доведение pH до 5,0 с помощью HCl	Добавление 5 мл хлороформа, интенсивное встряхивание и выдерживание в течение 2 ч при 4°C
4	Замораживание раствора и выдерживание при –20°C в течение ночи	Центрифугирование при 10000 g и 10°C в течение 15 мин
5	Медленное оттаивание	Добавление к отобранному супернатанту ПЭГ-6000 (до 12%). Тщательное перемешивание
6	Фильтрование через бумажный фильтр	Центрифугирование при 3000 g и 10°C в течение 5 мин
7	Добавление NaCl (1,5 M) до 8,8%	Отбрасывание супернатанта, растворение осадка в 5 мл PBS, после чего добавление 0,6 г ПЭГ-6000. Перемешивание суспензии
8	Доведение pH до 4,0 с помощью HCl	
9	Преципитация IgY в течение 2 ч при комнатной температуре	
10	Центрифугирование при 3000 g и 4°C в течение 10 мин	Центрифугирование при 3000 g и 10°C в течение 5 мин
11	Растворение осадка IgY в фосфатно-солевом буфере (PBS)	Отбрасывание супернатанта, растворение осадка в минимальном количестве PBS
12	Диализ против PBS	Диализ против PBS

IgY-технологии представляют собой альтернативу применению антибиотиков; они безопасны, эффективны и не вызывают привыкания. Важным преимуществом IgY-антител является их низкая цена. К сожалению, потенциал IgY-антител все еще востребован слабо. Причиной ограниченного использования IgY-технологий является низкая осведомленность исследователей об их преимуществах.

Данная публикация призвана пробудить интерес научного сообщества к использованию IgY-технологий в своей работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klemperer F. Ueber natuerliche Immunitat und ihre Verwertung fur die Immunisierungstherapie. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 1893, 31, 356–382.
2. Russell W. M. S. and Burch R.L. The principles of human experimental technique. London – UK, 1959, 1–238.
3. Leslie G.A. and Clem L.W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. *Immunoglobulins of the chicken. J Exp Med.*, 1969, 130(6), 1337–1352.
4. Marchalonis J.J. *Immunity in evolution.* Cambridge, Massachusetts, U.S.A.: Harvard University Press 1977, 1–336.

5. Kovacs-Nolan J. and Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.*, 2012, 3, 163–182. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101137
6. Kumaran T., and Citarasu T. IgY-technology: production of antibodies in chickens and use in therapy of infectious diseases. *Int. J. Sci. Res. Modern Education*, 2016, 1, 1, 29–35.
7. Kaplin V.S., Zaikovskaya A.V., Kaplina O.N. et al. Chicken Yolk Antibodies – a Promising Drug for Immunotherapy. In: Immunology Days in Siberia: Materials of XII All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation. Novosibirsk, August 27–29, 2015, 93–94.
8. Dubie T., Sisay T., Zeru F., et al. The potential application of avian egg antibodies with emphasis on immunotherapeutic and immunodiagnostic purpose. *J. Veterinary Medicine and Animal Health*, 2015, 7(5), 145–158. doi: 10.5897/JVMAH2014.0334
9. Rahman S., Nguyen S.V., Icatlo F.C., et al. Oral passive immunotherapeutics. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2013, 9(4), 1–10. doi: 10.4161/hv.23383
10. Kaplin V.S., and Kaplina O.N. IgY-Technology in Medicine. Using the yolk birds antibodies in immunotherapy. Belarusian electronic journal “*International surveys: Clinical Practice and Health*”, 2016, 4, 59–75.
11. Sboychakov V.B., Borisenko S.V., Sokurova A.M. The dynamics of titers changes of specific immunoglobulins to HBsAg in serum and yolk of quail eggs in case of using of different preparation for immunization. *Infection and Immunity*, 2011, 1, (3), 249–254.
12. Justiz Vaillant A.A., Akpaka P.E., McFarlane-Anderson N., et al. Purification of Immunoglobulin Y (IgY) from the Ostrich (*Struthio camelus*) by Staphylococcal Protein a (Spa) Affinity Chromatography. *J. Chromat Separation Techniq*, 2012, 3, 127. doi: 10.4172/2157-7064.1000127
13. Tsen Y.C., Kao G.Y., Chang C.L., et al. Evaluation and validation of a duck IgY antibody-based immunoassay for high-sensitivity C-reactive protein: avian antibody application in clinical diagnostics. *Clin. Chem*, 2003, 49(5), 810–813. doi: 10.1373/49.5.810 Published May 2003
14. Warr G.W., Magor K.E., Higgins D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today*, 1995, 16(8), 392–398. doi: 10.1016/0167-5699(95)80008-5
15. Rose M.E. Orlans E. and Buttress N. Immunoglobulin classes in the hen’s eggs: Their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol*, 1974, 4, 521–523.
16. Butler J.E. Immunoglobulin diversity, B-cell end antibody repertoire development in large farm animals. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1998, 17(1), 43–70.
17. Ohta M., Hamako J., Yamamoto S., et al. Structure of asparagine-linked oligosaccharides from hen egg yolk antibody (IgY). *Glycoconj. J.*, 1991, 8, 400. doi: 10.1007/BF00731292
18. Magor K.E., Higgins D.A., Middleton D.L., Warr G.W. One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. *J Immunol*, 1994, 153 (12), 5549–5555
19. Grey H.M. Duck immunoglobulins II. Biologic and immunochemical studies. *J. Immunol.*, 1967, 98, 820–826.
20. Polson A., von Wechmar M.B., and Fazakerley G. Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunol. Commun.*, 1980, 9(5), 495–514. doi: 10.3109/0882013800906611
21. Pauly D., Dorner M., Zhang X., et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poult. Sci.*, 2009, 88(2), 281–290. doi: 10.3382/ps.2008-00323
22. Patterson R., Youngner J.S., Weigle W.O. and Dixon F.J. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.*, 1962, 89, 272–278.
23. Wu J.J., Huang D.B., Pang K.R. and Tying S.K. Vaccines and Immunotherapies for the Prevention of Infectious Diseases Having Cutaneous Manifestations. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2004, 50, 495–528. doi:10.1016/j.jaad.2003.12.003
24. He J.X., Thirumalai D., Schade R., Zhang X.Y. Chronobiological studies of chicken IgY: monitoring of infradian, circadian and ultradian rhythms of IgY in blood and yolk of chickens. , 2014, 160(3–4), 266–272. doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.05.016
25. Shimizu M., Nagashima H., Sano K., et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, 56, 270. dx.doi.org/10.1271/bbb.56.270
26. Fischer M., and Hlinak A. The lack of binding ability of staphylococcal protein A and streptococcal protein G to egg yolk immunoglobulins of different fowl species (short communication). *Berl Munch Tierarztl. Wochenschr.*, 2000, 113(3), 94–96.
27. Jiang X., Diraviyam T., Zhang X. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) using a human mycoplasma protein. *J. Chromatogr B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2016, 15(1012–1013), 37–41. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.01.012
28. Li X., Nakano T., Sunwoo H.H., et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Sci.*, 1997, 77, 266.
29. Schade R., Pfister C., Halatsch R., and Henklein P. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) type antibodies in rabbits. *ATLA*, 1991, 19, 403.
30. Woolley J.A., and Landon J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens, 1995, 178(2), 253–265. dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)00263-V
31. Li, X. Production, application, and stability of chicken egg yolk antibody (IgY). University of Alberta, Spring. 2000, 1–125.
32. Mine Y., Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J. Medicinal Food*, 2002, 5, 159–169. doi: 10.1089/10966200260398198
33. Liou J.F., Shiau J.W., Tai C., and Chen R.L. Production of egg yolk immunoglobulin against *Escherichia coli* from white leghorn and lohmann chickens. *J. Animal and Veterinary Advances*, 2011, 10(18), 2349–2356. doi: 10.3923/javaa.2011.2349.2356
34. Terzolo H., Chacana P., Vivas A., et al. IgY technology in Argentina. *ALTEX*, 2003, 20, 202–203.
35. Wiedemann V., Linckh E., Kshlmann R., et al. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. V. *In vivo* studies on protective effects against *Escherichia coli* diarrhea in pigs. *Zentralbl. Veterinarmed. B*. 1991, 38(4), 283–291. doi: 10.1111/j.1439-0450.1991.tb00884.x
36. Yolken R.H., Leister F., Wee S.B., et al. Antibodies to rotavirus in chickens’ eggs: a potential source of antiviral immu-

- noglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics*, 1988, 81, 291.
37. Fulton R.M., Nersessian B.N., and Reed W.M. Prevention of Salmonella enteritidis infection in commercial ducklings by oral chicken egg-derived antibody alone or in combination with probiotics. *Poult. Sci.*, 2002, 81(1), 34–40. doi: 10.1093/ps/81.1.34
 38. Zhen Y.H., Jin L.J., Li X.Y., et al. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by Staphylococcus aureus. *Vet. Microbiol.*, 2009, 133(4), 317–322. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.07.016
 39. Li X., Jing K., Wang X., et al. Protective effects of chicken egg yolk antibody (IgY) against experimental Vibrio splendidus infection in the sea cucumber (Apostichopus japonicus). *Fish Shellfish Immunol.*, 2016, 48, 105–111. doi: 10.1016/j.fsi.2015.11.024
 40. Nilsson E.E., Larsson A., Olesen H.V., et al. Good effect of IgY against Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.*, 2008, 43(9), 892–899. doi: 10.1002/ppul.20875
 41. Yamane T., Saito Y., Takizawa S., et al. Development of Anti-Helicobacter pylori Urease IgY and Its Application for Food Product. *Food Processing and Ingredients*, 2003, 38, 70.
 42. Chen J.P., and Chang M.C. Effects of Anti-Helicobacter pylori Urease Antibody (IgY) as a Food Ingredient on the Decrease of H. pylori in the Stomach of Humans Infected with H. pylori. Taiwanese. *J. Agricult. Chem. Food Sci.*, (in Taiwanese), 2003, 41, 408–414.
 43. Horie K., Horie N., Abdou A.M., et al. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on Helicobacter pylori in humans. *J. Dairy Sci.*, 2004, 8 (12), 4073–4079. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73549-3
 44. Sarker S.A., Casswall T.H., Juneja L.R., et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutrition*, 2001, 32, 19–25. doi: 10.1097/00005176-200101000-00009
 45. Olovsson M., and Larsson A. Biotin labelling of chicken antibodies and their subsequent use in ELISA and immunohistochemistry. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1993, 16(2), 145–152. dx.doi.org/10.1016/0147-9571(93)90007-R
 46. Horton J.J., Holden C.A., Ward P.J., et al. Exploitation of phylogenetic distance in cell surface immune labeling: studies with beta2-microglobulin. *J. Invest. Dermatol.*, 1984, 85, 96–99. dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12274979
 47. Hatta H., Ozeki M., and Tsuda K. Egg yolk antibody IgG and its application. In Hen Eggs; Their basic and applied science. [Eds T. Yamamoto, L.R. Juneja, H. Hatta and M. Kim]. New York., USA, CRC press, 1997, 3–151.
 48. Carlander D., Stalberg J., and Larsson A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups. J. Med. Sci.*, 1999, 104, 179.
 49. Кapyаhо K., Tanner P., and Weber T. Effect of complement binding on a solid-phase immunometric TSH assay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1989, 49, 211–215.
 50. Larsson A., Karlsson-Parra A., Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin. Chem.*, 1991, 37(41), 1–414.
 51. Larsson A., and Mellstedt H. Chicken antibodies, a tool to avoid interference by human antimouse antibodies in ELISA after in vivo treatment with murine monoclonal antibodies. *Hybridoma*, 1992, 1, 33–39. doi: 10.1089/hyb.1992.11.33
 52. Boscato L.M., Stuart M.C. Heterophilic antibodies, a problem for all immunoassays. *Clin. Chem.*, 1988, 34, 27–33.
 53. Hechemy K.E., and Michaelson E.E. Latex particle assays in laboratory medicine. Part 11. *Lab Management*, 1984, 22, 26–35.
 54. Johnson P.M., and Faulk W.P. Rheumatoid factor: its nature, specificity, and production in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.*, 1976, 6, 416–430.
 55. Boscato L.M., and Stuart M.C. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin. Chem.*, 1986, 32, 1491–1495.
 56. Chambers R.E., Whicher J.T., Perry D.E., et al. Overestimation of immunoglobulins in the presence of rheumatoid factor by kinetic immunonephelometry and rapid immunoturbidimetry. *Ann. Clin. Biochem.*, 1987, 24, 520–524. doi: 10.1177/000456328702400518
 57. van de Winkel J.G.J., and Capel P.J.A. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today*, 1993, 14, 215–221. doi: 10.1016/0167-5699(93)90166-I
 58. Lindahl T.L., Festin R., and Larsson A. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: An improved method for detection of platelet activation. *Thromb. Haemostasis.*, 1992, 68, 221–225.
 59. Guss B., Eliasson M., Olsson A., et al. Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J.* 1986, 5, 1567–1575.
 60. Schade R., Staak C., Hendriksen C., et al. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21. *ATLA*, 1996, 24, 925–934.
 61. Dopico J.R., Alvarez M., Juvier A.I., et al. IgY antibodies in latex-agglutination assay. *Vacchi. Monitor.*, 2012, 21(2), 10–15.
 62. Munhoz L.S., Vargas G.D., Fischer G., et al. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. *Cienc. Rural.*, 2014, 44(1), 153–160. dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000100025
 63. Jensenius J., Andersen C., Hau J., et al. Eggs: conveniently packaged antibodies, methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, 1981, 46, 63–68.
 64. Ren H., Yang W., Thirumalai D., et al. A comparative evaluation of six principal IgY antibody extraction methods. *Altern. Lab. Anim.*, 2016, 44(1), 11–20.
 65. Fichtali J., Charter E.A., Lo K.V., and Nakai S. Purification of antibodies from industrially separated egg yolk. *J. Food Science*, 1993, 58, 1282–1285. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb06166.x
 66. De Meulenaer B. and Huyghebaert A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: A review. *Food Agricult. Immunol.*, 2001, 13(4), 275–288. dx.doi.org/10.1080/09540100120094537

67. Polson A., Coetzer T., Kruger J.E., et al. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of egg laid by immunized hens. *Immunol. Invest*, 1985, 14, 323–327. dx.doi.org/10.3109/08820138509022667
68. Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest*, 1990, 19, 253–258. dx.doi.org/10.3109/08820139009041840
69. Akita E. M., and Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Science*, 1992, 57, 629–633. doi: 10.1111/j.1365-2621.1992.tb08058.x
70. Deignan T., Kelly J., Alwan A., and O'Farrelly C. Comparative analysis of methods of purification of egg yolk immunoglobulin. *J. Agricult. Immunol.*, 2000, 12, 77–85. dx.doi.org/10.1080/095401000099643
71. Hodek P., Trefil P., Simunek J., et al. Optimized Protocol of Chicken Antibody (IgY) Purification Providing Electrophoretically Homogenous Preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2013, 8, 113 – 124.
72. Kuronen I., Kokko H., Mononen I., and Parviainen M. Hen egg yolk antibodies purified by antigen affinity under highly alkaline conditions provide new tools for diagnostics. Human intact parathyrin as model antigen. *European J. Clin. Chem. Clinical Biochem.*, 1997, 35, 435–440. doi: 10.1515/cclm.1997.35.6.435
73. Ntakarutimana V., Demedts P., Van Sande M., Scharpre S. A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrine from egg yolk. *J. Immunol. Methods*, 1992, 153, 133–140. dx.doi.org/10.1016/0022-1759(92)90315-K
74. Kim H., and Nakai S. Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. *J. Food Science*, 1998, 63, 485–490. doi: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15769.x

IgY-Technologies. Birds Yolk Antibodies

V.S. KAPLIN*, O.N. KAPLINA

The State Research Center for Virology and Biotechnology Vector, Rosпотребнадзор, Kol'tsovo, Novosibirskaya oblast Russia

e-mail: kaplin_vs@vector.nsc.ru

Received June 08, 2016

Accepted July 13, 2016

Abstract – This review is devoted to a rather new direction in immunology, IgY-technology, i.e. to the production and use of specific antibodies from yolks of immunized birds' eggs. This non-invasive approach makes IgY-technology a serious alternative to the production of antibodies from mammalian blood serum. Moreover, the amounts of antibodies that can be obtained from a chicken are by 15–17 times greater than that from one rabbit during the same period. Therefore, yolk antibodies have successfully been used for the passive immunization of humans and farm animals. IgY antibodies have greater avidity than mammalian IgG antibodies which makes possible their use in immunodiagnostics. In view of all said, IgY-technology provides new opportunities for researchers and practitioners.

Key words: IgY-antibodies, IgY-technologies, passive immunization, yolk antibodies.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-2-29-40