

© КОЗЛОВ В.Г., 2014

УДК 616.98:578.835.11]-078:615.373

*Козлов В.Г.*

### ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ ЭНТЕРОВИРУСНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СЫВОРОТКИ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

ФГУП "Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова" РАМН РФ, 142782, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита

---

*Многие повсеместно распространенные неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ) человека являются этиологическими агентами различных заболеваний. Традиционно лабораторную идентификацию НПЭВ до уровня серотипа проводят с помощью нейтрализующих типоспецифических сывороток. Производимые в ограниченных количествах лошадиные энтеровирусные референс-сыворотки недоступны для практических вирусологических лабораторий. В статье приведены результаты усовершенствования методов изготовления кроличьих энтеровирусных диагностических сывороток для реакции нейтрализации в объемах, актуальных для отечественного здравоохранения.*

*Ключевые слова:* энтеровирусы; энтеровирусные диагностические сыворотки; технология сывороточного производства.

*Kozlov V.G.*

NEW GENERATION OF POLICLONAL ENTEROVIRAL DIAGNOSTIC SERA

*M. P. Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, 27th km of Kiev Highway, Moscow Region, Russian Federation, 142782*

*The human non-polio enteroviruses (NPEV) are ubiquitous viruses found worldwide. NPEV are etiological agents of various diseases. Traditional method of identification NPEV is the detection of serotype with the use of neutralizing serotype-specific sera. Limiting amount of produced horse enteroviruses reference serum is not available for practical diagnostic laboratories. In the paper there are presented the results of the improvement of methods for delivery of diagnostic enteroviral rabbit sera for the reaction of neutralization in amounts sufficient to national health care.*

*Key words:* enteroviruses; enteroviral type-specific diagnostic sera; technology for production of sera.

---

В последнее время на фоне успешной борьбы с полиомиелитом объектами повышенного внимания и изучения стали неполиомиелитные энтеровирусы человека (НПЭВ), представленные вирусами Коксаки, ЕСНО и «нумеральными» энтеровирусами [1]. Более 60 серотипов НПЭВ являются этиологическими агентами разнообразных заболеваний [2—4]. Разные серотипы НПЭВ способны вызывать заболевания со сходными клиническими проявлениями, а индивидуальный возбудитель может быть причиной заболеваний с различной симптоматикой. Многообразие и повсеместная распространенность НПЭВ, высокая контагиозность энтеровирусных инфекций (ЭВИ) и отсутствие специфической профилактики служат источниками стабильно сохраняющегося высокого уровня зараженности населения. Предполагается, что в мире ежегодное количество случаев инфицирования может превышать миллиард [5]. При этом от 60 до 90% пострадавших являются детьми, а возраст половины пациентов не превышает 12 мес.

В последние десятилетия серьезной проблемой для здравоохранения многих стран стали масштаб-

ные вспышки острого геморрагического конъюнктивита (энтеровирус 70) [6] и ящуроподобного заболевания с неврологической симптоматикой (энтеровирус 71) [7, 8]. Расширение спектра проявлений ЭВИ и обнаружение все новых серотипов служат показателями продолжающейся эволюции НПЭВ [9—11]. Мощным катализатором дальнейшей активации ЭВИ и трансформации ее возбудителей может стать высвобождение экологической ниши, занимаемой полиовирусами, и ликвидация интерференционного пресса вакцинных штаммов в связи с предполагаемым завершением профилактики полиомиелита пероральной вакциной.

Принимая во внимание глобальную нестабильную ситуацию по ЭВИ, значительный социально-экономический ущерб, наносимый вспышками энтеровирусных заболеваний, и затраты на проведение противоэпидемических мероприятий, Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) в 2005 г. включила систему эпидемиологического надзора за НПЭВ в международную программу ликвидации полиомиелита [12]. Вследствие этиологического неостоянства ЭВИ, полиморфизма ее манифестных форм и широко распространенного бессимптомного носительства основными источниками диагностической информации являются лабораторные мето-

---

Для корреспонденции: *Козлов Виталий Григорьевич*, канд. мед. наук, нач. отд-ния диагностических препаратов, e-mail: vgzozlov@mail.ru

ды исследования. Золотым стандартом диагностики считается выделение возбудителей ЭВИ с их последующим типированием. Регламентированным ВОЗ и общепринятым способом идентификации НПЭВ является реакция нейтрализации, заключающаяся в блокировании инфекционности исследуемого агента поликлональными сыворотками известной специфичности.

Высокоактивные поликлональные сыворотки, идентифицирующие 42 типа энтеровирусов, были получены от обезьян и породистых лошадей [13—16]. Большие запасы лошадиных типоспецифических сывороток и их смесей, известных как препараты LBM (Lim, Benyech—Melnick и Melnick) [17, 18], истощились к 90-м годам XX века. Пришедшие им на смену 27 типоспецифических референс-сывороток RIVM (Bilthoven, NL) изготавливали в ограниченных количествах для специализированных лабораторий ВОЗ. Производство отечественных кроличьих поликлональных энтеровирусных сывороток было приостановлено в начале 2000-х годов из-за неудовлетворительных эксплуатационных характеристик.

Одновременно с существующей и уже ставшей традиционной серологической идентификацией энтеровирусов были открыты и начали стремительно развиваться молекулярно-генетические методы типирования. Было установлено, что для молекулярного типирования наиболее подходит участок генома, кодирующий основной белок капсида, VP1. Это давало возможность проводить типирование, сравнивая последовательности VP1 исследуемых и прототипных штаммов. Разработанная на этой основе высокоспецифичная полимеразная цепная реакция позволяла идентифицировать штаммы, не поддающиеся типированию традиционными методами, и выявлять потенциально новые типы энтеровирусов из числа «нетипируемых» штаммов [12]. Несмотря на высокую специфичность и быстроту молекулярно-генетических методик, основным способом типирования энтеровирусов, выполняемого практическими вирусологическими лабораториями, продолжает оставаться реакция нейтрализации, легко воспроизводимая с использованием стандартного оборудования, материалов и реагентов.

В связи с этим целью нашей работы было усовершенствование существующих и разработка новых методов и технологических приемов для экономически приемлемого производства актуальных для здравоохранения поликлональных энтеровирусных диагностических сывороток (ЭДС) для реакции нейтрализации.

Подробное описание разработанных методов и тест-систем имеется в соответствующей технической документации. Настоящая статья посвящена решению принципиальных вопросов сывороточного производства, позволивших осуществить не имеющее аналогов серийное промышленное изготовление кроличьих ЭДС 30 типов.

## Материалы и методы

Использовали прототипные штаммы вирусов Коксаки А (ВКА) 2, 4, 7, 9, 10, Коксаки В (ВКВ) 1—6, ЕСНО (ВЕ) 2—9, 11—13, 16, 20, 21, 25, 27, 29, 30, 33 и энтеровирусы (ЭВ) 68—71 из коллекции ФГУП «Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, РАМН». Типовая принадлежность НПЭВ была подтверждена в реакции нейтрализации с применением моновалентных (Н.Е.В. Atlanta, США; Univ. Kansas, США; Baylor Univ., США) и поливалентных (RIVM) энтеровирусных референс-сывороток.

Иммуногены представляли осветленные (центрифугирование при 1500 g в течение 15 мин) и стерилизованные (каскад фильтров Millipore 1,2—0,45 мкм) вирусосодержащие суспензии (ВС). Для концентрации ВС использовали фильтрационный элемент Pellicon XL (Millipore) с номинальным пределом отсечения 50 кД и площадью 50 см. Скорость поперечного потока 3 мл/мин. Хроматографическую очистку ВС проводили на матрице Sepharose 6 Fast Flow с помощью хроматографической системы АКТА purifier (GE Healthcare); скорость элюции 3 мл/мин; буфер для элюции: 100 мМ трис-НСl, pH 7,8, с добавлением 150 мл NaCl.

Системами накопления и индикации НПЭВ были аутентичные клетки RD (клетки рабдомиосаркомы человека), и HEp-2-C (клетки эпителиальной карциномы человека), полученные из официальных коллекций Национального института охраны здоровья и окружающей среды, Нидерланды (RIVM) и Национального института биологических стандартов и контроля, Англия (NIBSC) соответственно.

Объектами иммунизации служили здоровые кролики породы советская шиншилла (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России «Электрогорский») массой 2,5—3,0 кг, разводимые, содержащиеся и эксплуатируемые в открытых (конвенциональных) системах.

Биологическую активность вирусов определяли микрометодом титрования по цитоплазматическому действию (ЦПД) в клетках RD (ВКА, ВЕ, ЭВ) или в клетках HEp-2-C (ВКВ). Специфическую активность сывороток определяли в стандартной реакции нейтрализации, проводимой микрометодом [19].

Для неспецифической активации иммунного ответа применяли адьювантные системы TiterMax (Vaxcel Inc., США), SAF-1 (Sintex Res., США), Ribi (Immunochem Res. Inc., США), полный адьювант Фрейнда (Calbiochem Corp., США), а также иммунокорректоры и иммуностимуляторы Иммунофан («Бионокс», Москва), Ронколейкин (ООО «БИОТЕХ» Санкт-Петербург), Сальмозан (ЗАО «Микро-плюс», Москва), Полиоксидоний (ООО «НПО Петровакс Фарм», Москва) Фоспренил (ЗАО «Микро-плюс», Москва) и вазелиново-ланолиновую эмульсию.

Очистку сывороток от токсичных примесей проводили с помощью тканей человеческих плацент,

полученных от доноров с неотягощенным анамнезом и без патологии беременности.

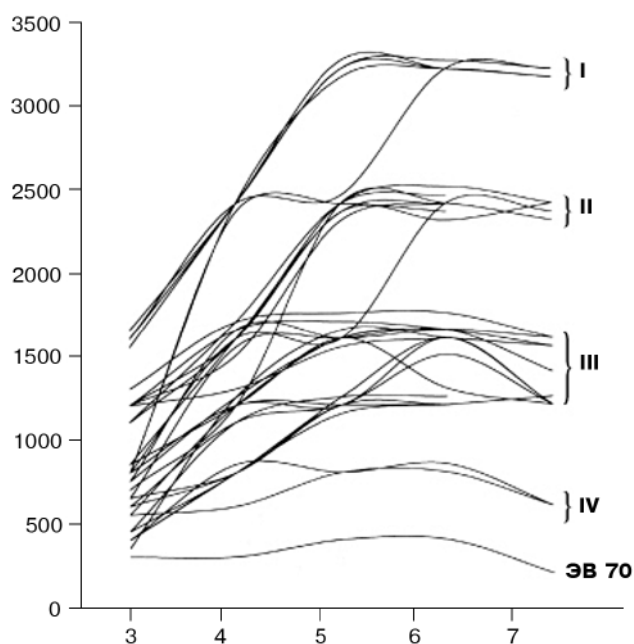
## Результаты и обсуждение

*Стандартизация системы измерений специфической активности.* Накопительными и индикаторными системами ранее производимых поликлональных энтеровирусных сывороток были первичные клетки почек зеленой мартышки (КПЗМ). В клетках почек индивидуальных доноров титры вирусов и сывороток колебались при повторных измерениях в пределах 3,0—4,0 log. С целью максимального сужения диапазона отклонений этих параметров от средних значений нами были использованы перевиваемые клетки RD и HEp-2-C, отличающиеся стабильной восприимчивостью к НПЭВ. Предварительно все используемые вирусы были адаптированы к указанным культурам клеток. Показатели специфической активности полученных адаптированных вариантов вирусов достигали средних титров одноименных вирусов в КПЗМ, а колебания титров не превышали 0,5 log.

*Оптимизация протокола иммунизации кроликов.* Стабилизация результатов титрования в пределах максимальных возможностей метода микротитрования НПЭВ по ЦПД позволила осуществить последовательное совершенствование ключевых этапов изготовления ЭДС. Анализ различных вариантов иммунизации кроликов показал, что наиболее эффективной была схема, включающая грундиммунизацию (антиген внутривенно, антиген совместно с адьювантом внутримышечно) с различным числом последующих внутривенных инъекций антигена. Из-за выраженной индивидуальной вариабельности иммунного ответа кроликов оптимальную кратность внутривенных инъекций определили по специфической активности смесей 15—20 индивидуальных однотипных сывороток, входящих в состав серии ЭДС. На основании полученных результатов технологичной схемой иммунизации (обеспечивающей приемлемую нейтрализующую активность всех типов сывороток при стандартном числе инъекций) была признана комбинированная грундиммунизация с шестью последующими внутривенными инъекциями антигена (см. рисунок). Продолжительность полного цикла иммунизации составляла 15 нед.

С целью интенсификации процесса антителообразования при одновременном снижении числа инъекций и укорочении продолжительности полного цикла иммунизаций были использованы концентрированные антигены и различные адьювантно активные препараты, не применявшиеся ранее при изготовлении энтеровирусных сывороток. Включение в стандартную схему иммунизации 100-кратных концентратов иммунологически малоактивных ЭВ 70 и ВКВ 4 не привело к подъему нейтрализующей активности полученных сывороток.

*Подбор неспецифических стимуляторов антителообразования.* Активирующее воздействие



Динамика антителообразования на различных этапах иммунизации.

По оси абсцисс — порядковые иммунизации; по оси ординат — обратные величины нейтрализующей активности.

адьювантной системы TiterMax на иммунный ответ кроликов к ВКА7, ВЕ 2, ВЕ 8 и ЭВ 70 оказалось сопоставимым с действием полного адьюванта Фрейнда и в 2 раза превосходило эффект вазелиново-ланолиновой эмульсии, стандартно используемой при изготовлении ЭДС. В отличие от полного адьюванта Фрейнда препарат TiterMax не вызывал побочных местных и общие реакции и осложнения. Сходная интенсивность антителообразования отмечалась при иммунизации кроликов теми же антигенами в сочетании с адьювантными системами Ribi, SAF-1 и с вазелиново-ланолиновой эмульсией. Адьювантные потенции препаратов иммунофан, полиоксидоний, ронколейкин, фоспренил и сальмозан, применяемых в комплексе с НПЭВ разных типов, проявлялись значительно слабее и непостоянно.

*Разработка метода очистки сывороток от токсичных субстанций.* Существенным недостатком кроличьих сывороток является их высокая токсичность для ксеногенных клеток [19—22]. Неспецифические изменения клеток RD и HEp-2-C, вызываемые рабочими разведениями некоторых ЭДС, нередко приводят к ложноотрицательной интерпретации результатов реакции нейтрализации. Для снижения уровня сывороточной цитотоксичности были использованы ткани человеческой плаценты (ТП), являющейся природным барьером для эндогенных токсинов. В предварительных экспериментах были установлены режимы получения суспензий ТП с максимальной обменной поверхностью и адсорбционной емкостью. Результаты очистки экспериментальных ЭДС, цитотоксичных в рабочих разведениях (содержащих не менее 20 нейтрализующих единиц), представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Показатели токсичности и специфической активности ЭДС до и после однократной обработки тканями человеческой плаценты**

ЭДС	Токсичность <sup>1</sup>		Специфическая активность <sup>1</sup>	
	до очистки	после очистки	до очистки	после очистки
КА 7	1:80	1:5	1:1200	1:1200
КА 9	1:90	1:5	1:1600	1:1600
КВ 3	1:70	< 1:5	1:1200	1:800
КВ 6	1:70	1:10	1:1200	1:1200
Е 7	1:90	1:5	1:2400	1:1600
Е 20	1:80	1:5	1:1600	1:1600
Е 25	1:90	1:10	1:2400	1:2400
Е 33	1:90	1:5	1:2400	1:1600
Э 69	1:80	< 1:5	1:1600	1:1200
Э 70	1:40	1:5	1:600	1:400

Примечание. <sup>1</sup> — разведения ЭДС.

Можно видеть, что последствиями однократной очистки сывороток было снижение токсичности в 10—20 раз с сохранением начальных уровней специфической активности. Остаточная токсичность некоторых сывороток, регистрируемая в разведениях 1:5—1:10, не снижала эксплуатационные характеристики препаратов. Полученные данные не совпадали с традиционным представлением о иммунозависимости цитотоксичности кроличьих сывороток.

Обязательным условием эффективного эпидемиологического надзора за ЭВИ и ее источниками является сравнение и анализ результатов исследований, проводимых стандартными методами и реагентами. Препятствиями для получения высокоактивных энтеровирусных сывороток, пригодных для повсеместного и долговременного применения, были видовые и индивидуальные особенности гуморальной компоненты системы иммунологических реакций продуцентов, а также неравноценная антигенно-иммуногенная компетентность НПЭВ. Впервые стандартные энтеровирусные сыворотки были получены в середине XX века в ходе расширенных лабораторных экспериментов, организованных по инициативе ВОЗ [13—17]. Ресурсное обеспечение этих работ позволило использовать в качестве продуцентов сывороток LBM породистых лошадей, отличающихся повышенной реактивностью к НПЭВ [18]. В дальнейшем объектами иммунизации стали генетически однородные лошади, обеспечившие стабильный уровень специфической активности экспериментальных поликлональных референс-сывороток RIVM. Чрезмерный рост затрат на разведение, содержание и эксплуатацию продуцентов инбредной категории резко снизил масштабы производства сывороток, сделав их недоступными для практических вирусологических лабораторий. Источниками ранее изготавливаемых отечественных

поликлональных энтеровирусных сывороток были кролики. Этот вид зоологических объектов привлек возможностью организации масштабного изготовления эффективных сывороток при одновременном использовании большого числа экономически доступных продуцентов. В то же время сведения о возможности использования кроликов для получения активных энтеровирусных сывороток диаметрально различались [23, 24]. Хотя данные о слабой нейтрализующей активности кроличьих энтеровирусных сывороток подтвердились при промышленном изготовлении ЭДС, чрезвычайно высокие титры одноименных лабораторно-экспериментальных сывороток не исключали возможности достижения некоего компромиссного варианта иммунного ответа, который в данных условиях мог считаться приемлемым.

С целью реализации этого предположения нами были проведены многоплановые эксперименты по подбору строго адекватных (корректных) тест-систем и высокоинформативных и высоковоспроизводимых методик, обеспечивших получение целевых продуктов с заданными свойствами качества. Применение перевиваемых клеток RD и HEp-2-C обеспечило полноценность и объективность информации об измеряемых параметрах и их допустимых лимитах, позволяющих строго контролировать процессы изготовления ЭДС. Уточнение схемы иммунизации и стандартизация дозировок иммуногенов способствовало стабилизации показателей нейтрализующей активности ЭДС. В результате обработки энтеровирусных сывороток тканями плаценты были получены препараты практически свободные от цитотоксичных иммунологически инертных субстанций. Данный способ очистки не оказывал денатурирующего воздействия на сывороточные белки и не сопровождался количественными потерями.

Высокие эксплуатационные характеристики промышленно изготовленных ЭДС 30 типов подтвердили эффективность разработанной системы малозатратного серийного изготовления этих препаратов (регистрационное удостоверение № ФС 01012006/4998-06). Энтеровирусные сыворотки для реакции нейтрализации расширили диагностические возможности практических вирусологических лабораторий по выявлению этиологической структуры субклинических, атипичных и полиморфных форм энтеровирусных заболеваний, по определению спектра циркулирующих энтеровирусов и доминирующих штаммов, позволяющие своевременно оценивать и прогнозировать эпидемиологическую ситуацию по НПЭВ на конкретных территориях.

Следует отметить, что существующие методы диагностики ЭВИ и идентификации ее возбудителей при всех своих неоспоримых достоинствах не избавлены от определенных недостатков. Традиционные методики (культуры клеток, реакция нейтрализации, иммуноферментный анализ, иммунофлюоресцентный метод) продолжительны, предъявляют повышенные требования к условиям забора и транс-

портировки исследуемых материалов, выявляют не весь спектр инфекционных агентов, зависят от качества используемых диагностических наборов, недостаточно специфичны в случаях субъективной оценки результатов. Современные молекулярно-генетические методы (полимеразная цепная реакция, различные амплификационные технологии, секвенирование) требуют специального дорогостоящего оборудования и материалов, нуждаются в строгом разделении этапов исследования для предотвращения случайной контаминации и неэффективны в случаях полиморфной ЭВИ.

Так как ни одно из указанных самостоятельных диагностических направлений не может считаться идеальным, перспективным представляется интеграция традиционных и современных методов лабораторных исследований. Уже в настоящее время идентификация НПЭВ по антигенному признаку с помощью поликлональных ЭДС в комплексе с молекулярно-генетическими методиками успешно формирует единое диагностическое пространство, способное эффективно осуществлять эпидемиологический надзор за НПЭВ и профилактику ЭВИ на территории РФ.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Knowles N.J., Hovi T., King A.M.Q., Stanway G. Overview of taxonomy. In: Ehrenfeld E., Domingo E., Roos R.P., eds. *Picornaviruses*. Washington: AMS Press; 2010: 19—32.
- Pallansch M.A., Roos R.P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Knipe D.N., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B., Straus S.E., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001: 723—75.
- Palacios G., Oberste M.S. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.* 2005, 11 (5): 424—33.
- Khetsuriani N., Parashar U.D. Enteric viral infections: the clinician's guide to diagnosis, treatment and prevention. In: Dale D.C., Federman D.D., eds. *Scientific American Medicine*. New York; 2003: 1758—66.
- Morens D.M., Pallansch M.A. Epidemiology. In: Rotbart H.A., ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington: AMS Press; 1995: 3—23.
- Kono R., Sasagawa A., Ishii K. et al. Pandemic of new type of conjunctivitis. *Lancet*. 1972, 1: 1191—4.
- Ho M., Chen E.R., Hsu K.H. et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 929—35.
- Yang F., Ren L., Xiong Z. et al. Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 2351—2.
- Junttila N., Kabue J.P., Cartet G. et al. New enteroviruses, EV-93 and EV-94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. *J. Med. Virol.* 2007; 79: 393—400.
- Norder H., Bjerregaard L., Magnus L. et al. Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J. Gen. Virol.* 2003; 84: 827—36.
- Smura T., Blomqvist S., Paananen A. et al. Enterovirus surveillance reveals proposed new serotypes and provides new insight into enterovirus 5'-untranslated region evolution. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 2520—6.
- Всемирная Организация Здравоохранения. Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусами для поддержки программы ликвидации полиомиелита. Женева: ВОЗ; 2005.
- Lim K.A., Benyesh-Melnick M. Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackie and Echo). *J. Immunol.* 1960ж 84: 309—17.
- Kamitsuka P.S., Soergel M.E., Wenner H.A. Production and standardization of ECHO reference antisera. I. For 25 prototypic ECHO viruses. *Am. J. Hyg.* 1961; 74 (1): 7—25.
- Kamitsuka P.S., Lou T.Y., Fabyi A., Wenner H.A. Preparation and standardization of Coxsackieviruses reference antisera. 1. For twenty-four group A viruses. *Am. J. Epidemiol.* 1965; 81 (3): 283—306.
- Wenner H.A., Behbehani A.M., Kamitsuka P.S. Preparation and standardization of Coxsackievirus reference antisera. II. For six group B viruses. *Am. J. Epidemiol.* 1965; 82 (1): 27—39.
- Hampil B., Melnick J.L., Wallis G. et al. Preparation of antiserum to enteroviruses in large animals. *J. Immunol.* 1965; 95 (5): 895—908.
- Melnick J.L., Rennick V., Hampil B. et al. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull. Wld Hlth Org.* 1973; 48: 263—8.
- Всемирная Организация Здравоохранения. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 4-е издание. Женева: ВОЗ; 2005.
- Budzko D.B., Kierzenbaum F., Waksman B.H. Cytotoxic effects of normal sera on lymphoid cells. III. Selective killing of mouse T cells by normal guinea pig serum. *J. Immunol.* 1977; 119 (2): 381—6.
- Colley D.G., Waksman B.H. Cytotoxic effect of normal rabbit serum on rat lymphoid cells. *Transplantation.* 1970; 9: 395.
- Sternova H., Cech K., Nouza K. et al. Cytotoxicity of normal rabbit serum for chicken lymphoid cells. I. Localization of the activity. *Immunology.* 1976; 30: 925—7.
- Козлов В.Г., Викторова Е.Г., Набатников П.А. Цитотоксические свойства кроличьих энтеровирусных диагностических сывороток. Особенности и локализация. *Вопросы вирусологии.* 2009; 1: 22—7.
- National Foundation for Infantile Paralysis. Preparation and Use of ECHO Virus Antisera for Types 1 to 14 and Coxsackie Virus Antisera for Types B 1 to B 5 and A9, Prepared by Microbiological Associations Inc. 1957.
- Граевская Н.А., Романова Л.Н., Непомнящий Ю.З. Экспериментальные основы производства диагностических сывороток к вирусам кишечной группы. В кн.: *Вакцины и сыворотки: Материалы по производству.* 1970; 13: 105—10.

#### REFERENCES

- Knowles N.J., Hovi T., King A.M.Q., Stanway G. Overview of taxonomy. In: Ehrenfeld E., Domingo E., Roos R.P., eds. *Picornaviruses*. Washington: AMS Press; 2010: 19—32.
- Pallansch M.A., Roos R.P. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Knipe D.N., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B., Straus S.E., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001: 723—75.
- Palacios G., Oberste M.S. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.* 2005, 11 (5): 424—33.
- Khetsuriani N., Parashar U.D. Enteric viral infections: the clinician's guide to diagnosis, treatment and prevention. In: Dale D.C., Federman D.D., eds. *Scientific American Medicine*. New York; 2003: 1758—66.
- Morens D.M., Pallansch M.A. Epidemiology. In: Rotbart H.A., ed. *Human Enterovirus Infections*. Washington: AMS Press; 1995: 3—23.
- Kono R., Sasagawa A., Ishii K. et al. Pandemic of new type of conjunctivitis. *Lancet*. 1972, 1: 1191—4.
- Ho M., Chen E.R., Hsu K.H. et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 929—35.
- Yang F., Ren L., Xiong Z. et al. Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 2351—2.

9. Junttila N., Kabue J.P., Cartet G. et al. New enteroviruses, EV-93 and EV-94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. *J. Med. Virol.* 2007; 79: 393—400.
10. Norder H., Bjerregaard L., Magnus L. et al. Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. *J. Gen. Virol.* 2003; 84: 827—36.
11. Smura T., Blomqvist S., Paananen A. et al. Enterovirus surveillance reveals proposed new serotypes and provides new insight into enterovirus 5'-untranslated region evolution. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 2520—6.
12. World Health Organization (WHO). Recommendations for Surveillance of Enteroviruses to Support Polio Eradication Program. Geneva: WHO; 2005. (in Russian)
13. Lim K.A., Benyesh-Melnick M. Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackie and Echo). *J. Immunol.* 1960ж 84: 309—17.
14. Kamitsuka P.S., Soergel M.E., Wenner H.A. Production and standardization of ECHO reference antisera. I. For 25 prototypic ECHO viruses. *Am. J. Hyg.* 1961; 74 (1): 7—25.
15. Kamitsuka P.S., Lou T.Y., Fabiyi A., Wenner H.A. Preparation and standardization of Coxsackieviruses reference antisera. 1. For twenty-four group A viruses. *Am. J. Epidemiol.* 1965; 81 (3): 283—306.
16. Wenner H.A., Behbehani A.M., Kamitsuka P.S. Preparation and standardization of Coxsackievirus reference antisera. II. For six group B viruses. *Am. J. Epidemiol.* 1965; 82 (1): 27—39.
17. Hampil B., Melnick J.L., Wallis G. et al. Preparation of antiserum to enteroviruses in large animals. *J. Immunol.* 1965; 95 (5): 895—908.
18. Melnick J.L., Rennick V., Hampil B. et al. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull. Wld Hlth Org.* 1973; 48: 263—8.
19. World Health Organization (WHO). Guidance on Laboratory Studies of poliomyelitis. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: WHO; 2005. (in Russian)
20. Budzko D.B., Kierzenbaum F., Waksman B.H. Cytotoxic effects of normal sera on lymphoid cells. III. Selective killing of mouse T cells by normal guinea pig serum. *J. Immunol.* 1977; 119 (2): 381—6.
21. Colley D.G., Waksman B.H. Cytotoxic effect of normal rabbit serum on rat lymphoid cells. *Transplantation.* 1970; 9: 395.
22. Sternova H., Cech K., Nouza K. et al. Cytotoxicity of normal rabbit serum for chicken lymphoid cells. I. Localization of the activity. *Immunology.* 1976; 30: 925—7.
23. Kozlov V.G., Viktorova E.G., Nabatnikov P.A. Cytotoxic properties of diagnostic rabbit sera to enteroviruses. Specific features and localization. *Voprosy virusologii.* 2009; 1: 22—7. (in Russian)
24. National Foundation for Infantile Paralysis. Preparation and Use of ECHO Virus Antisera for Types 1 to 14 and Coxsackie Virus Antisera for Types B 1 to B 5 and A9, Prepared by Microbiological Associations Inc. 1957.
25. Graevskaya N.A., Romanova L.N., Nepomnyaschiy Yu.Z. The experimental basis of the diagnostic sera to enteric viruses. In: Vaccines and serum. Materials for production. 1970; 13: 105—10. (in Russian)

Поступила 17.04.14

Received 17.04.14