

УДК 619:578.828.11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТРИПОВАННЫХ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ У ИНФИЦИРОВАННОГО МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА

Н.Ю. Саушкин¹, Ж.В. Самсонова^{1,2}, А.П. Осипов^{1,2}, С.Э. Кондаков^{1,2},
Е.С. Лысова³, И.А. Елизарова⁴, К.С. Хаертынов⁵, Э.А. Шуралев^{3,4,5}

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; ³кафедра прикладной экологии Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; ⁴лаборатория биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»; ⁵Центральная научно-исследовательская лаборатория Казанской государственной медицинской академии (филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России); *e-mail: sushk_90@mail.ru)

Проведено сравнительное определение специфических антител у коз при вирусном артрите-энцефалите и токсоплазмозе методами иммуноферментного анализа и реакции латекс-агглютинации с использованием стрипованных сухих образцов сыворотки и цельной крови, полученных на пористом мембранном носителе. Показано, что применение сухих образцов позволяет проводить качественное и количественное определение специфических антител на уровне, полностью согласующемся с результатами анализа жидких образцов (сыворотки). Данный метод пробоподготовки и анализа может быть использован для безопасной транспортировки образцов крови и последующего проведения серологических исследований при эпизоотологическом мониторинге.

Ключевые слова: артрит-энцефалит коз, токсоплазмоз, иммуноферментный анализ, реакция латекс-агглютинации, стрипованные сухие образцы биологических жидкостей.

В медицинской практике широко распространена технология сухих пятен крови (*Dried Blood Spot, DBS*). При осуществлении анализа этим методом кровь пациента капельно наносят на мембранный носитель, высушивают и в таком виде используют для последующего лабораторного определения различных диагностически значимых веществ и маркеров [1]. В частности, данная технология применяется при проведении неонатального скрининга, фармакокинетических исследований, терапевтического лекарственного мониторинга и в других целях. Получение крови и других биологических жидкостей в виде сухих пятен позволяет исключить внутривенное вмешательство, снизить травмируемость пациента вследствие малого объема капиллярно отбираемого материала, а также сократить расходы на специализированную транспортировку и хранение образцов, поскольку отпадает необходимость в соблюдении так называемой холодной цепи и резко сокращается объем перевозимого материала. Кроме того, технология получения сухого биологического материала пригодна для

создания биобанков и позволяет в любое время проводить дополнительные исследования в целях уточнения диагноза или при сомнительных/спорных результатах.

Использование биожидкостей в ветеринарии для отбора, транспортировки и анализа в сухом виде (на мембранном носителе) в мировой практике ограничено, по этой теме опубликованы единичные работы [2]. В России подобные исследования практически не ведутся, однако в последнее время авторами опубликован ряд статей, демонстрирующих успешное применение сухих образцов сыворотки и/или плазмы крови, а также цельной крови и цельного молока [3, 4]. Для приготовления биологических жидкостей в виде сухих проб с последующим анализом и выявлением ДНК, антител и гормонов (крупный рогатый скот) применяли новый подход, основанный на использовании тонкой полоски стекловолоконного мембранного материала. Использование технологии получения сухих биообразцов на мембранных носителях для ветеринарного мониторинга весьма перспектив-

но, поскольку позволяет упростить задачу отбора и транспортировки образцов из хозяйств, особенно удаленных, в специализированную аналитическую лабораторию для проведения таких видов анализа, как реакция торможения гемагглютинации, реакция латекс-агглютинации (ЛА), иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция и многих других. В частности, подобный подход нанесения биологических жидкостей на мембрану для получения сухого образца может быть использован при массовом заборе образцов у крупного и мелко-го рогатого скота (МРС), свиней, птицы в целях последующего проведения серологических исследований и эпизоотологического контроля на наличие антител против антигенов возбудителей разнообразных инфекционных заболеваний, для оценки поствакцинального иммунитета или для выявления генетического материала самих возбудителей.

Цель данной работы – сравнительное применение методов ИФА и ЛА для выявления антител против антигенов возбудителей заболеваний МРС в парных нативных и сухих стрипованных образцах крови и сыворотки, полученных на пористом мембранном носителе в виде тонкой полоски.

Материалы и методы

В работе использовали образцы сыворотки крови/цельной крови МРС (козы) из мелких фермерских козоводческих хозяйств Республики Татарстан. Соответствующие сухие стрипованные образцы получали нанесением цельной крови или сыворотки (путем погружения в жидкий образец) на мембранную полоску с последующим высушиванием. Носитель представлял собой маркированную полоску шириной 0,5 см, закрепленную в специальной карточке для хранения и транспортировки биологических жидкостей в виде сухих пятен (ООО «Иммуновед», Москва). Высушенные образцы хранили при 4 °С в плотно закрытых пластиковых пакетах с осушителем.

Для проведения ИФА в целях выявления антител к антигену р28 артрита-энцефалита коз использовали набор реагентов MVV/CAEV p28 Ab Screening («IDEXX», Франция), предназначенный для выявления специфических антител при вирусном артрите-энцефалите коз (болезни Маэди–Висна) в сыворотке крови МРС. От мембраны с сухим образцом, согласно нанесен-

ной маркировке, отрезали ножницами участок размером 0,5×0,5 см и помещали его в лунку 96-луночного планшета. Затем в лунки с образцами добавляли 200 мкл буфера для разведения образцов. Планшет на 10 мин помещали в шейкер (120 об/мин), а затем накрывали крышкой и выдерживали при температуре 37 °С 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 «BioRad PR1100» («BioRad», США) при длине волны 450 нм.

Для каждого образца рассчитывали коэффициент связывания антигена с сывороточными антителами (S/P , %) по формуле:

$$S/P = \frac{S - NC}{PC - NC} \cdot 100,$$

где S – среднее значение оптической плотности образца, PC – среднее значение оптической плотности положительного контроля, NC – среднее значение оптической плотности отрицательного контроля.

Результаты измерений интерпретировали следующим образом: при значении $S/P \leq 110\%$ результат считался отрицательным; при значении $110\% < S/P < 120\%$ образцы считали сомнительными (в данном случае было рекомендовано исследовать животное повторно спустя 2–3 недели); при значении $S/P \geq 120\%$ результат считался положительным.

Для проведения теста с использованием реакции латекс-агглютинации в целях выявления антител к антигенам возбудителя токсоплазмоза (*Toxoplasma gondii*) в крови МРС (коз) использовали набор реагентов TOXOTEST-MT («Eiken Chemical Co. Ltd.», Япония), предназначенный для выявления антител в сыворотке крови. От мембраны с сухим образцом, согласно нанесенной маркировке, отрезали ножницами участок размером 0,5×0,5 см и помещали его в пластиковую пробирку типа эппендорф. В пробирку с образцами добавляли 120 мкл буфера для разведения сухих образцов сыворотки (или 60 мкл буфера для разведения сухих образцов крови). Образцы перемешивали на шейкере при 120 об/мин в течение 10 мин. Для дальнейшего проведения анализа использовали полученные разведенные

пробы. Анализ и интерпретацию результатов проводили согласно инструкции, приложенной к набору.

Полученные результаты интерпретировали следующим образом: отрицательный результат при разведении образца $\leq 1:16$ (наличие выпавших комплексов в виде «горстки», «точки»), в этом случае образец считается не содержащим антитела к данной инфекции; положительный результат (осадок в виде раскрывшегося зонтика) при разведении образца 1:16 и отрицательный при разведении $\geq 1:32$, в этом случае образец считается сомнительным (животное рекомендуется исследовать повторно спустя 2–3 недели); положительный результат при разведении $\geq 1:32$, в этом случае образец считается содержащим антитела.

Результаты и обсуждение

В данной работе проведено определение специфических антител к антигенам вируса артрита-энцефалита коз и протозоа *Toxoplasma gondii* с использованием методов ИФА и ЛА соответственно. Вирусный артрит-энцефалит

коз представляет собой эмерджентную инфекцию. Диагноз на эту инфекцию ставится по выявленным антителам. Работы последних лет [5, 6] свидетельствуют о циркуляции этого вируса по территории Российской Федерации. Токсоплазмоз также широко распространен, зарегистрирован во всех странах мира. Его возбудитель способен паразитировать у разных хозяев, в том числе у домашних и диких млекопитающих, птиц и человека. Лабораторная диагностика данных заболеваний предусматривает проведение серологических исследований с помощью иммунохимических методов анализа в целях обеспечения эпизоотологического мониторинга и контроля [7, 8]. Использованный в работе вариант ИФА основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок планшета гликопротеина р28 вируса артрита-энцефалита коз со специфическими антителами исследуемой пробы сыворотки и последующем выявлении полученного комплекса с конъюгатом (мечеными пероксидазой хрена специфическими антителами к IgG МРС). При добавлении субстратного раствора связанная пероксидаза катализирует окисление хромогена

Результаты анализа жидких и сухих стрипованных образцов методом ЛА на наличие антител к антигенам *Toxoplasma gondii*

Номер образца	Максимальное разведение образца, при котором наблюдается положительная реакция		Интерпретация результата	
	жидкие пробы (сыворотка)	сухие образцы	жидкие пробы	сухие образцы
1–5	*	* (сыворотка)	–	–
6	1:256	1:256 (сыворотка)	+	+
7	1:256	1:256 (сыворотка)	+	+
8	1:256	1:256 (сыворотка)	+	+
9	1:64	1:32 (кровь)	+	+
10	1:256	1:256(кровь)	+	+
11	1:64	1:64(кровь)	+	+
12	1:256	1:256 (кровь)	+	+
13	1:16	1:16(кровь)	+/-	+/-
14	*	* (кровь)	–	–

Примечание: * положительная реакция не наблюдалась; «+» – результат положительный, «–» – результат отрицательный.

(тетраметилбензидина) пероксидом водорода. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антител в определяемой пробе.

Методом ИФА были исследованы 92 биопробы, полученные двумя различными способами – стрипованные сухие образцы и жидкие сыворотки крови. Среди исследованных сухих стрипованных образцов 6 образцов были получены из цельной крови. Всего при анализе сухой сыворотки крови была выявлена 31 серонегативная особь и 55 серопозитивных особей; при анализе образцов сухой крови – 4 серопозитивных особи и 2 серонегативных. Образцов с сомнительным результатом выявлено не было. В среднем содержание антител в положительных образцах находилось на уровне значений S/P от 135,6 и 126,8% (и выше) для жидких и сухих образцов соответственно. При этом для большинства образцов значение S/P превышало 450%. При анализе отрицательных проб коэффициент связывания антигена с сывороточными антителами варьировал в диапазоне 0,4–59,3% (для жидких образцов) и 3,9–64,8% (для сухих стрипованных образцов). В целом интерпретация результатов в сухих биообразцах полностью совпадала с таковой в соответствующих им жидких образцах сывороток.

Определение антител к антигенам *Toxoplasma gondii* в жидких и сухих стрипованных образцах крови/сыворотки коз проводили с использованием реакции ЛА. Метод основан на использовании взаимодействия иммобилизованного на поверхности латексных частиц антигена протозоа *Toxoplasma gondii* со специфическими антителами из исследуемой пробы. При положительной реакции образовавшийся агглютинат выпадает в осадок в виде «раскрывшегося зон-

тика», при отрицательной – в виде «горстки», «точки». Всего было исследовано 14 проб жидкой сыворотки, 6 соответствующих им стрипованных образцов крови и 8 образцов сыворотки. При подготовке сухой пробы для анализа принимали во внимание тот факт, что на долю форменных элементов крови приходится 40–45%, а на долю плазмы – 55–60% от объема образца. т.е. на одном участке мембраны с сухой кровью содержится в два раза меньше жидкой фракции крови (плазмы), чем в нанесенном на такую же площадь мембраны пробе сыворотки. Из 14 исследованных образцов были выявлены 7 образцов, содержащих антитела к возбудителю токсоплазмоза в титре 1:64–1:256, и один образец (№ 13) был отнесен к сомнительным (таблица). При этом интерпретация результатов исследуемых парных образцов (жидкий/сухой) также полностью совпадала.

Заключение

Таким образом, на примере выявления антител к антигенам возбудителей инфекционных заболеваний МРС в образцах сыворотки и крови коз было показано, что стрипованные сухие образцы наравне с жидкими могут быть использованы для проведения серологических исследований с сохранением достоверности получаемых результатов. При этом анализировать можно сухие образцы как сыворотки, так и цельной крови. Возможность полномасштабного использования образцов сухой цельной крови, минуя стадию выделения сыворотки, для отбора, транспортировки и анализа в целях проведения эпизоотологического мониторинга следует подтвердить в ходе проведения более полных исследований в полевых условиях.

Работа выполнена в соответствии с госзаданием Минобрнауки «Организация проведения научных исследований», соглашение №16.6548.2017/ВУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharma A., Jaiswal S., Shukla M., Lal J. // Drug Test. Anal. 2014. Vol. 6. N 5. P. 399.
2. Sun D., Cho Y.I., Comyn P., Yoon K.J. // Vet. J. 2013. Vol. 198. N 2. P. 494.
3. Saushkin N.Yu., Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E., Khammatov N.I., Usoltsev K.V., Makaev Kh.Z., Chernov A.N. // Moscow Univ. Chem. Bull. 2016. Vol. 71. N 5-6. P. 319.
4. Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E. // Talanta. 2017. Vol. 175. P. 143.
5. Балабанова В.И., Кудряшов А.А. // Междунар. вестн. ветеринарии. 2016. № 4. С. 10.
6. Покровская Е.С., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Елизарова И.А., Фаизов Т.Х. // Ветеринарный врач. 2015. № 6. С. 16.
7. Panneum S., Rukkhwamsuk T. // Pol. J. Vet. Sci. 2017. Vol. 20. N 2. P. 347.
8. Wyrosdick H.M., Schaefer J.J. // Anim. Health Res. Rev. 2015. Vol. 16. N 2. P. 150.

Поступила в редакцию 12.11.17

STRIP-DRIED BIOFLUIDS FOR THE DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES IN INFECTED SMALL RUMINANTS

N.Yu. Saushkin^{1*}, J.V. Samsonova^{1,2}, A.P. Osipov^{1,2}, S.E. Kondakov^{1,2}, E.S. Lysova³, I.A. Elizarova⁴, K.S. Khaertynov⁵, E.A. Shuralev^{3,4,5}

(¹Division of Chemical Enzymology, Chemistry Faculty, Lomonosov Moscow State University; ²National University of Science and Technology "MISiS", Moscow; ³Dept. of Applied Ecology, Institute of Environmental Sciences, Kazan Federal University; ⁴Laboratory of Biochemistry and Molecular-Genetic Analysis, Federal Center of Toxicological, Radiological and Biological Security; ⁵Central Research Laboratory, Kazan State Medical Academy (Branch FSBEI FPE RMACPE Ministry of Healthcare of Russia); *e-mail: sushk_90@mail.ru)

Comparative determination of specific antibodies in goats for viral arthritis-encephalitis and toxoplasmosis by ELISA and latex agglutination reaction using strip-dried serum and whole blood samples obtained on a porous membrane carrier was performed. It was shown that the use of strip-dried samples allows qualitative and quantitative determination of specific antibodies at a level completely concurred with that of liquid samples (serum). This method of sample preparation and analysis can be used for safe blood samples shipment and following serological studies for epizootic monitoring.

Key words: caprine arthritis encephalitis, toxoplasmosis, ELISA, latex agglutination test, strip-dried biofluids, dbs (dry blood spots).

Сведения об авторах: Саушкин Николай Юрьевич – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (sushk_90@mail.ru); Самсонова Жанна Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (jvs@enz.chem.msu.ru); Осипов Александр Павлович – ст. науч. сотр. кафедры функциональных наносистем и высокотемпературных материалов НИТУ МИСиС, канд. хим. наук (arosipov@mail.ru); Кондаков Сергей Эмильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики, химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. фарм. наук (ksekse@mail.ru); Лысова Елена Сергеевна – магистрант кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (jerry1994@rambler.ru); Элизарова Инна Андреевна – мл. науч. сотр. лаборатории биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (eliinna@yandex.ru); Хаертыхнов Камил Саубанович – зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией Казанской государственной медицинской академии (филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Казань), канд. биол. наук (khaerkamil@mail.ru); Шуралев Эдуард Аркадьевич – доцент кафедры прикладной экологии Института экологии и природопользования ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань; ст. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории Казанской государственной медицинской академии – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Казань; вед. науч. сотр. лаборатории биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань; доцент, канд. вет. наук (eduard.shuralev@mail.ru).