

УДК 619:578.828.11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕМБРАННОЙ СИСТЕМЫ НОВОГО ФОРМАТА

Ж.В. Самсонова¹, А.С. Чадина¹, А.П. Осипов², С.Э. Кондаков², Т.Е. Макарова³,
А.Б. Комаров³

¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова;
²Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; ³ООО
«Компания Биоком»; e-mail: jvs@enz.chem.msu.ru)

Проведено определение вируса лейкоза крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в сухих пятнах крови, полученных с использованием мембранной системы нового формата. Результаты анализа жидких и сухих образцов цельной крови коров полностью совпадали между собой и с данными ветеринарной лаборатории. Найдено, что для выявления ДНК-копии вируса можно использовать любой участок мембранной полоски размером 0,5×0,5 см с нанесенным образцом. Показано, что провирусная ДНК в сухих пятнах крови сохраняет стабильность при хранении в течение 8 сут при 37°C и 24 ч при 60°C. Новая система пробоподготовки цельной крови в виде сухих пятен может быть использована для отбора образцов в полевых условиях в целях последующего проведения лабораторного анализа.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота, полимеразная цепная реакция, сухие пятна крови.

Лейкоз крупного рогатого скота – хроническая ретровирусная инфекционная болезнь с длительным латентным периодом, поражающая органы кроветворной системы [1]. Для оздоровления стада проводят комплекс диагностических мероприятий, в результате которых отделяют и выбраковывают инфицированных животных. Диагностика животных, зараженных вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), строится на комбинированном использовании ряда методов [1–3]. Основу диагностики составляют серологические методы – реакция иммунодиффузии (РИД) в агарозном геле и иммуноферментный анализ (ИФА). С помощью этих методов выявляют наличие в организме исследуемых животных специфических антител, распознающих белки оболочки вируса-возбудителя. При этом метод РИД уступает ИФА по чувствительности, точности и специфичности, поскольку преципитацию специфических комплексов оценивают визуально. Наличие самого вируса-возбудителя, точнее провируса, т.е. интегрированной в геном клетки-хозяина ДНК-копии вируса, проводят с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволяет с большей специфичностью и чувствительностью выявлять инфицированных животных, в том числе и среди серонегативных особей. Это единственный метод, позволяющий проводить скри-

нинг носителей вируса-возбудителя среди молодняка (до шестимесячного возраста), у которого иммунный ответ еще не выработан. В литературе описаны и другие, более чувствительные, модификации метода ПЦР ВЛКРС как в крови, так и в молоке коров – ПЦР в режиме реального времени, гнездовая ПЦР [4], а также комбинированный метод ПЦР–ИФА [5].

В последние годы во всем мире (преимущественно для медицинской диагностики) получила широкое распространение технология отбора, транспортировки, хранения и анализа проб биологических жидкостей в виде сухих пятен – DBS (от англ. *dried blood spot*, сухое пятно крови – СПК) [6]. При использовании технологии СПК несколько капель образца наносят на небольшой лист подготовленной целлюлозной бумаги, входящий в состав специальной карточки, и высушивают на воздухе. В таком виде образец биоматериала можно хранить в течение продолжительного времени с сохранением функциональных свойств содержащихся в нем компонентов. После транспортировки в лабораторию сухой образец смывают с вырезанной из пятна части мембраны в виде диска определенного размера (3–6 мм) и проводят выявление исследуемых веществ стандартными аналитическими методами. К преимуществам технологии СПК следует отнести простоту и доступность использования

карточек для отбора и хранения образцов, существенное сокращение расходов на хранение и транспортировку образцов за счет отсутствия холодильной цепи, возможность использования для массовых скринингов. В последние годы технологию СПК стали все чаще применять для ветеринарной диагностики, в частности, для дистанционного отбора образцов биологических жидкостей (крови, молока, мочи и др.) у животных в полевых условиях в местах их массового содержания [6, 7]. В литературе описано применение технологии СПК для определения ДНК (РНК) вирусов-возбудителей в крови методом ПЦР [6, 8]. Предложены новые форматы пробоподготовки образцов по технологии СПК [7, 9, 10]. Однако данные об использовании ПЦР для диагностики ВЛКРС в сухих пятнах крови в литературе отсутствуют.

Ранее предложенный нами метод пробоподготовки образцов цельного молока коров в виде сухих пятен на пористых мембранных носителях был использован для количественного определения прогестерона методом ИФА для раннего выявления нестельных особей [7]. Цель данной работы – разработка методики анализа ВЛКРС в сухих пятнах крови методом ПЦР с использованием нового формата пробоподготовки образцов.

Материалы и методы

Отбор и подготовка образцов

Кровь из хвостовой вены коров (8 голов) голштино-фризской породы (ООО «АПК Никулино», Московская обл.) в объеме нескольких миллилитров отбирали в пробирки S-Monovette® 7,5 мл, 92×15 мм, ЭДТА («Sarstedt», Германия) и хранили при 4°C до проведения анализа. Для получения сухих образцов конец мембранной полоски, входящей в состав карточки для отбора образцов «Иммуновед-СПК» («Иммуновед», Россия), погружали на глубину 2–3 мм в образец крови под наклоном около 45° и выдерживали до полного смачивания полоски. Для получения сухого образца № 9 стерильным скарификатором выполнили небольшой прокол кожи в районе ушной вены и намочили мембранную полоску вытекающей

кровью. Полоски сушили в течение 2 ч при комнатной температуре, помещали в пакет с осушителем, плотно закрывали и хранили при 4°C. Для анализа отделяли части мембраны в виде квадрата (0,5×0,5 см) с помощью ножниц.

Определение ВЛКРС в цельной крови коров методом ПЦР

Выделение и очистка нуклеиновых кислот для ПЦР. Выделение и очистку нуклеиновых кислот проводили с помощью набора реагентов «Ferrosil KFml uni» для выделения и очистки ДНК и РНК на магнитном сорбенте (универсальный, ООО «Компания Биоком», Россия). В первую ячейку специального стрипа из 5 лунок вносили 370 мкл лизирующего раствора и 20 мкл суспензии магнитных частиц, во вторую – 500 мкл рабочего отмывочного раствора № 1, в третью и четвертую – по 500 мкл рабочего отмывочного раствора № 2, в пятую – 100 мкл элюирующего раствора. Для выделения нуклеиновых кислот из жидких образцов цельной крови в первую ячейку вносили 30 мкл образца. Для анализа сухих пятен крови на мембране в пробирку вносили 400 мкл лизирующего раствора, две части мембраны в виде квадрата (0,5×0,5 см) и встряхивали ее на вибрационном смесителе. Раствор инкубировали в течение 30 мин, периодически встряхивая. После инкубации переносили 400 мкл раствора в первую ячейку. Далее выделение и очистку нуклеиновых кислот проводили на процессоре магнитных частиц «King Fisher ml» («Thermo Scientific», США).

Проведение ПЦР. Для амплификации ДНК ВЛКРС методом ПЦР использовали набор реагентов «GenPak DNA PCR test» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). В реакционные пробирки, содержащие лиофилизованные компоненты реакции, вносили 10 мкл раствора буфера для разбавления, 10 мкл раствора выделенной и очищенной ДНК и 5 мкл вазелинового масла. ПЦР проводили на амплификаторе «Sens Quest lab cyler» («SensoQuest GmbH», Германия) по программе, представленной в таблице.

Программа проведения ПЦР

Номер стадии	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	94	3 мин	1
2	94	20 с	40
3	60	30 с	40
4	72	30 с	40
5	72	3 мин	1

Для визуализации результатов ПЦР использовали метод горизонтального электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с добавлением бромида этидия. В лунки агарозного геля вносили 10 мкл реакционной смеси, положительный и отрицательный контроль. Электрофорез проводили в течение 30 мин при напряжении постоянного тока 166 В (сила тока 250 мА). Результаты электрофореза регистрировали в УФ-трансиллюминаторе с использованием видеосистемы.

Результаты и обсуждение

В данной работе новую мембранную систему пробоподготовки образцов биологических жидкостей в виде сухих пятен использовали для определения ВЛКРС методом ПЦР в цельной крови коров. В отличие от традиционной технологии СПК сухие образцы получали на носителе, выполненном в виде тонкой полоски с маркировкой [11]. Образец наносили на конец полоски, после чего он под действием капиллярных сил равномерно распространялся вдоль нее. После высушивания полосок для проведения анализа отрезали части мембраны с высушенным образцом размером 0,5×0,5 см. Удельная емкость мембраны по воде составляет 59 ± 3 мг/см² (экспериментальные данные), поэтому для выделения нуклеиновых кислот использовали две части мембраны размером 0,5×0,5 см, содержащие количество образца, эквивалентное жидкой аликвоте, используемой для аналогичного выделения. Анализ жидких и сухих образцов проводили следующим образом: с использованием магнитного сорбента из полученных образцов выделяли и очищали нуклеиновые кислоты, затем проводили амплификацию провирусной ДНК и визуализировали результаты ПЦР с помощью горизонтального электрофореза (рис. 1). При анализе сухих образцов перед стадией выделения проводили предварительную инкубацию отделенных частей мембраны с высушенным образцом в лизирующем буфере. В итоге наличие ВЛКРС было выявлено в шести образцах цельной крови коров (положительные образцы), а три образца были идентифицированы как отрицательные, т.е. не содержащие искомого ДНК-копию вируса-возбудителя. Результаты анализа жидких и сухих образцов методом ПЦР полностью совпали между собой и с независимыми данными Домодедовской станции по борьбе с болезнями животных (предоставлены ООО «АПК Никулино», Московская обл.). Далее на примере нескольких положительных образцов исследовали распределение ДНК ВЛКРС на разных участках мембранной полоски с сухим образцом, а также оценивали чувствительность определения. Для

изучения распределения ДНК ВЛКРС последовательно отрезали участки мембраны (0,5×0,5 см) с нанесенным образцом крови и анализировали методом ПЦР (рис. 2). При оценке чувствительности определения выявляли провирусную ДНК, используя от одного до четырех участков мембраны в виде квадратов размером 0,5×0,5 см (рис. 3). Полученные результаты показывают, что для выявления ВЛКРС в

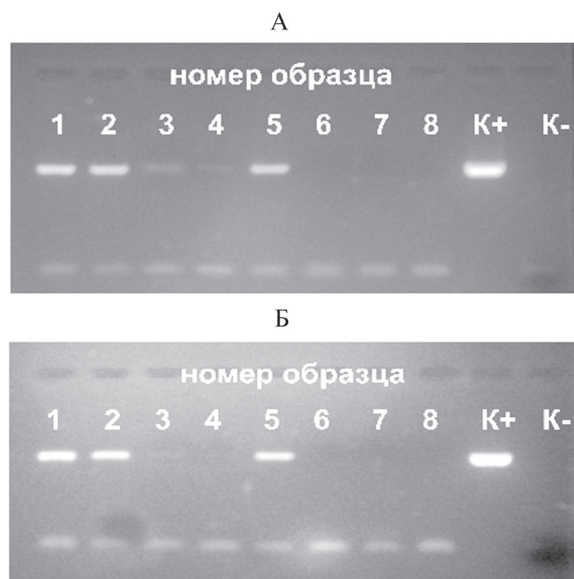


Рис. 1. Результаты анализа ВЛКРС в цельной крови коров методом ПЦР (А – жидкие образцы, Б – сухие образцы); К⁺ – положительный контроль, К⁻ – отрицательный контроль

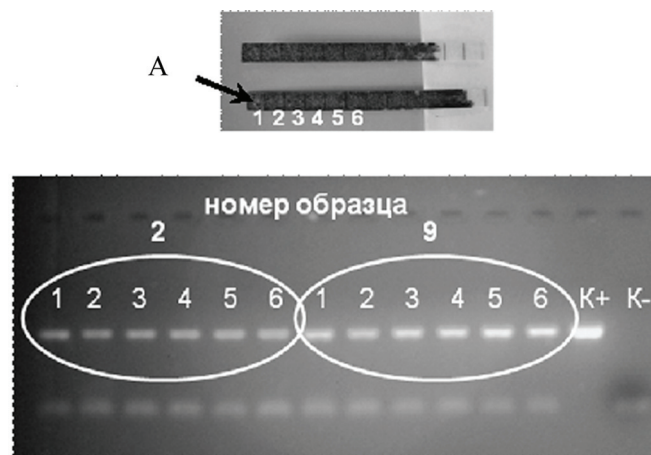


Рис. 2. Результаты анализа ВЛКРС в сухих образцах цельной крови коров методом ПЦР на разных участках мембраны: (1–6) – номер участка мембраны размером 0,5×0,5 см; А – внешний вид мембраны с нанесенным образцом крови; стрелкой обозначено место нанесения образца; К⁺ – положительный контроль, К⁻ – отрицательный контроль

сухих пятнах цельной крови можно использовать любой участок мембранной полоски с нанесенным образцом, а для достоверного определения ДНК-копии вируса достаточно использовать одну часть мембраны (в виде квадрата), что эквивалентно около 15 мкл жидкого образца.

При транспортировке получаемых в полевых условиях образцов биологических жидкостей в аналитическую лабораторию большое значение имеет стабильность пересылаемого материала. В частности, при длительном временном интервале транспортировки жидких образцов необходимо соблюдать определенные температурные условия (например, замораживать образцы и осуществлять их перевозку в специальных контейнерах). В этой связи для ряда положительных образцов исследовали стабильность ДНК ВЛКРС в сухих пятнах цельной крови. Установлено, что при хранении сухих пятен крови в течение восьми суток при комнатной температуре и 37°C, а также в течение 24 ч при температуре 60°C в них выявляется ДНК ВЛКРС (рис. 4). Модельные эксперименты по стабильности, фактически имитирующие температурные условия транспортировки образцов, показали, что образцы крови в виде сухих пятен можно перевозить/пересылать в аналитическую лабораторию для последующего анализа на наличие провирусной ДНК без соблюдения специальных температурных условий.

Таким образом, разработана методика проведения анализа ВЛКРС методом ПЦР в сухих пятнах цельной крови коров в новом формате пробоподготовки. Использование тонких полосок мембранного материала для нанесения образца представляет собой более удобный способ получения сухих пятен биологических жидкостей по сравнению с традиционной технологией СПК на основе бумажных карточек, в которых капля крови должна быть нанесена четко по

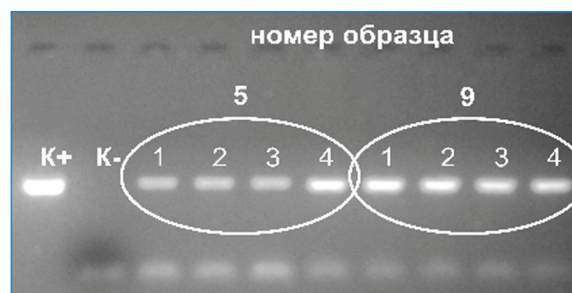


Рис. 3. Результаты выявления ВЛКРС в сухих образцах цельной крови коров методом ПЦР с использованием разного числа участков мембраны с образцом: (1–4) – число участков мембраны размером 0,5×0,5 см, использованных для выделения ДНК; K⁺ – положительный контроль, K⁻ – отрицательный контроль

центру обозначенного круга. В новом формате пробоподготовки для анализа достаточно использовать любой участок мембраны размером 0,5×0,5 см вне зависимости от удаленности от места нанесения образца. Стабильность провирусной ДНК, продемонстрированная при хранении образцов цельной крови в виде сухих пятен в широком диапазоне температур, позволяет увеличить доступность и снизить стоимость диагностических услуг для животноводческих хозяйств. Отбор крови с использованием новой мембранной системы малотравматичен для животного. Кровь может быть отобрана из небольшого прокола на коже, например из уха. Необходимый для смачивания одной мембранной полоски объем пробы составляет всего лишь 100 мкл, что намного меньше объема цельной крови (несколько миллилитров), который традиционно отбирают в пробирки с помощью шприца для последующего анализа. Сухие образцы также не требуют охлаждения и специальных контейнеров для осуществления транспортировки в диагностическую лабораторию.



Рис. 4. Результаты анализа ВЛКРС в цельной крови коров методом ПЦР при разных условиях хранения образцов (K⁺ – положительный контроль, K⁻ – отрицательный контроль). Условия хранения образцов: а – жидкий, б – сухой 4°C 8 сут., в – сухой 37°C 8 сут., г – сухой 60°C 24 ч

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»; 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. Ковалюк Н.В., Сауук В.Ф., Мачульская Е.В. // Ветеринария Кубани. 2007. № 1. С. 11.
3. Rola-Luszczak M., Finnegan C., Olech M., Choudhury B., Kuzmak J. // J Virol Meth. 2013. **189**. N 2. P. 258.
4. Kuckleburg C.J., Chase C.C., Nelson E.A., Marras S.A.E., Dammen M.A., Christopher-Hennings J. // J. Vet. Diagn. Invest. 2003. **15**. N 1. P. 72.
5. Rola M. Kuzmak J. // J. Virol. Meth. 2002. **99**. N 1. P. 33.
6. Demirev P.A. // Anal. Chem. 2013. **85**. N 2. P. 779.
7. Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E. // Vet. J. 2014. **199**. N 3. P. 471.
8. Meesters R.J.W., Hooff G.P. // Bioanalysis. 2013. **5**. N 17. P. 2187.
9. <http://www.spotonsciences.com>.
10. Li F., Zulkoski J., Fast D., Michael S. // Bioanalysis. 2011. **3**. N 20. P. 2321.
11. 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 20.06.14

DETECTION OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS BY POLIMERASE CHAIN REACTION IN DRIED BLOOD SPOTS USING A MEMBRANE SYSTEM OF NEW FORMAT

J.V. Samsonova¹, A.S. Chadina¹, A.P. Osipov², S.E. Kondakov², T.E. Makarova³, A.B. Komarov³

¹Division of Chemical Enzymology; ²National University of Science and Technology «MISiS»; ³Biokom, Moscow)

A method of bovine leukemia virus detection by polymerase chain reaction (PCR) in dried blood spots was developed utilizing a membrane system of new format for sample collection. Results of analysis of liquid and dried samples of cows' whole blood were in full agreement along with the data of a veterinary laboratory. It was found that to perform analysis it is possible to use any part of a membrane strip (0.5×0.5 cm) with an applied sample. Provirus DNA was stable in dried blood spots during 8 days storage at 37°C and 24 hours storage at 60°C. New sampling system of whole blood in a form of dried spots can be used for field collection of samples followed by their analysis in a laboratory.

Key words: bovine leukemia virus, polymerase chain reaction, dried blood spots.

Сведения об авторах: Самсонова Жанна Васильевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (jvs@enz.chem.msu.ru); Чадина Анастасия Сергеевна – студентка химического факультета МГУ (azazel06@mail.ru); Осипов Александр Павлович – ст. науч. сотр. кафедры функциональных наносистем и высокотемпературных материалов НИТУ МИСиС, канд. 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); Макарова Татьяна Евгеньевна – инженер ООО «Компания Биокон»; Комаров Андрей Борисович – директор ООО «Компания Биокон» (bk@biokom.ru).