

УДК 619:578.828.11

ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО ФОРМАТА ПРОБОПОДГОТОВКИ

Н.Ю. Саушкин^{1*}, Ж.В. Самсонова^{1,2}, А.П. Осипов^{1,2}, С.Э. Кондаков^{1,2},
М.А. Ефимова³, А.Н. Чернов³

*(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; ³ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»; *e-mail: sushk_90@mail.ru)*

Проведено выявление антител к инфекционным заболеваниям крупного рогатого скота (энзоотический лейкоз, вирусная диарея, инфекционный ринотрахеит) методом иммуноферментного анализа в сухих образцах цельной крови, полученных с использованием нового формата пробоподготовки на пористых мембранных носителях. Диагностирование инфекций проводили с использованием нескольких коммерческих тест-систем и сравнивали полученные данные с результатами анализа жидких образцов сыворотки крови. Результаты анализа сухих и жидких образцов полностью совпадали. Новый формат пробоподготовки позволяет исключить холодовую цепь при транспортировке образцов в диагностические лаборатории и упростить их хранение.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, энзоотический лейкоз, вирусная диарея, инфекционный ринотрахеит, иммуноферментный анализ, пористые мембранные носители, сухие пятна крови.

Инфекционные заболевания крупного рогатого скота (КРС), такие как энзоотический лейкоз (ЭЛ), вирусная диарея (ВД), инфекционный ринотрахеит (ИРТ), широко распространены в животноводческих хозяйствах и наносят серьезный экономический ущерб [1–3]. Эти заболевания характеризуются длительным латентным периодом и множественностью различных форм течения болезни. В условиях промышленного животноводства вирусы легко передаются от одной особи к другой, что приводит к быстрому распространению инфекции в стадах и высокой доле инфицированных животных.

Для своевременного выявления зараженных особей и последующего оздоровления стад проводят ряд диагностических мероприятий. Диагностика в большинстве случаев основывается на применении серологических методов исследования, таких как реакция иммунодиффузии в агарозном геле и иммуноферментный анализ (ИФА). Эти методы направлены на выявление специфических антител, которые вырабатываются в организме животного в качестве иммунного ответа на чужеродные белки вирусов. Используют также методы, например полимеразную цепную реакцию (ПЦР), направленные

на непосредственное выявление возбудителей инфекционных заболеваний.

В целях планового мониторинга стад на наличие инфекционных заболеваний, а также проверки напряженности иммунитета после вакцинации отобранные образцы крови пересылают для анализа в диагностическую лабораторию. В большинстве случаев после отбора проб является острой необходимостью в заморозке биоматериала и последующем соблюдении требований холодовой цепи при его транспортировке. Проблему хранения и доставки биообразцов может решить применение новой технологии пробоподготовки, основанной на высушивании биологических жидкостей (кровь, молоко и др.), нанесенных на мембранный пористый носитель. Подобная технология (DBS – Dried Blood Spot) отбора, хранения и транспортировки биологических жидкостей в виде сухих пятен, обычно крови, относительно широко распространена в медицине [4, 5].

При данном подходе несколько капель крови наносят на специальную целлюлозную мембрану, высушивают на воздухе и отправляют в лабораторию. Для получения сухого образца требуется

всего несколько капель жидкости, что снижает инвазивность процесса и позволяет меньше травмировать животное при отборе крови.

В последние годы технологию, основанную на получении сухих образцов, стали все чаще применять для ветеринарной диагностики, так как получение сухих образцов имеет ряд преимуществ перед традиционным методом отбора крови и других биологических жидкостей [6, 7]. К преимуществам технологии сухих пятен следует отнести существенное упрощение отбора и хранения образцов, сокращение расходов на транспортировку образцов за счет отсутствия холодильной цепи, возможность проведения пробоподготовки в полевых условиях.

Ранее нами предложен новый формат пробоподготовки на пористых мембранных носителях, изготовленных в виде узких маркированных полосок. Этот формат был успешно использован для количественного определения прогестерона методом ИФА в целях раннего выявления нестерельных особей [8], а также выявления провирусной ДНК вируса лейкоза КРС в сухих образцах крови методом ПЦР [9].

Цель данной работы – изучение возможности использования нового формата пробоподготовки для выявления специфических антител методом ИФА в сухих образцах крови при диагностике инфекционных заболеваний КРС.

Материалы и методы

Отбор и подготовка образцов. Для анализа использовали образцы крови 62 голов КРС, отобранные в полевых условиях в животноводческих хозяйствах республики Татарстан. Сухие образцы получали нанесением цельной крови на мембранные носители с последующим высушиванием. Носитель представлял собой тонкую маркированную мембранную полоску шириной 0,5 см, закрепленную в специальной карточке для хранения и транспортировки биологических жидкостей в виде сухих пятен (ООО «Иммуновед», Москва) [10]. Для нанесения биоматериала начальный участок мембраны помещали в образец жидкой крови, выдерживали до полного смачивания полоски, затем вынимали и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч. Высушенные образцы хранили при 4°C в плотно закрытых пластиковых пакетах с осушителем. Для получения жидкой сыворотки пробирки с образцами цельной крови центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин. Аликвоты полученных сывороток хранили при –18°C.

Определение антител к возбудителям инфекционных заболеваний КРС в сухих пятнах крови методом ИФА. Для проведения качественного иммуноферментного анализа в целях выявления антител к белку gp51 вируса лейкоза крупного рогатого скота (ЭЛ КРС) использовали диагностический набор реагентов BLV Antibody Test Kit («IDEXX», Франция). От мембраны с сухим образцом крови, согласно маркировке, отрезали ножницами участок мембраны размером 0,5×0,5 см и помещали его в лунку 96-луночного планшета. Образцы исследовали в двух повторях. Перед отрезанием нового образца ножницы протирали бумажной салфеткой для удаления оставшихся частиц сухой крови. В лунки с образцами добавляли 200 мкл буфера для разведения образцов. Образцы перемешивали на шейкере при 120 об/мин в течение 10 мин, а затем накрывали крышкой и выдерживали при температуре 37°C в течение 1 ч. После инкубации раствор декантировали, оставшиеся в лунках участки мембран удаляли пинцетом. Дальнейшие действия и интерпретацию результатов проводили согласно инструкции к набору. Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре «Anthos 2010» («Biochrom Ltd», Великобритания) при длине волны 450 нм.

Для выявления антител к белкам вируса ИРТ КРС использовали диагностический набор «ИРТ-СЕРОТЕСТ» (ООО «Ветбиохим», Москва). От мембраны с сухим образцом крови, согласно маркировке, отрезали ножницами участок мембраны размером 0,5×0,5 см и помещали в пробирку. Перед отрезанием нового образца ножницы протирали бумажной салфеткой для удаления оставшихся частиц сухой крови. Необходимое разведение образца получали путем добавления к одному маркированному участку мембраны 700 мкл буфера для разведения. Далее анализ проводили согласно инструкции к набору.

Для выявления антител к белкам вируса ВД КРС использовали диагностический набор «ВДКРС-СЕРОТЕСТ» (ООО «Ветбиохим», Москва). От мембраны с сухим образцом крови, согласно маркировке, отрезали ножницами 2 участка мембраны размером 0,5×0,5 см и помещали в лунку планшета. Перед отрезанием нового образца ножницы протирали бумажной салфеткой для удаления оставшихся частиц сухой крови. Образцы перемешивали на шейкере при 120 об/мин в течение 10 мин, а затем накрывали крышкой и выдерживали при комнатной температуре в течение 2 ч. После инкубации раствор декантировали из лунки резким движением, а оставшиеся в лунках участ-

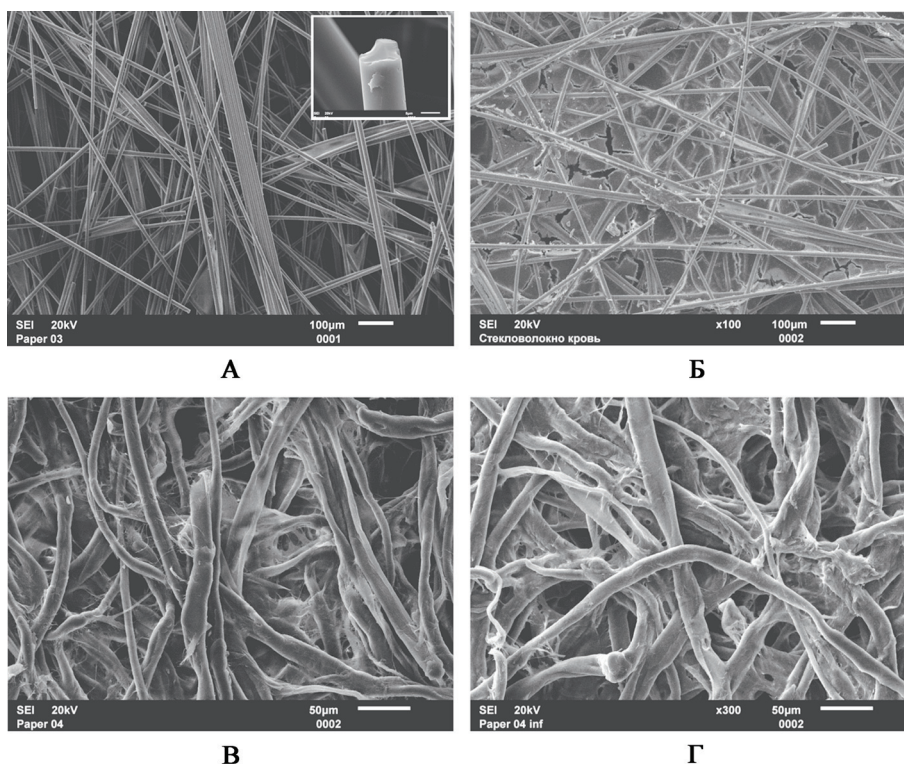
ки мембран удаляли пинцетом. Следующие этапы анализа и интерпретацию результатов проводили согласно инструкции к набору.

Результаты и обсуждение

Для отбора, хранения, транспортировки и проведения анализа сухих образцов крови применяли новый формат пробоподготовки и в качестве носителя биологического материала использовали тонкую маркированную мембрану, выполненную в виде полоски из пористого гидрофильного стекловолоконного материала. По сравнению с традиционно используемым целлюлозным носителем стекловолоконная мембрана обладает рядом как механических (повышенная прочность и устойчивость к деформациям при нагрузках), так и структурных (цельная структура волокон) преимуществ. Электронные микрофотографии двух мембранных носителей, полученные на сканирующем электронном микроскопе «Tescan, Vega 3SB» («Jeol Ltd.», Япония), наглядно демонстрируют структурные различия целлюлозной и стекловолоконной мембран (рисунок). Электронные фотографии получали как для чистых мембран, так и для мембран с высушенным образцом крови. В отличие от полых целлюлозных волокон (рисунок В, Г), цельность

структуры стекловолоконных тяжей исключает проникновение биологической жидкости внутрь волокон (рисунок А, Б) и увеличивает эффективность элюирования анализируемых компонентов с мембраны. Кроме того, структура стекловолоконных мембран позволяет исключить хроматографический эффект распределения компонентов в процессе впитывания биологической жидкости, а также преодолеть трудности в количественном анализе цельной крови, связанные с проявлением эффекта гематокрита, характерные для целлюлозных мембран [5]. Объемное содержание клеточных элементов в крови (гематокрит) может сильно варьировать в зависимости от возраста, физического состояния и жизненного цикла животного, что приводит к ошибкам при измерениях с использованием целлюлозных мембран. Равномерное распределение биологической жидкости в стекловолоконной мембране независимо от содержания форменных элементов позволяет исключить неточности при анализе сложных биологических жидкостей, таких как кровь и молоко.

Адаптация коммерческих диагностических наборов для выявления антител в сухих образцах биологических жидкостей зависит от требуемого конечного разведения исследуемого



Изображения мембран, полученные методом сканирующей электронной микроскопии: А – стекловолоконная мембрана без образца, Б – с образцом сухой крови, В – целлюлозная мембрана без образца, Г – с образцом сухой крови

образца для конкретной диагностической системы, а также от типа биологической жидкости, нанесенной на мембрану. В работе использовали образцы сухой цельной крови КРС, адсорбированной на стекловолоконной мембране емкостью около 15 мкл жидкости на один маркированный квадратный участок (0,5×0,5 см). Исходя из того, что среднее значение гематокрита КРС равно 30-50%, можно считать, что на одном участке мембраны содержится 7-9 мкл плазмы в высушенном виде. Для получения требуемого разведения (в 100 раз) при анализе сухих образцов крови диагностическим набором «ИРТ-СЕРОТЕСТ» (ООО «Ветбиохим», Москва) к одному маркированному участку добавляли 700 мкл буфера для разведения. Для анализа образцов жидкой сыворотки крови набором реагентов BLV Antibody Test Kit («IDEXX», Франция) требовалось разведение пробы в 20 раз, т.е. добавление к одному квадрату, содержащему 15 мкл высушенной крови, 160 мкл буфера для разведения, что меньше необходимого для анализа объема жидкости, помещаемого в лунку (суммарный объем должен быть равен 200 мкл). В целях исключения стадии дополнительного разведения образцов участок мембраны помещали непосредственно в лунку планшета, а затем добавляли 200 мкл буфера для разведения образца. При таком подходе конечное разведение было близко к расчетному, а методика не усложнялась дополнительными стадиями. Для правильной интерпретации результатов варьировали объем добавляемых положительного и отрицательного контролей от 5 до 15 мкл. Варьирование отрицательного контроля практически не влияло на интерпретацию результатов. Объем добавленного положительного контроля в пределах 7-10 мкл пропорционально влияет на измеряемую оптическую плотность контрольной лунки. Наиболее точную интерпретацию результатов анализа сухих образцов крови (по сравнению с жидкими образцами сыворотки) получали при использовании аликвоты положительного контроля в объеме 7 мкл.

В таблице представлены итоговые результаты исследования сухих образцов на наличие антигенов вирусных инфекций. Результаты ИФА, полученные с использованием сухих образцов крови, нанесенных на мембранные носители, полностью совпали с результатами, полученными при исследовании жидких образцов сыворотки. 22 из 62 (35%) образцов оказались ИФА-положительными к белкам вируса лейкоза. Очевидно, что при столь высокой степени инфицирования стада необходима изоляция зараженных живот-

ных. Молоко больных лейкозом коров запрещено к реализации, что приводит к серьезным экономическим потерям животноводческих хозяйств.

Как известно, ЭЛ КРС неизлечим и зараженные животные выбраковываются во избежание распространения инфекции. Для борьбы с ВД и ИРТ КРС проводят плановую вакцинацию, а для проверки ее эффективности оценивают напряженность иммунитета, измеряя уровень поствакцинального титра антител. Анализ испытуемых проб, взятых от вакцинированных животных, на наличие антител к белкам вируса ИРТ показал, что 98% голов имеют высокий уровень напряженности иммунитета ИРТ. Для ВД КРС количество положительных проб составило 90%. Полученные данные свидетельствуют об успешно проведенных мерах по вакцинации против указанных инфекций, однако серонегативные животные должны быть ревакцинированы и повторно протестированы.

Использование сухих образцов крови КРС показало высокую аналитическую надежность полученных данных качественного и полуколичественного ИФА. Титры антител (предельное разведение образца, при котором детектируется наличие антител) к вирусу ИРТ при анализе сухих образцов попали в те же диапазоны, что и при анализе жидких. Расхождение в значениях титра антител с двукратным шагом разведения допускается на границах диапазонов двукратных разведений. Процесс десорбции анализируемых веществ с мембраны в буфер для разведения происходит достаточно эффективно как во время предварительного разведения в пробирке, так и непосредственно в лунках планшета. Для проведения анализа жидкие образцы крови следует предварительно центрифугировать для получения сыворотки или плазмы. При использовании сухих образцов крови в ИФА необходимость в предварительном выделении жидкой фракции крови отпадает. Чтобы получить пробу, равномерно содержащую в своем объеме анализируемые компоненты (в нашем случае антитела), достаточно поместить участок мембраны с образцом в элюирующий буфер и перемешать в шейкере.

Таким образом, можно сделать вывод, что использованный в работе формат пробоподготовки и анализа образцов, высушенных на стекловолоконных мембранных носителях, пригоден для получения, хранения и транспортировки биоматериала в целях дальнейшего проведения анализа методом ИФА для диагностирования таких инфекционных болезней, как ИРТ, ВД и ЭЛ КРС.

Новый подход имеет ряд преимуществ перед традиционным отбором жидкой крови: цельную кровь КРС можно наносить непосредственно на

Результаты анализа сухих образцов крови на инфекционные заболевания КРС методом ИФА

Номер образца	ЭЛ	ВД	ИРТ	Титр антител к вирусу ИРТ	Номер образца	ЭЛ	ВД	ИРТ	Титр антител к вирусу ИРТ
1	отр	отр	пол	>1/3200	32	отр	отр	пол	>1/3200
2	отр	пол	сомн	1/100	33	отр	пол	пол	>1/3200
3	отр	пол	пол	>1/3200	34	отр	пол	пол	>1/3200
4	отр	пол	пол	>1/3200	35	отр	пол	пол	>1/3200
5	отр	пол	пол	>1/3200	36	пол	пол	пол	>1/3200
6	отр	пол	пол	>1/3200	37	пол	пол	пол	>1/3200
7	отр	пол	пол	>1/3200	38	отр	пол	пол	>1/3200
8	пол	пол	пол	>1/3200	39	отр	отр	пол	>1/3200
9	отр	пол	пол	>1/3200	40	пол	отр	пол	>1/3200
10	пол	пол	пол	>1/3200	41	отр	пол	пол	>1/3200
11	отр	пол	пол	>1/3200	42	отр	пол	пол	>1/3200
12	отр	пол	пол	>1/3200	43	пол	пол	пол	>1/3200
13	отр	пол	пол	>1/3200	44	отр	пол	пол	>1/3200
14	пол	пол	пол	>1/3200	45	отр	пол	пол	>1/3200
15	отр	пол	пол	>1/3200	46	пол	пол	пол	>1/3200
16	отр	пол	пол	>1/3200	47	отр	пол	пол	>1/3200
17	отр	пол	пол	>1/3200	48	отр	пол	пол	>1/3200
18	пол	пол	пол	>1/3200	49	пол	пол	пол	>1/3200
19	пол	пол	пол	>1/3200	50	отр	пол	пол	>1/3200
20	пол	пол	пол	>1/3200	51	пол	отр	пол	>1/3200
21	пол	пол	пол	>1/3200	52	пол	пол	пол	>1/3200
22	пол	отр	пол	>1/3200	53	отр	пол	пол	1/1600
23	пол	пол	пол	>1/3200	54	отр	пол	пол	>1/3200
24	пол	пол	пол	>1/3200	55	отр	пол	пол	>1/3200
25	отр	пол	пол	>1/3200	56	пол	пол	пол	>1/3200
26	пол	пол	пол	>1/3200	57	отр	пол	пол	>1/3200
27	отр	пол	пол	>1/3200	58	отр	пол	пол	>1/3200
28	пол	пол	пол	>1/3200	59	отр	пол	пол	>1/3200
29	пол	пол	пол	>1/3200	60	отр	пол	пол	>1/3200
30	отр	пол	пол	>1/3200	61	отр	пол	пол	1/800
31	отр	пол	пол	>1/3200	62	отр	пол	пол	>1/3200

О б о з н а ч е н и я. отр – отрицательные образцы, пол – положительные образцы, сомн – сомнительные образцы.

мембранный носитель и использовать в анализе без проведения стадии отделения сыворотки, а транспортировка высушенных образцов возможна без соблюдения специальных температурных условий. Стекловолоконные мембраны обладают лучшими структурными и физико-химическими свойствами по сравнению с существующими целлюлозными аналогами за счет цельной структуры волокон, высокой капиллярной впитываемости, емкости и устойчивости к

деформации. Применение стекловолоконных носителей в ветеринарии для отбора биоматериала позволит более эффективно проводить мониторинг стад на наличие инфекционных заболеваний и своевременно осуществлять комплекс мероприятий по его оздоровлению.

Авторы выражают благодарность инженеру НИТУ МИСиС Е.А. Колесникову за проведение исследования структуры мембранных материалов с использованием электронной микроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы»; проект № RFMEFI57814X0010 (соглашение № 14.578.21.0010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Минсельхоз России, Департамент ветеринарии. 23.08.2000 №13-7-2/2130.
2. *Ridpath J.F.* // *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2010. Vol. 26. № 1. P. 105.
3. *Nandi S., Kumar M., Manohar M., Chauhan R.S.* // *Anim Health Res Rev.* 2009. Vol. 10. № 1. P. 85.
4. *Demirev P.A.* // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85. № 2. P. 779.
5. *Meesters R.J.W., Hooff G.P.* // *Bioanalysis.* 2013. Vol. 5. № 17. P. 2187.
6. *Sun D., Cho Y.I., Comyn P., Yoon K.J.* // *Vet J.* 2013. Vol. 198. № 2. P. 494.
7. *Lehner A.F., Rumbeiha W., Shlosberg A., Stuart K., Johnson M., Domenech R., Langner H.* // *J Anal Toxicol.* 2013. Vol. 37. № 7. P. 406.
8. *Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E.* // *Vet. J.* 2014. Vol. 199. № 3. P. 471.
9. *Samsonova J.V., Chadina A.S., Osipov A.P., Kondakov S.E., Makarova T.E., Komarov A.B.* // *Moscow Univ Chem Bull.* 2014. Vol. 69. № 6. P. 282.
10. *Осипов А.П., Кондаков С.Э., Григоренко В.Г., Смоленский В.И., Прокопцева О.С., Самсонова Ж.В.* Устройство для получения, хранения и транспортировки сухих образцов жидкостных объектов, предназначенных для последующего проведения лабораторного анализа. Пат. РФ № 2519030.

Поступила в редакцию 01.03.16

A NEW SAMPLING FORMAT FOR BOVINE INFECTIOUS DISEASES ELISA DIAGNOSTIC IN DRIED BLOOD SPOTS

N.Yu. Saushkin^{1*}, J.V. Samsonova^{1,2}, A.P. Osipov^{1,2}, С.Е. Kondakov^{1,2}, M.A. Efimova³, A.N. Chernov³

¹*Division of Chemical Enzymology, Chemistry Faculty, Lomonosov Moscow State University;* ²*National University of Science and Technology "MISIS";* ³*Federal Center of toxicological, radiological and biological security; *e-mail: sushk_90@mail.ru*

Bovine infectious diseases antibody detection (enzootic bovine leucosis, viral diarrhea, infectious rhinotracheitis) by ELISA in dried blood samples obtained with a new sampling format on porous membranes was carried out. Several commercial test systems were used for infection diagnostic. The obtained data were compared with the results of the analysis of liquid blood serum. ELISA results of dried and liquid samples were in full concordance. A new sampling format can simplify the storage and transportation of samples from farms to diagnostic laboratories.

Key words: cattle, enzootic bovine leucosis, viral diarrhea, infectious rhinotracheitis, ELISA, porous membranes, dried blood spots.

Сведения об авторах: Саушкин Николай Юрьевич – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (sushk_90@mail.ru); Самсонова Жанна Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, кан. хим. наук (jvs@enz.chem.msu.ru); Осипов Александр Павлович – ст. науч. сотр. кафедры функциональных наносистем и высокотемпературных материалов НИТУ МИСиС, кан. хим. наук (APOsipov@mail.ru); Кондаков Сергей Эмильевич – вед. науч. сотр. кафедры функциональных наносистем и высокотемпературных материалов НИТУ МИСиС, докт. фарм. наук (ksekse@mail.ru); Ефимова Марина Анатольевна – зав. лабораторией иммунологии и биохимии ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», докт. биол. наук (magina-2004g@mail.ru); Чернов Альберт Николаевич – зам. директора по инновациям ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», докт. биол. наук (rt-kazan@mail.ru).