



УДК 619:616.9:636.09

Выявление антител к возбудителям заболеваний вирусной этиологии в сухих пятнах сыворотки крови птицы

Самсонова Ж.В., кандидат химических наук, старший научный сотрудник,

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Осипов А.П., кандидат химических наук, старший научный сотрудник

Кондаков С.Э., доктор фармацевтических наук, ведущий научный сотрудник,

Национальный исследовательский технологический университет (МИСиС)

Руденко Т.В., кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Смоленский В.И., доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по государственному контролю и стандартизации, заведующий отделением биологических лекарственных средств для животных, ФГБУ «ВГНКИ»

Аннотация:

Авторы представили результаты апробации технологии получения сухих пятен биологических жидкостей для диагностики ряда вирусных заболеваний птицы вирусной этиологии и изучения иммунного статуса.

Средний титр антител к вирусу ньюкаслской болезни птицы в элюированных образцах в реакции торможения гемагглютинации составил 83,3% от нативных образцов. При выявлении антител к возбудителям синдрома снижения яйценоскости, инфекционного энцефаломиелита, инфекционной бурсальной болезни и реовирусной инфекции методом иммуноферментного анализа получено хорошее совпадение титров антител нативных и элюированных образцов сыворотки птицы (102,8–118,7%).

Ключевые слова: вирусные заболевания птицы, широкомасштабный скрининг, сухие образцы, технология сухих пятен.

Identification of Antibodies to Diseases of Viral Etiology in Dry Spots of Avian Serum

Samsonova Zh.V., Cand. of Chem. Sci., Senior Scientist, Moscow State University of M.V. Lomonosov

Osipov A.P., Cand of Chem. Sci., Senior Scientist

Kondakov S.E., Dr. of Pharm. Sci., Lead Scientist, National Research Technological University (MISiS)

Rudenko T.V., Cand. of Biol. Sci., Lead Scientist

Smolensky V.I., Dr. of Biol. Sci., Prof., Vice Director for State Control and Standardization, Head of Dept. of Biol. Medicines for Animals, All-Russian State Center for Quality and Standardization of Feeds and Medicines for Animals

Summary:

The test results are presented for the technology of obtaining the dry spots of avian serum for diagnostics of certain viral diseases and assessment of immune status in poultry.

Average antibody titer to ND in eluted samples in reaction of hemagglutination inhibition was 83.3% of native samples. ELISA quantification of antibodies to causative agents of EDS-76, IEM, IBD, and REO showed good conformity between native and eluted samples of serum (102.8–118.7%).

Key words:

viral diseases of poultry, wide screening, dry samples, technology of dry spots.



Высококачественный лабораторный анализ является одним из приоритетных направлений современной ветеринарной диагностики, особенно при проведении широкомасштабных исследований в местах массового содержания и разведения животных и птицы. В случае отдалённого расположения специализированных лабораторий хранение и доставка большого количества отобранных для анализа жидких образцов может представлять определённую проблему. Отбор и анализ образцов биологических жидкостей в виде сухих пятен помогает решить эти проблемы минимальными средствами.

Технология сухих пятен крови — СПК (от англ. Dried Blood Spots, DBS) широко используется во всём мире для отбора, хранения и анализа образцов крови при решении задач массового скрининга в медицине, в частности для неонатального скрининга врождённых патологий. В последние годы за рубежом технология СПК находит всё более широкое применение не только для диагностических целей в медицинской практике и ветеринарии, но также и в других областях, например в фармакокинетических исследованиях. При использовании этого метода образцы исследуемой крови или сыворотки в виде капель наносят на выделенные сектора пористой бумаги, входящей в состав специальной карточки, и высушивают. В последующем сухой образец анализируют в лаборатории посредством его элюции с вырезанного участка бумаги определённого размера в виде диска. К преимуществам СПК следует отнести простоту и доступность использования карточек для отбора образцов, отсутствие требований к наличию холодовой цепи при транспортировке образцов в лабораторию, малый объём образца и малую травмируемость пациента (животного), существенное сокращение расходов на хранение и транспортировку по сравнению с аналогичными затратами на жидкие образцы.

В России технология СПК используется преимущественно для неонатального скрининга. На данный момент в ветеринарной диагностике ведутся единичные исследования по анализу биологических жидкостей в виде сухих пятен. Цель данной работы — апробировать технологию получения биологических жидкостей в виде сухих пятен для

пробоподготовки и анализа сывороток птицы при определении титра антител к возбудителям ряда инфекций вирусной этиологии, наносящих ощутимый вред современным птицеводческим хозяйствам.

Материалы и методы. В работе отобраны образцы сывороток крови коммерческих цыплят и кур из различных птицеводческих хозяйств РФ, иммунизированных по установленным схемам и в дозах, указанных в инструкциях по применению. Использовали следующие вакцины: против ньюкаслской болезни (НБ) из штамма «Ла-Сота» (ФГБУ ВНИИЗЖ и «Сева Санте Анималь», Россия); против инфекционного энцефаломиелита (ИЭП) из штамма 1143 (Ломанн Анималь Хелс, Германия); против синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-76), инфекционной бурсальной болезни (ИББ) и реовирусной инфекции (РЕО) «ПЕНТАВИС» (ФГБУ ВНИИЗЖ, Россия).

Сухие образцы сывороток крови птицы по технологии сухих пятен получали с применением рабочих карточек нового формата для отбора, транспортировки, хранения и анализа биологических жидкостей, состоящих из маркированных мембранных полосок шириной 0,5 см (ООО «Иммуновед», Россия). Сыворотку крови в объёме 100 мкл наносили на конец мембранной полоски и после распространения образца вдоль неё высушивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Для проведения исследований использовали часть мембранной полоски с нанесённым образцом размером 0,5×2,0 см, отрезая её ножницами по маркировке. Элюцию сыворотки с мембраны проводили физиологическим раствором (рН 7,2–7,4). Жидкие и сухие образцы сравнивали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и в иммуноферментном анализе (ИФА) по процентному соотношению титров антител в образцах сыворотки (после элюции) к титрам антител в нативных образцах.

При постановке РТГА для определения титра антител против возбудителя НБ использовали набор ФГБУ ВНИИЗЖ. Для выявления антител в сыворотке птицы к возбудителям синдрома ССЯ-76, ИЭП, ИББ и РЕО использовали ИФА-наборы фирмы BioChek (Великобритания).

Результаты исследований и обсуждение. Экспериментально установленная сорбционная ём-



кость мембранного материала полосок, входящих в состав рабочей карточки для отбора, хранения, транспортировки и анализа образцов биологических жидкостей в виде сухих пятен, составила 70 ± 10 мкл сыворотки на 1 см^2 . Для элюции сухих образцов сывороток птицы с мембраны в качестве оптимального был выбран объём элюента, равный трёхкратной сорбционной ёмкости (210 мкм). В результате получали образцы сыворотки в разведении 1:3 в объёме, достаточном для постановки серологических реакций. Это разведение учитывали при расчёте конечного титра антител в РТГА и при подготовке рабочего разведения сывороток при исследовании в ИФА.

Было установлено, что время элюции (в диапазоне от 5 до 60 мин) сухого образца с мембраны не оказывало существенного влияния на конечные результаты, что особенно важно при проведении массовых серологических исследований. Например, средний геометрический титр антител ($\log_2$) при постановке РТГА для элюированной сыворотки, содержащей антитела к вирусу ньюкаслской болезни птицы в титре 10,0 ($\log_2$), составил 108, 113, 108 и 113% от титра антител, полученного для нативной сыворотки при элюции 5, 15, 30 и 60 минут соответственно.

При исследовании 24-х нанесённых на мембрану, высушенных и впоследствии элюированных образцов сывороток, содержащих антитела к вирусу НБ, получали стабильно воспроизводимые результаты (табл. 1). Разброс значений титра антител в пределах 50–100% в логарифмическом исчислении не превышает $\log_2(x) = 1$, что укладывается в допустимую погрешность опыта. Наблюдаемые различия также могут быть обусловлены незначительной разницей в площади полосок мембран, которые нарезали вручную с помощью ножниц и использовали для элюции образца. Уровень антител в элюентах соответствовал исходному титру в среднем на 83,3%, что свидетельствует о пригодности данного метода пробоподготовки и анализа образцов при проведении исследований сывороток крови птицы.

Для оценки возможности использования технологии получения биологических жидкостей в виде сухих пятен для определения уровня антител к возбу-

Таблица 1. Результаты исследования сывороток птицы, содержащих антитела к вирусу НБ

Титр антител в РТГА ($\log_2$)		% к титру антител в нативной сыворотке
Нативная сыворотка	Элюированная сыворотка с мембраны	
4	4	100
5	4	50
5	4	50
5	4	50
2	2	100
3	3	100
3	3	100
3	3	100
3	2	50
3	2	50
4	4	100
4	3	50
1	1	100
4	4	100
4	4	100
5	5	100
7	7	100
6	6	100
8	8	100
9	8	100
8	7	50
8	8	100
6	6	100
11	10	50

дителям ССЯ-76, ИЭП, ИББ и РЕО методом ИФА было исследовано 14 сывороток, полученных от иммунизированных цыплят и кур (табл. 2). Как видно из таблицы, титр антител в сыворотках крови, прошедших процедуру сорбции/элюции с мембраны, можно достоверно определять с помощью этого метода. Совпадение значений титров антител в нативной и элюированной сыворотках составляло 102,8–118,7 процента. Результаты ИФА были корректными независимо от используемой тест-системы.

Заключение. При выявлении антител к возбудителям заболеваний птицы вирусной этиологии результаты исследований элюированных образцов сухих сывороток практически совпадали с данными, полученными для нативных образцов. Предложенный в настоящей работе новый формат технологии пробоподготовки и анализа образцов биологических жидкостей в виде сухих пятен легко адаптируется и используется для проведения массовых скринингов на труднодоступных территориях (дистанционно) или в местах массового содержания животных (птицы). Данный подход может быть рекомендован для широкомасштабного проведения серологических исследований напряжённости иммунитета и контроля эпизоотической ситуации в птицеводческих хозяйствах. Технология получения

Таблица 2. Результаты анализа сухих образцов сывороток птицы при определении титра антител к возбудителям ССЯ-76, ИЭП, ИББ и РЕО в ИФА

Инфекция	Нативные образцы		Элюированные образцы		
	Титр антител (n=15)	Результат*	Титр антител (n=15)	Результат	% к титру антител в нативной сыворотке
ССЯ-76	1:4916	+	1:5174	+	104,3
	1:562	–	1:533	–	–
	1:640	–	1:246	–	–
	1:4651	+	1:5456	+	117,3
	1:4658	+	1:5764	+	123,8
	1:4587	+	1:5933	+	129,4
	1:4621	+	1:6260	+	135,5
	1:4374	+	1:4848	+	110,9
	1:4084	+	1:4437	+	108,7
	1:4348	+	1:5234	+	120,4
	1:16	–	1:48	–	–
	1:60	–	1:34	–	–
	1:37	–	1:75	–	–
	1:15	–	1:53	–	–
Среднее значение					118,7
ИЭП	1:9606	+	1:8186	+	85,3
	1:5622	+	1:4789	+	85,2
	1:4800	+	1:3120	+	65,0
	1:6984	+	1:5957	+	86,7
	1:6372	+	1:6673	+	104,7
	1:8712	+	1:10919	+	125,5
	1:7328	+	1:9498	+	129,6
	1:7112	+	1:9443	+	132,7
	1:2504	+	1:3454	+	137,9
	1:6402	+	1:8597	+	134,3
	1:4	–	1:36	–	–
	1:45	–	1:88	–	–
	1:28	–	1:186	–	–
	1:13	–	1:103	–	–
Среднее значение					108,7
ИББ	1:15408	+	1:11920	+	77,4
	1:15429	+	1:12960	+	84,0
	1:9158	+	1:7120	+	77,7
	1:10725	+	1:9122	+	85,0
	1:14226	+	1:14541	+	102,2
	1:9603	+	1:7859	+	81,8
	1:6491	+	1:7820	+	120,5
	1:9433	+	1:10672	+	113,4
	1:8285	+	1:11115	+	134,2
	1:10745	+	1:10901	+	101,4
	1:11074	+	1:12510	+	113,0
	1:14184	+	1:20101	+	141,7
	1:10405	+	1:12405	+	119,2
	1:10576	+	1:14620	+	138,2
Среднее значение					106,5
РЕО	1:8707	+	1:5909	+	67,0
	1:14599	+	1:11928	+	81,6
	1:12772	+	1:8212	+	64,2
	1:10001	+	1:8190	+	81,9
	1:21898	+	1:23784	+	108,6
	1:8963	+	1:8156	+	91,0
	1:17947	+	1:23625	+	131,7
	1:19932	+	1:23882	+	118,6
	1:10691	+	1:13840	+	129,5
	1:13101	+	1:14435	+	110,2
	1:1204	–	1:1320	–	–
	1:399	–	1:589	–	–
	1:5130	+	1:5963	+	116,2
	1:3510	+	1:4690	+	133,6
Среднее значение					102,8

Примечание: * + положительный образец; – отрицательный образец.

биологических жидкостей в виде сухих пятен позволяет отбирать и высушивать пробы в так называемых «полевых условиях», например, непосредственно в хозяйстве. В последующем образцы пересылают в лабораторию без специальных требований к температурному режиму. Результат анализа может быть передан потребителю дистанционно —

посредством Интернета, телефона или других доступных способов связи.

Литература:

1. Осипов А.П., Самсонова Ж.В., Кондаков С.Э. Раннее определение стельности коров методом иммуноферментного анализа прогестерона в сухих пятнах молока на пористых мем-





бранах. / Материалы междунар. науч.-практ. конф. «Молочная индустрия мира в Российской Федерации». 12–15 марта 2013 г., ВВЦ, Москва. С. 62–65.

2. Demirev P.A. Dried blood spots: analysis and applications. Anal. Chem. 2013. 85(2). 779–789.

3. Lehner A.F., Rumbelha W., Shlosberg A., Stuart K., Johnson M., Domenech R., Langner H. Diagnostic analysis of veterinary dried blood spots for toxic heavy metals exposure. J Anal. Toxicol. 2013. 37(7). 406–422.

4. Meesters R.J.W., Hooff G.P. State-of-the-art dried blood spot analysis: an overview of recent advances and future trends. Bioanalysis. 2013. 5(17). 2187–2208.

5. Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E. A new dried milk sampling technique and its application for progesterone detection in cows. Vet. J. 2014. 199(3). 471–472.

6. Sun D., Cho Y.I., Comyn P., Yoon K.J. Use of blood collected onto and dried on filter paper for diagnosing pregnancy in cattle. Vet J. 2013. 198(2). 494–497.

Для контакта с авторами:

Самсонова Жанна Васильевна

тел.: 8 (495) 939-34-07

e-mail: jvs@enz.chem.msu.ru

Осипов Александр Павлович

Кондаков Сергей Эмильевич

тел.: 8 (495) 237-22-26

Руденко Татьяна Владиславовна

Смоленский Владимир Иванович

тел.: 8 (495) 982-50-84, (499) 253-14-68, (499) 253-14-91

АГРОНОВОСТИ

Алтайские птицефабрики увеличивают производство яиц

По итогам работы за первое полугодие птицефабрики Алтайского края произвели 344 млн. яиц. В сравнении с аналогичным периодом прошлого года прирост составил 12 млн. штук.

Основная доля прибавки по-прежнему остаётся за птицефабрикой «Комсомольская» Павловского района. Из всего объёма в регионе она произвела почти половину. Собственный результат годичной давности птицефабрика превзошла на 10 процентов.

Положительная динамика в птицеводстве достигнута благодаря интенсивному развитию отрасли, использованию современного технологического оборудования и продуктивных кроссов, внедрению в производство современных научных достижений, реализации инвестиционных проектов.



ШЕЛОВСКИЙ БИОКОМБИНАТ

GMP

Одно из самых крупных российских предприятий агробиологической промышленности предлагает иммунобиологические лекарственные препараты для ветеринарного применения



реклама

Ⓢ Вирусвакцина против
ньюкаслской болезни из штамма
Бор-74 ВГНКИ сухая живая

Ⓢ Вирусвакцина против
ньюкаслской болезни из штамма
Ла-Сота сухая живая

ДЕЙСТВУЕТ ГИБКАЯ СИСТЕМА СКИДОК

Тел.: (495) 524-05-94, (495) 524-05-96
Факс: (495) 524-05-97

www.biocombinat.ru
e-mail: comerc@biocombinat.ru