ВЕТЕРИНАРНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 619:616.9:636.09
DOI 10.30975/2073-4999-2019-21-5-48-52

СУХИЕ ОБРАЗЦЫ КРОВИ ДЛЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ И АНАЛИЗА ПРИ КОНТРОЛЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПТИЦЫ[1]

DRIED BLOOD SAMPLES FOR TRANSPORTATION AND ANALYSIS DURING POULTRY POST-VACCINATION CONTROL

Самсонова Ж.В., *старший научный сотрудник, канд. хим. наук*
J.V. Samsonova, *senior researcher, Dr.Sci. in Chemistry*
Саушкин Н.Ю., *младший научный сотрудник*
N.Yu. Saushkin, *junior researcher*
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (МГУ им. М.В. Ломоносова)
Lomonosov Moscow State University

Осипов А.П., *старший научный сотрудник, канд. хим. наук*
A.P. Osipov, *senior researcher, Dr.Sci. in Chemistry*
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС» (НИТУ «МИСиС»), Москва
National University of Science and Technology "MISIS" (NUST "MISIS"), Moscow

Яковлев С.С., *заместитель директора по научной работе*
S.S. Yakovlev, *deputy director on science*
НПП «АВИВАК», Москва
SPE Avivac Ltd., Moscow

Рождественская Т.Н., *заведующая лабораторией болезней птиц, д-р вет. наук*
T.N. Rozhdestvenskaya, *Head of poultry diseases laboratory, Dr.Sci. in Veterinary*
ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), Москва
"All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants" — Branch of FSBSI FSC "ARSRIEV named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko"RAS, Moscow

Аннотация: *На примере инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни и микоплазмы синовиа-галлисептикум показана высокая степень соответствия результатов иммуноферментного анализа с использованием параллельных измерений жидких образцов сыворотки и сухих образцов цельной крови, коэффициент корреляции результатов составил около 0,9. Образцы цельной крови, отбираемые напрямую на впитывающие мембраны и после высушивания пересылаемые в лабораторию, могут служить удобной формой для транспортировки и проведения контроля поствакцинального иммунитета птицы стандартными методами.*

Abstract: *The concordance of parallel investigation of liquid serum samples and dried whole blood samples in ELISA was demonstrated for infectious bronchitis, bursal disease and mycoplasma synoviae-gallisepticum, correlation coefficient was about 0.9. Whole blood sampled directly from punction onto absorbent membrane, then dried and sene to laboratory can be considered as convenient transportation form for poultry post-vaccination immunity monitoring by standard methods.*

Ключевые слова: *сухие пятна крови, инфекционные болезни птицы, контроль вакцинации, иммуноферментный анализ.*

Key Words: *dried blood spots, poultry infectious diseases, vaccination control, enzyme-linked immunosorbent assay.*

Введение

Вакцинопрофилактика является одним из наиболее эффективных мероприятий по предотвращению распространения заболеваний среди птицы. Для контроля напряженности поствакцинального иммунитета используются серологические методы, например иммуноферментный анализ (ИФА).

На предприятиях зачастую весьма остро стоит проблема транспортировки биоматериала с сохранением его функциональных свойств для последующего анализа. Доставка жидкой сыворотки в диагностическую лабораторию сопряжена с необходимостью обеспечения температурных и временных условий,

[1] Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере», договор № 2558ГС1/41308.

что часто затруднено и приводит к дополнительным расходам.

Использование биопроб в высушенном виде на мембранных носителях является одним из путей решения данной проблемы. В настоящее время технологию получения сухих пятен крови (СПК) (*Dried Blood Spots, DBS*) применяют, как правило, в медицинских исследованиях, в частности при неонатальном скрининге [1]. Кровь в виде капель наносят на специальные целлюлозные карточки в зоны, обозначенные кругами, затем высушивают и пересылают в лабораторию для анализа. Преимуществами данной технологии являются значительное уменьшение объема отбираемого материала, высокая стабильность сухих образцов при хранении и возможность их пересылки без соблюдения температурных режимов.

В ветеринарной практике технология СПК пока не получила широкого распространения, и в настоящее время проводятся лишь отдельные исследования сухих биопроб птиц или животных [2]. Следует признать, что капельный способ нанесения жидкого биологического материала на носитель мало применим для отбора крови у животных и птицы. Важным ограничивающим фактором внедрения технологии СПК в ветеринарию является отсутствие подходящих и, главное, доступных по стоимости устройств или карточек для отбора проб, которые могли бы стать альтернативой традиционному отбору крови в жидком виде.

Ранее авторским коллективом был предложен стрипованный формат пробоподготовки, когда для впитывания биологической жидкости использовалась маркированная полоска (стрип) стекловолоконного мембранного материала [3]. На этапе отбора можно визуально оценить количество адсорбированного материала, а при проведении анализа удобно дозировать образец согласно маркировке. Преимуществами стекловолокна являются устойчивость к деформациям, равномерное распределение образца на носителе и эффективный (более 90%) смыв вещества в раствор. Ранее было показано успешное применение такого носителя биопроб для решения разных задач ветеринарной диагностики, например, определения прогестерона в цельном молоке коров, антител против возбудителей ряда инфекционных заболеваний иммунохимическими методами, а также возбудителя лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции [4–6]. Использование сухих проб удобно и экономично, при этом сохраняется возможность получения достоверных и воспроизводимых результатов на существующих тест-системах.

Цель данной работы заключалась в апробации метода использования мембранных материалов в виде тонких полосок (стрипов) для отбора и анализа проб цельной крови кур с целью определения титра поствакцинальных антител методом ИФА.

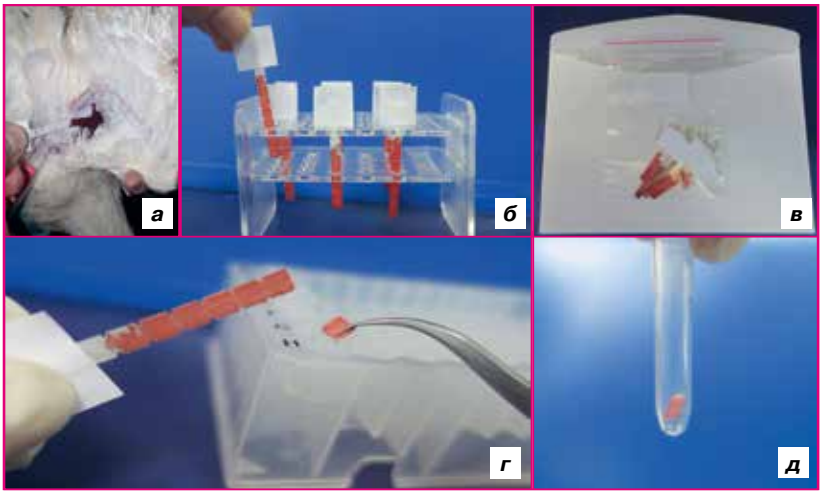


Рис. 1. Процедура отбора и анализа сухих проб.
Отбор цельной крови у кур на впитывающие мембраны (а); высушивание образцов (б); образцы, готовые к отправке в лабораторию (в); подготовка образцов перед анализом — отделение части мембраны с образцом (г); сухой образец в титротрубке (д)

Материалы и методы исследований

Образцы цельной крови брали у 13-месячных кур-несушек (СГЦ «Загорское ЭПХ» — филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН, Московская обл.) и ремонтного молодняка в возрасте 40 дн. (ООО ПФ «Романовская», Ярославская обл.). Для отбора проб у птицы делали прокол подкрыльцовой вены, и в образовавшийся наплыв крови опускали полоску впитывающей мембраны (*рис. 1а*). Мембранные полоски высушивали в течение 1–2 ч в штативе-держателе и помещали в пластиковый пакет с зип-локом (*рис. 1б, 1в*).

Кроме того, в пробирку отбирали не менее 1 мл крови и отделяли сыворотку. Образцы сыворотки также наносили на мембраны путем погружения конца полоски в пробирку и затем высушивали. Таким образом, для каждой особи были получены как сухие пробы (сухая цельная кровь и сухая сыворотка), так и жидкие (сыворотка). Жидкие образцы хранили при минус 20°С, сухие — в закрытых пакетах с осушителем при 4°С.

Для проведения ИФА отделяли часть мембраны размером 5×5 мм с высушенным образцом и смывали образец в буфер (500 мкл) в течение 15 мин при перемешивании (250 об./мин) (*рис. 1г, 1д*). Исследование смывов сухих и жидких образцов проводили с использованием ИФА на следующие заболевания: инфекционная бурсальная болезнь (ИББ), инфекционный бронхит (ИБК) и микоплазмоз кур.

Результаты исследований и обсуждение

Для составления поствакцинального профиля антител все жидкие образцы сыворотки исследовали на наличие антител к возбудителям ИБК, ИББ и микоплазмы с использованием соответствующих ИФА тест-систем. Для положительных проб были проведены параллельные исследования образцов сухой крови и соответствующей жидкой сыворотки (*рис. 2*).

Следует отметить, что наблюдалась высокая степень соответствия

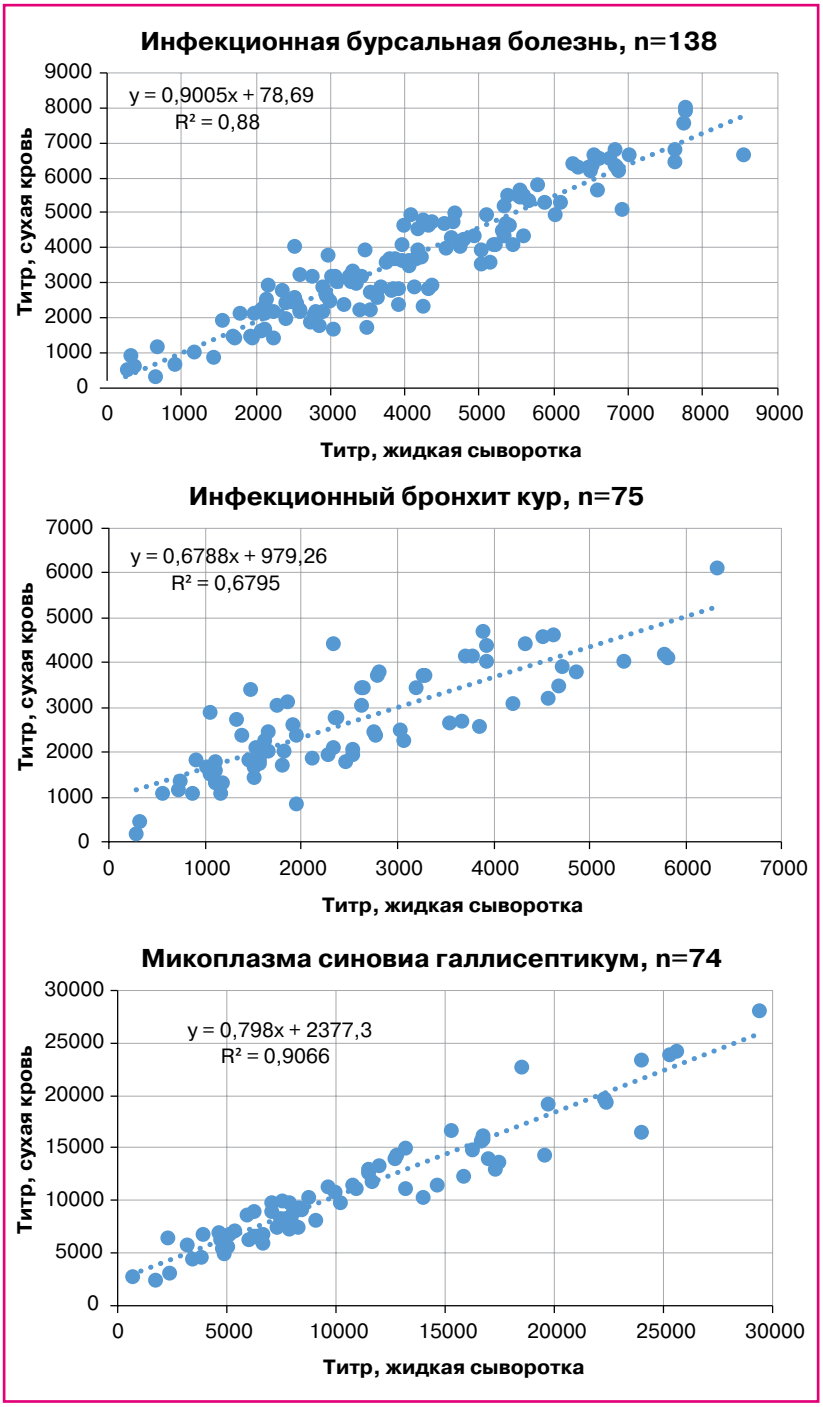


Рис. 2. Результаты определения титра поствакцинальных антител к инфекционным заболеваниям птицы методом ИФА в жидких образцах сыворотки крови и сухих образцах цельной крови кур

результатов параллельных исследований. Коэффициент корреляции результатов измерений жидких и сухих проб составил около 0,9. Несколько больший разброс результатов определения ИБК, видимо, связан с особенностями используемой тест-системы. Так, выявленное методом ИФА численное значение титра специфических антител на ИБК составило в среднем 118% (n=75), на ИББ — 95% (n=138), на микоплазму — 113% (n=74) от количества всех жидких образцов.

Большое значение имеет надежность новой методики работы с сухими образцами крови и ее воспроизводимость вне зависимости от лаборатории и персонала. В качестве контрольного эксперимента репрезентативную выборку проб жидкой сыворотки и сухой крови транспортировали из г. Москвы в Диагностический центр НПП «АВИВАК» (д. Горбунки, Ленинградская обл.), где провели исследования согласно разработанной методике. Результаты параллельных исследований проб жидкой сыворотки и сухой крови на наличие антител против ИББ и ИБК показали хорошую сходимость результатов: наблюдались аналогичные профили распределения титров (титрогрупп) и воспроизводимости по выборке (*табл. 1, рис. 3*). Параллельные исследования жидких и сухих проб сотрудниками двух лабораторий также имели высокую степень сходимости (*табл. 2*).

Стабильность сухих образцов крови и сыворотки изучали на примере ИББ, выдерживая образцы со значениями титров антител в диапазоне 2000–9000 при различных температурах: от суток при температуре 60°С до недели при температуре 4, 22, и 37°С (*рис. 4*). Результаты, полученные для сухих образцов, сравнивали с данными для жидкой сыворотки. Следует отметить более высокую стабильность образцов сухой крови по сравнению с сухой сывороткой. Снижение сигнала для хранящихся при повышенной температуре образцов цельной крови не превышало 10%, максимальное снижение (11%) наблюдалось при экстремальных условиях хранения — 24 ч при 60°С. Снижение сигнала для образцов сухой сыворотки по сравнению с образцами сухой крови было более значительным — до 25%.

Подобные результаты были получены и для других инфекций. Причины меньшей стабильности образцов сухой сыворотки по сравнению с сухой кровью не очевидны, однако можно предположить, что это связано с особенностями иммуноглобулинов птиц и состава сывороточных образцов. Известно, что у птиц в крови циркулирует особый вид иммуноглобулинов типа Y (IgY) [7], тогда как у животных основным является иммуноглобулин G (IgG).

Полученные данные показали, что отбор и транспортировка сухих образцов цельной крови в лабораторию могут быть осуществлены при различных

Таблица 1

Результаты параллельных исследований жидких образцов сыворотки и сухих образцов цельной крови (титры антител, ИФА) для ИББ и ИБК*

Показатель	ИББ		ИБК	
	жидк. сыв.	сух. кровь	жидк. сыв.	сух. кровь
Кол-во проб	46	46	46	46
Среднее геометр. титров по выборке	4 028	3 875	4 359	4 609
Среднее титров по выборке	4 706	4 695	5 202	5 405
Станд. отклонение	2 419	2 704	2 656	2 860
Коэфф. вариации (Cv), %	51,4	57,6	51,1	52,9
Минимальный титр по выборке	768	364	388	1 142
Максимальный титр по выборке	11 981	13 485	12 284	14 241

**Исследованы образцы крови кур-несушек СПЦ «Загорское ЭПХ» — филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН (Московская обл.)*

температурных условиях, например при повышенной температуре, без значительной потери свойств пробы при последующем выявлении специфических антител. После доставки образцов сухой крови в лабораторию их можно хранить как при 4°С, так и при комнатной температуре с сохранением свойств. При этом результаты анализа сухих образцов соответствуют результатам исследований жидкой сыворотки, стандартно использующейся для проведения поствакцинального контроля.

Таблица 2

Сравнение результатов ИФА (титров антител) сухих образцов крови и жидких образцов сыворотки для ИББ и ИБК, проведенных в двух лабораториях*

Показатель	Лаборатория № 1				Лаборатория № 2			
	ИББ		ИБК		ИББ		ИБК	
	жидк. сыв.	сух. кровь	жидк. сыв.	сух. кровь	жидк. сыв.	сух. кровь	жидк. сыв.	сух. кровь
Кол-во проб	29	29	29	29	29	29	29	29
Среднее геометр. титров по выборке	3750	3545	5506	5679	3086	2588	3353	3376
Среднее титров по выборке	4324	4347	5926	6172	3812	2922	3535	3491
Станд. отклонение	2178	2526	2241	2279	2001	1347	1156	867
Коэфф. вариации (Cv), %	50,4	58,1	37,8	36,9	52,5	46,09	32,7	24,83
Минимальный титр по выборке	768	364	2308	1339	261	545	1808	1986
Максимальный титр по выборке	10090	11443	11042	9642	8539	6658	5800	4870

**Исследованы образцы крови кур-несушек СПЦ «Загорское ЭПХ» — филиал ФНЦ «ВНИТИП» РАН (Московская обл.)*

ФАРМАТАН
farmatan®
Гидролизуемые эллаготанины из древесины сладкого каштана
АЛЬТЕРНАТИВА КОРМОВЫМ АНТИБИОТИКАМ
✓ Антибактериальный эффект
✓ Антидиарейный эффект
✓ Противовоспалительное и антиоксидантное воздействие
✓ Повышение иммунитета
✓ Усиление действия кокцидиостатиков
УЛУЧШАЕТ ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Компания ООО «СИВЕТРА-АГРО»
СИВЕТРА-АГРО
кормовые добавки для с/х животных и птицы
www.sivetra-agro.ru
Тел.: +7 499 653-59-43
+7 495 518-78-75
e-mail: office@sivetra-agro.ru
Производитель:
«Tanin Sevnica»
d.d.,Словения
Tanin SEVNICA
www.tanin.si
Естественный путь к здоровью и высокой продуктивности!

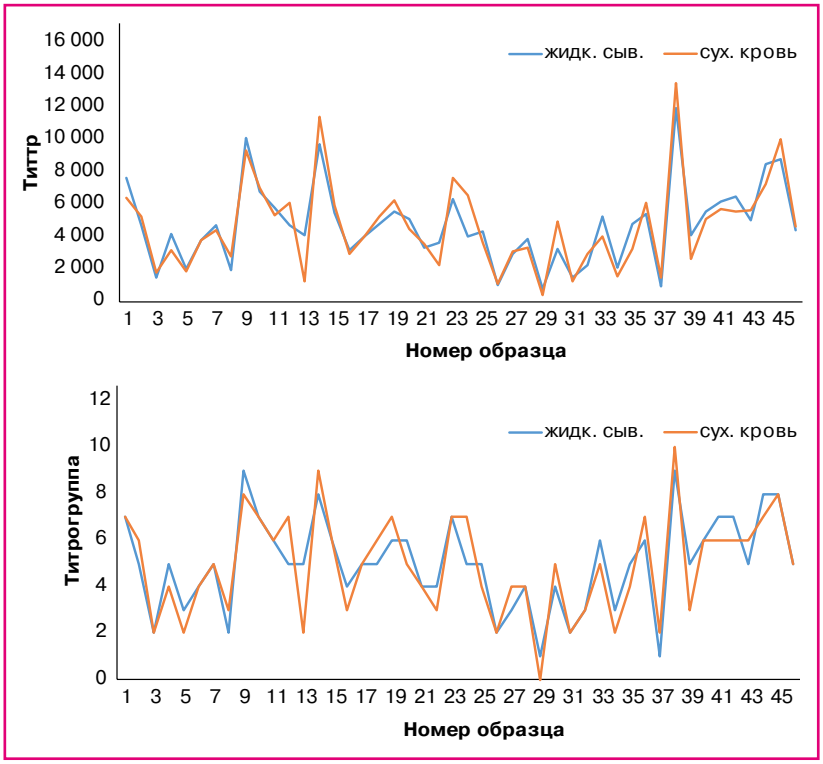


Рис. 3. Распределение значений титров и титрогрупп параллельных исследований проб жидкой сыворотки и сухой крови методом ИФА на наличие антител к ИББ

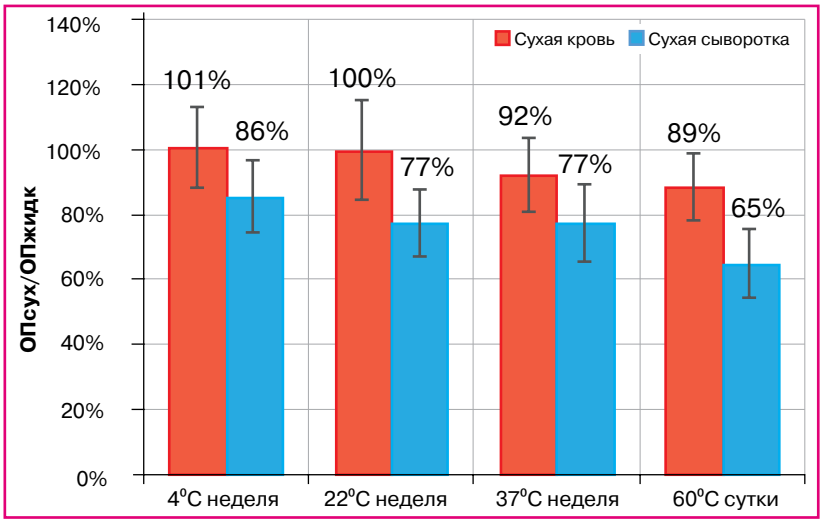


Рис. 4. Стабильность образцов сухой сыворотки и сухой цельной крови при хранении (снижение сигнала для образцов в ИФА относительно жидкой сыворотки)

Выводы

Закономерности, полученные на примере трех инфекционных заболеваний кур, можно в полной мере распространить и на определение поствакцинального иммунитета к другим инфекциям. Отбор крови напрямую на мембранный носитель, ее высушивание и использование для последующего анализа является удобным алгоритмом работы, поскольку отпадает необходимость отделения форменных элементов крови с целью получения жидкого образца сыворотки крови. Кроме того, облегчается процесс доставки проб в лабораторию, так как не требуется их охлаждение. Таким образом, технология получения сухих образцов цельной крови на мембранных стрипах упрощает процедуру отбора и транспортировку проб и позволяет проводить корректный контроль эффективности вакцинации птицы стандартными методами.

Литература

1. Sharma A. Dried blood spots: concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis / A. Sharma, S. Jaiswal, M. Shukla, J. Lal // Drug Testing and Analysis. — 2014. — Vol. 6. — P. 399–414.

2. Sun D. Use of blood collected onto and dried on filter paper for diagnosing pregnancy in cattle / D. Sun, Y.I. Cho, P. Comyn, K.J. // Veterinary Journal. — 2013. — Vol. 98. — P. 494–497.

3. Патент 2519030 РФ: МПК A61B 5/15. Устройство для получения, хранения и транспортировки сухих образцов жидкостных объектов, предназначенных для последующего проведения лабораторного анализа / Осипов А.П., Кондаков С.Э., Григоренко В.Г., Смоленский В.И., Прокопцева О.С., Самсонова Ж.В. — № 2013102274; заявл. 18.01.2013; опубл. 10.06.2014; бюл. № 16.

4. Samsonova J.V. A new dried milk sampling technique and its application for progesterone detection in cows / J.V. Samsonova, A.P. Osipov, S.E. Kondakov // Veterinary Journal. — 2014. — Vol. 199, No. 3. — P. 471–472.

5. Saushkin N.Y. Strip-dried blood sampling: applicability for bovine leukemia virus detection with ELISA and real-time PCR / N.Y. Saushkin, J.V. Samsonova, A.P. Osipov, S.E. Kondakov // Journal of Virological Methods. — 2019. — Vol. 263. — P. 101–104.

6. 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.E. Kondakov, S.N. Fomina, A.V. Mischenko // Applied Biochemistry and Biotechnology. — 2019. — Vol. 188, No 2 — P. 491–497.

7. Верховский О.А. Структурные и функциональные особенности иммуноглобулинов птиц / О.А. Верховский, Ю.Н. Федоров, М.М. Гараева, Т.И. Алипер // Ветеринария. — 2007. — № 11. — С. 18–22.

Для контактов с авторами:
Самсонова Жанна Васильевна
e-mail: *jvsamsonova@gmail.com*
Саушкин Николай Юрьевич
Осипов Александр Павлович
Яковлев Сергей Сергеевич
Рождественская Татьяна Николаевна