

УДК 619:616.9:636.09

DOI 10.30975/2073-4999-2024-26-3-13-16

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ТРЕМ ИНФЕКЦИОННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

Жанна Васильевна Самсонова¹, Николай Юрьевич Саушкин², Александр Павлович Осипов³,
Анна Владимировна Рузина⁴, Алексей Викторович Фролов⁵, Татьяна Николаевна Рождественская⁶

^{1, 2, 3} ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова),
Москва, Россия

^{4, 5, 6} ФГБНУ ФНЦ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени
К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва, Россия

¹ jvsamsonova@gmail.com

Аннотация. Проведено сравнительное изучение коммерческих иммуноферментных тест-систем 3 производителей для выявления поствакцинальных антител к вирусам инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни и ньюкаслской болезни. Параллельное тестирование проводили для жидких образцов сыворотки и сухих образцов цельной крови на мембранном носителе. Получена высокая сходимость результатов параллельных измерений жидких и сухих образцов для всех тест-систем. Коэффициенты корреляции результатов определения антител к 3 инфекциям в системе «сухой образец — жидкий образец» составили 0,88–0,92 для наборов IDEXX (США); 0,76–0,80 — для наборов ООО «ЦВО» (Россия) и 0,69–0,81 — для наборов ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия). На примере выявления антител к вирусам ИБК и ИББ продемонстрирована долгосрочная стабильность сухих образцов крови (срок хранения — 5 лет).

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, ньюкаслская болезнь, инфекционный бронхит кур, инфекционная бурсальная болезнь, сухие пятна крови, контроль вакцинации

Благодарности: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, проект № 22-74-00018.

Для цитирования: Самсонова Ж.В. Сравнительная характеристика иммуноферментных тест-систем для определения поствакцинальных антител к трем инфекционным заболеваниям / Ж.В. Самсонова, Н.Ю. Саушкин, А.П. Осипов [и др.] // Птица и птицепродукты. 2024. № 3. С. 13–16. <https://doi.org/10.30975/2073-4999-2024-26-3-13-16>.

Comparative characteristics of immune-enzymatic systems for post vaccinal antibodies determination to three infection diseases

Zhanna V. Samsonova¹, Nikolay Yu. Saushkin², Alexander P. Osipov³, Anna V. Ruzina⁴, Alexey V. Frolov⁵,
Tatyana N. Rozhdestvenskaya⁶

^{1, 2, 3} FSBEI HE “Lomonosov Moscow State University” (FSBEI HE Lomonosov MSU), Moscow, Russia

^{4, 5, 6} FSBSI “Federal Scientific Center — All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and J.R. Kovalenko” of the RAS (FSBSI FSC VIEW RAS), Moscow, Russia

¹ jvsamsonova@gmail.com

Abstract. Comparative investigation has been carried out of three immune-enzymatic systems from three producers for detection of post vaccinal antibodies to chicken infection bronchitis viruses, infection bursitis and Newcastle disease viruses. Parallel testing has been carried out for liquid blood serum samples and dry whole blood samples at membrane carrier. High results convergence has been received in dry and liquid parallel measuring for all test systems. The results correlation coefficients for antibodies determination to three diseases in “dry sample – liquid sample” system have been 0.88 to 0.92 for IDEXX set (USA); 0.76 to 0.80 for ООО “CVO” set (Russia) and 0.69 to 0.81 for FSBSI “FCAHP” set. Long-term stability of dry blood samples (5 years) has been proved at the example of antibodies determination to IBD and IB.

Keywords: immune-enzymatic analysis, Newcastle disease, chicken infection bronchitis, infection bursitis, dry blood spots, vaccination control

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 22-74-00018.

For citation: Samsonova Zh.V. Comparative characteristics of immune-enzymatic systems for post vaccinal antibodies determination to three infection diseases / Zh.V. Samsonova, N.Yu. Saushkin, A.P. Osipov et al. // Poultry & Chicken Products. 2024. No. 3. P. 13–16. <https://doi.org/10.30975/2073-4999-2024-26-3-13-16>.

Введение

Инфекционные болезни домашней птицы могут поражать большое

количество голов за короткое время ввиду высокой плотности содержания птицы в хозяйствах.

Вакцинация промышленной птицы против циркулирующих среди поголовья патогенов помогает



эффективно бороться с распространением инфекционных заболеваний [1, 2]. Регулярный контроль иммунозащитенности стада осуществляют путем оценки уровня поствакцинальных антител в сыворотке кур. Это помогает минимизировать потенциальный риск экономического ущерба, связанного с заболеваниями и гибелью птицы. Преимущественно оценка титра вырабатываемых в ответ на вакцинацию антител производится серологическими методами, например с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). На рынке представлены несколько вариантов тест-систем, основанных на принципе ИФА, которые имеют некоторые различия, касающиеся как схемы постановки анализа и способа интерпретации результата, так и используемых реагентов, в частности субстратных растворов, дающих окраску при протекании колориметрической реакции на последней стадии проведения анализа. Сравнительная оценка преимуществ и потенциальных недостатков каждой тест-системы и потенциальных различий в результатах анализа имеет важное практическое значение [3]. Большая часть диагностикумов не содержит в инструкциях информации о возможности использовать сухие образцы крови/сыворотки при проведении анализа, однако ранее нами было показано, что при анализе сухих образцов сохраняется возможность получить достоверные и воспроизводимые результаты на существующих коммерческих тест-системах для ИФА [4, 5]. Пробоподготовка биологического материала в виде сухих образцов на впитывающем материале (специальной абсорбирующей мембране) способствует сохранности передаваемого в лабораторию материала и является удобным способом транспортировки, не требующим соблюдения холодовой цепи, что особенно актуально при проведении частого и массового мониторинга в удаленных районах [6]. Данная технология нашла применение

не только в медицинских и околомедицинских исследованиях, но и в ветеринарной медицине и биологических исследованиях по всему миру [6, 7].

Цель данной работы состояла в сравнительной характеристике некоторых коммерческих ИФА-тест-систем, используемых для оценки поствакцинального иммунитета для 3 инфекционных заболеваний кур, а именно к возбудителям инфекционного бронхита кур (ИБК), инфекционной бурсальной болезни (ИББ) и ньюкаслской болезни (НБ), в том числе при анализе сухих образцов цельной крови.

Материалы и методы исследований

Образцы жидкой сыворотки и сухие образцы цельной крови кур были предоставлены ООО «НПП «АВИВАК». Отбор и подготовку образцов у вакцинированных кур в возрасте 510 дней (75 шт.) и СПФ-кур (10 шт.) проводили так, как описано ранее [4]. Для получения сыворотки кровь отбирали в пробирки; для получения сухих образцов цельной крови впитывающую мембрану (стрип) размером 5×60 мм (ООО «Университет», Москва) пропитывали кровью из подкрыльцовой вены птицы и высушивали в течение 1-2 ч в штативе-держателе. Пробы перевозили в лабораторию; жидкие образцы хранили при минус 20°C, сухие — в закрытых пакетах с осушителем при 4°C.

Образцы жидкой сыворотки и сухой цельной крови были охарактеризованы с использованием коммерческих ИФА-тест-систем производства IDEXX (США), ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия) и ООО «ЦВО» (Россия) для определения антител к 3 инфекционным заболеваниям: НБ, ИБК и ББ. Жидкие образцы сыворотки анализировали согласно инструкциям к наборам. Для постановки ИФА сухих образцов цельной крови часть мембраны размером 5×5 мм с высушенным образцом отделяли пинцетом по перфорации, помещали в буфер для разведения образцов (600 мкл) и инкубировали в течение 20 мин

при перемешивании (250 об./мин). Последующее разведение образца проводили в лунке ИФА-планшета, добавляя 10 мкл полученного смыва крови к 90 мкл буфера для разведения. Все последующие стадии исследования и интерпретацию результатов осуществляли согласно инструкциям к наборам.

Результаты исследований и их обсуждение

Все образцы жидкой сыворотки и эквивалентные им образцы сухой цельной крови были исследованы на наличие антител к вирусам НБ, ИБК и ИББ с использованием ИФА-тест-систем 3 производителей (табл. 1).

Отметим тот факт, что согласно инструкции к набору тест-система ООО «ЦВО» (Россия) предназначена для анализа как жидких образцов сыворотки, так и сухих образцов крови. Тест-системы фирмы IDEXX (США) и ООО «ЦВО» (Россия) были идентичны по используемому разведению образца (1/500) и характеристикам интерпретации результатов, включая отнесение выявленного значения титра к определенной титрогруппе (диапазону титров). В случае же тест-систем производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия) для каждой инфекции используется индивидуальное уравнение вычисления титра антител и определенные условия интерпретации результатов (табл. 1). При этом результаты интерпретируют по 3 категориям: положительный образец, сомнительный и отрицательный. При проведении финальной стадии анализа, а именно окрашивании субстратного раствора для последующего измерения на спектрофотометре, в тест-системах производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия) в качестве субстрата фермента используется 2,2'-азино-ди[3-этил]бензтиазолин-сульфоная кислота (АБТС), а в других рассматриваемых тест-системах — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ). Однако итоговое измерение реакции с участием ТМБ в тест-системах IDEXX (США)



Таблица 1

Основные характеристики ИФА-тест-систем для определения антител к вирусам НБ, ИБК и ИББ

Производитель	Разведение исследуемой сыворотки	Уравнение определения значения титра	Интерпретация результата	Длина волны измерения, нм
IDEXX, США	1/500	$\lg \text{Титр} = 1,09 (\lg S/P) + 3,36$	Отриц. результат: $S/P < 0,20$. Положит. результат: $S/P > 0,20$	650
ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия	1/400	ИБК $\lg \text{Титр} = 1,473 (\lg S/P) + 3,837$	ИБК Отриц. результат: $S/P < 0,1351$. Сомнит. результат: $0,1352 < S/P < 0,2171$. Положит. результат: $S/P \geq 0,2172$	405
		ИББ $\lg \text{Титр} = 1,714 (\lg S/P) + 3,855$	ИББ Отриц. результат: $S/P < 0,1396$. Сомнит. результат: $0,1397 < S/P < 0,1802$. Положит. результат: $S/P \geq 0,1803$	
		НБ $\lg \text{Титр} = 1,514 (\lg S/P) + 3,634$	НБ Отриц. результат: $S/P < 0,1530$. Сомнит. результат: $0,1531 < S/P < 0,2411$. Положит. результат: $S/P \geq 0,2412$	
ООО «ЦВО», Россия	1/500	$\lg \text{Титр} = 1,09 (\lg S/P) + 3,36$	Отриц. результат: $S/P < 0,20$. Положит. результат: $S/P > 0,20$	450

Таблица 2

Результаты измерения образцов жидкой сыворотки и сухой крови вакцинированных кур (n = 75) различными ИФА-тест-системами

Производитель	НБ			ИБК			ИББ		
	Диапазон титров (жидкая сыворотка)	Диапазон титров (сухая кровь)	Коэффициент корреляции / уравнение корреляции*	Диапазон титров (жидкая сыворотка)	Диапазон титров (сухая кровь)	Коэффициент корреляции / уравнение корреляции*	Диапазон титров (жидкая сыворотка)	Диапазон титров (сухая кровь)	Коэффициент корреляции / уравнение корреляции*
IDEXX, США	7 300–20 400	9 000–20 600	0,88 $y = 0,9877x + 866$	2 400–14 300	3 200–15 200	0,92 $y = 0,9215x + 1 683$	1 400–12 000	1 700–12 400	0,90 $y = 0,9355x + 1 162$
ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия	7 200–25 700	8 000–23 000	0,69 $y = 0,8166x + 4 332$	2 800–18 500	3 600–23 300	0,80 $y = 0,9793x + 2 425$	465–43 000	1 500–59 500	0,81 $y = 1,1083x + 2 257$
ООО «ЦВО», Россия	12 200–22 000	10 400–22 200	0,80 $y = 0,838x + 1 472$	5 500–20 400	5 000–15 000	0,78 $y = 0,7051x + 2 220$	1 600–12 400	1 600–12 200	0,76 $y = 0,7215x + 2 112$

* Приведен коэффициент корреляции результатов измерения жидких образцов сыворотки и эквивалентных им сухих образцов крови.

и ООО «ЦВО» (Россия) проводят на разных длинах волн (650 и 450 нм соответственно) за счет использования различных стоп-растворов (табл. 1). Стоит отметить, что сыворотки и сухие образцы крови свободных от специфической патогенной флоры СПФ-кур (n = 10) были идентифицированы как отрицательные с использованием всех исследованных тест-систем. В общем, исследуя 75 образцов вакцинированных кур, для всех тест-систем при анализе жидких и сухих образцов получили сходимые результаты в широком диапазоне наблюдаемых титров

(табл. 2). При этом следует отметить, что, как и в наших более ранних исследованиях [4], при использовании всех тест-систем для выявления антител к ИБК наблюдался больший разброс результатов по сравнению с результатами, полученными с помощью тест-систем к другим инфекциям. Вероятно, наблюдаемые результаты связаны с особенностями сорбции и стабильности данных вирусных антигенов (ИБК) на лунках ИФА-планшетов.

Из всех исследованных тест-систем наибольшие коэффициенты корреляции результатов

определения антител к возбудителям 3 инфекций (не ниже 0,88) в системе «сухой образец — жидкий образец» были получены для наборов IDEXX (США). Для наборов ООО «ЦВО» (Россия) коэффициенты составили 0,76–0,80, а для наборов ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Россия) — 0,69–0,81 (табл. 2). При высоких наблюдаемых коэффициентах корреляции между сухими и жидкими образцами отметим более высокие значения титров для ИББ антител, выявляемых с использованием наборов ФГБУ «ВНИИЗЖ», что, по-видимому, связано с методом обработки экспериментальных данных.

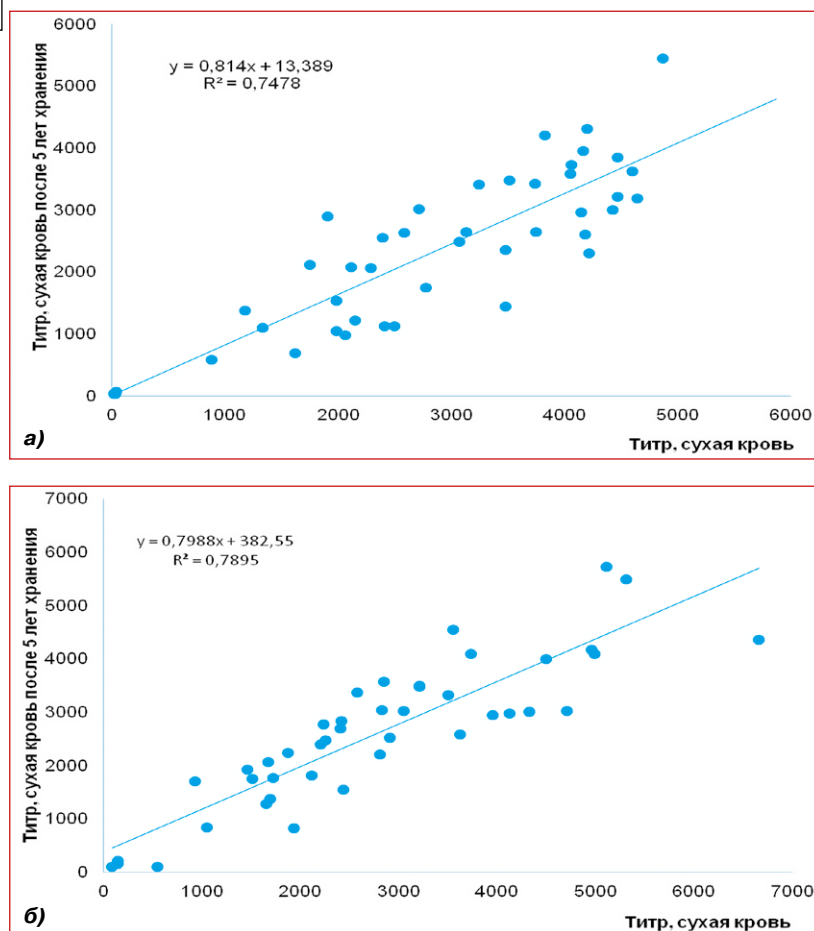


Рис. Стабильность образцов сухой цельной крови при хранении в течение 5 лет (n = 44): а — выявление антител к вирусу ИБК; б — выявление антител к вирусу ИББ

Сухие биологические образцы, как правило, характеризуются лучшей стабильностью по сравнению с жидкими образцами, при выявлении аналитов различной природы [6]. В данном исследовании образцы сухой крови кур, исследованные в нашей предыдущей работе [4] и хранившиеся в течение 5 лет при 4°C в плотно закрытых пакетах с осушителем, были проанализированы с использованием тест-систем IDEXX (США) на антитела к вирусам ИБК и ИББ (n = 44). Для образцов сухой цельной крови долгосрочного хранения мы получили идентичные результаты, что и 5 лет назад при первичном тестировании (рис.).

Таким образом, продемонстрировано, что сухие образцы крови отличаются высокой степенью стабильности при хранении и могут быть использованы в том числе в качестве архивных образцов.

Заключение

Рассмотренные импортные и отечественные тест-системы продемонстрировали хорошие результаты сходимости данных, что позволяет на равных использовать их для выявления поствакцинальных антител в сухих образцах цельной крови без проведения дополнительных исследований. Возможность применять коммерческие стандартизированные ИФА-тест-системы для анализа не только жидких образцов, но и сухих в виде высушенной матрицы на впитывающем мембранном носителе открывает перспективы упрощенной доставки образцов из удаленных регионов страны, а также из-за границы без строгих ограничений температурного контроля. Сухие образцы сохраняют стабильность при долгосрочном хранении, занимают минимум места, что делает

их перспективными для создания биобанков и архивов.

Список источников

1. Kaspers B. Avian Immunology / B. Kaspers, K.A. Schat, T. Göbel, L. Vervelde (eds). 3rd ed. London, UK: Elsevier Science, 2021. P. 626.
 2. Фролов А.В. Специфическая профилактика ньюкаслской болезни / А.В. Фролов, С.В. Панкратов, А.В. Рузина, Н.В. Васюков // Птица и птицепродукты. 2022. № 6. С. 39-40.
 3. Михайлова В.В. Сравнение серологических методов лабораторной диагностики лейкоза крупного рогатого скота / В.В. Михайлова, Т.П. Лобова, А.Н. Скворцова [и др.] // Мол. и мяс. скот-во. 2020. № 2. С. 51-52.
 4. Самсонова Ж.В. Сухие образцы крови для транспортировки и анализа при контроле поствакцинального иммунитета птицы / Ж.В. Самсонова, Н.Ю. Саушкин, А.П. Осипов [и др.] // Птица и птицепродукты. 2019. № 5. С. 48-52.
 5. Samsonova J.V. Detection of Antibodies Against Foot-and-Mouth Disease Virus Serotypes A, O and Asia-1 by ELISA in Strip-Dried Samples from Vaccinated Bovines / J.V. Samsonova, N.Y. Saushkin, A.P. Osipov, S. Kondakov // Applied Biochem. Biotech. 2018. Dec. Vol. 188, iss. 2. P. 491-497.
 6. Samsonova J.V. Dried Blood Spots technology for veterinary applications and biological investigations: technical aspects, retrospective analysis, ongoing status and future perspectives / J.V. Samsonova, N.Y. Saushkin, A.P. Osipov // Vet. Res. Comm. 2022. Jul. 30. Vol. 46, iss. 4. P. 655-698.
 7. McClendon-Weary B. Little to give, much to gain-what can you do with a dried blood spot? / B. McClendon-Weary, D.L. Putnick, S. Robinson, E. Yeung // Curr. Environ. Health Reports. 2020. Sept. Vol. 7, iss. 4. P. 211-221.
- Информация об авторах**
Ж.В. Самсонова — канд. хим. наук;
Н.Ю. Саушкин — канд. хим. наук;
А.П. Осипов — канд. хим. наук;
Т.Н. Рождественская — д-р вет. наук.
- Information about the authors**
Zh.V. Samsonova — PhD in Chemistry;
N.Yu. Saushkin — PhD in Chemistry;
A.P. Osipov — PhD in Chemistry;
T.N. Rozhdestvenskaya — Dr. Sci. in Veterinary Medicine.