

УДК 619:578.828.11

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ПЦР И ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

Н.Ю. Саушкин^{1*}, Ж.В. Самсонова^{1,2}, А.П. Осипов^{1,2}, С.Э. Кондаков^{1,2},
Н.И. Хаммадов³, К.В. Усольцев³, Х.З. Макаев³, А.Н. Чернов³

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», г. Москва; ³ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань; *e-mail: sushk_90@mail.ru)

Проведено сравнение методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) для диагностики лейкоза крупного рогатого скота с использованием сухих пятен крови, полученных на пористых мембранных носителях. Анализ образцов методом ПЦР в режиме реального времени проводили на нескольких диагностических тест-системах. Методом ПЦР было выявлено 19 положительных образцов, методом ИФА – 20, при этом для 14 образцов результаты совпадали. 26 образцов были определены как положительные на лейкоз при совместном использовании методов ПЦР и ИФА, что составило 47% от общего числа исследованных проб. Результаты анализа сухих и нативных образцов практически полностью совпадали. Полученные результаты показали возможность использования метода пробоподготовки образцов цельной крови в виде сухих пятен на мембранах в качестве удобного и надежного способа получения сухих образцов биологических жидкостей с целью мониторинга стад на наличие инфекционных заболеваний, в частности лейкоза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: энзоотический лейкоз, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, пористые мембранные носители, сухие пятна крови.

Технология сухих пятен крови (от англ. DBS – Dried Blood Spot) в последние годы получает все более широкое распространение в медицине и ветеринарии [1]. Для получения сухих пятен образец жидкой крови пациента по каплям наносят на специальную мембранную карточку из целлюлозного материала и высушивают. Полученный таким образом образец обладает высокой стабильностью при хранении и транспортировке даже при комнатной температуре, что дает возможность направлять сухие образцы биологических жидкостей в диагностическую лабораторию посредством курьерской или почтовой службы без использования холодной цепи. Для проведения анализа из мембраны специальным устройством вырезают круг определенного диаметра, с которого элюируют содержащийся на этом участке высушенный образец. Далее в полученном растворе проводят выявление исследуемых веществ стандартными аналитическими методами. Нами был предложен новый формат пробоподготовки в виде сухих пятен на полосках мембраны из пористого стекловолоконного материала [2]. Данный формат был успешно применен для отбора, хранения и анализа сухих образцов молока методом иммуно-

ферментного анализа (ИФА) для количественного определения прогестерона в целях выявления нестельных особей [3], а также для определения провирусной ДНК вируса лейкоза методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией [4]. В данной работе внимание уделялось определению вирусного лейкоза крупного рогатого скота (КРС) в сухих образцах крови, диагностику которого проводили с помощью как ПЦР в режиме реального времени, так и ИФА.

Лейкоз КРС – хроническая инфекционная ретровирусная болезнь, вызываемая РНК-содержащим вирусом семейства Retroviridae. Источником возбудителя болезни являются инфицированные вирусом лейкоза КРС животные на всех стадиях инфекционного процесса. Факторами передачи вируса являются кровь, слюна, молоко и другие биологические жидкости, содержащие лимфоидные клетки. В последние годы энзоотический лейкоз КРС занимает в РФ одно из ведущих мест в инфекционной патологии. На долю лейкоза КРС приходится более половины установленных случаев инфекционных заболеваний. Для борьбы с болезнью необходима своевременная диагностика и выбраковка зараженных лейкозом животных [5].

В основе диагностики энзоотического лейкоза КРС лежат серологические методы, такие как реакция иммунодиффузии в агарозном геле (РИД) и ИФА. Эти методы направлены на выявление специфических антител, вырабатываемых организмом зараженного животного в качестве иммунного ответа на чужеродный белок вируса-возбудителя. В отличие от метода РИД, который основан на визуальном детектировании преципитации комплексов антиген-антитело, метод ИФА обладает большей чувствительностью и специфичностью и позволяет получить результаты анализа в течение нескольких часов. Наличие провирусной ДНК, содержащейся в геноме зараженной клетки, определяют с помощью метода ПЦР. Применение этого метода позволяет выявлять зараженных животных среди серонегативных особей, т.е. среди тех, у которых еще не успел выработаться иммунный ответ, а также у молодняка до 6 месяцев. Таким образом, комплексное использование двух методов анализа (ПЦР и ИФА) позволяет наиболее полно проводить мониторинг стад на наличие вирусных инфекций, таких как лейкоз КРС, и своевременно проводить оздоровительные мероприятия [6].

Цель данной работы – применение методов ПЦР и ИФА для определения лейкоза КРС в сухих образцах крови, полученных на пористых мембранных носителях, а также сравнение результатов определения провирусной ДНК вируса лейкоза КРС несколькими ПЦР тест-системами.

Материалы и методы

Отбор и подготовка сухих образцов крови.

В качестве носителя сухого образца использовали мембранную полоску из стекловолоконного материала шириной 0,5 см с нанесенной маркировкой (карточка для хранения и транспортировки биологических жидкостей в виде сухих пятен производства ООО «Иммуновед», Москва). Исследования проводили с образцами цельной крови КРС из животноводческих хозяйств Республики Татарстан, отобранными во время планового мониторинга стад на наличие зараженных лейкозом особей. Начальный участок мембраны помещали в образец жидкой крови и выдерживали в течение времени, которое необходимо для поднятия жидкости на всю длину полоски. Затем полоску с образцом высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч. Высушенные образцы хранили при 4 °С в плотно закрытых пластиковых пакетах с осушителем.

Выявление провирусной ДНК вируса лейкоза КРС в сухих пятнах крови методом ПЦР в режиме реального времени. Для выделения нукле-

иновых кислот использовали наборы реагентов: «АмплиПрайм РИБО-преп», («ИнтерЛабСервис», Москва), «МАГНО-сорб» («ИнтерЛабСервис», Москва) и «Универсальный» («Биоком», Москва). От мембраны с образцом сухой крови стерилизованными ножницами, согласно маркировке, отрезали 3 равные части размером 0,5×0,5 см и помещали в пробирку объемом 1,5 мл. Перед началом работы с новым образцом лезвия ножниц повторно стерилизовали. В пробирку добавляли по 300 мкл рабочего буфера и инкубировали в течение 20 мин, периодически встряхивая с использованием вортекса. После окончания инкубации пробирку центрифугировали в течение 5 с при 12000 об/мин для снятия жидкости со стенок и крышки. Полученный раствор переносили в чистую пробирку. Дальнейшие шаги по выделению ДНК из образца проводили согласно инструкции к набору. Анализ жидкой крови проводили в одном повторе, используя аликвоту 100 мкл. Выделенную ДНК амплифицировали в режиме реального времени с использованием трех тест-систем: ПЦР-1 («ЛЕЙКОЗ» «ИнтерЛабСервис», Москва), ПЦР-2 («Биоком», Москва), ПЦР-3 (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань) на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва) или «CFX-96» («BIO-RAD», США).

Определение антител к вирусу лейкоза КРС в сухих пятнах крови методом ИФА. Для проведения качественного ИФА в целях выявления антител к белку gp51 вируса лейкоза КРС использовали диагностический набор реагентов BLV Antibody Test Kit (IDEXX, Франция). Для проведения анализа от мембраны с сухим образцом крови (согласно маркировке) отрезали ножницами участок мембраны размером 0,5×0,5 см и помещали его в лунку 96-луночного планшета. Образцы исследовали в двух повторах. В лунки с образцами добавляли 200 мкл буфера для разведения образцов. Образцы перемешивали на шейкере при 120 об/мин в течение 10 мин, затем накрывали крышкой и инкубировали 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, приложенной к диагностическому набору. Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре «Anthos 2010» («Biochrom Ltd», Великобритания) при длине волны 450 нм. Анализ жидких образцов сыворотки проводили согласно инструкции к набору.

Результаты и обсуждение

Для эффективного выделения ДНК из проб крови, высушенных на мембранных носителях, необ-

ходимо было обеспечить наиболее полное элюирование образца, содержащего искомую ДНК, с полоски мембранного материала. Экспериментально было установлено, что время элюирования сухой крови должно составлять не менее 20 мин с тщательным периодическим перемешиванием образца. С использованием праймеров экзогенного контроля было показано, что полученный после элюирования сухого образца раствор содержал в себе общую ДНК. Результаты ПЦР жидких и сухих образцов крови в режиме реального времени на наличие провирусной ДНК вируса лейкоза КРС, полученные с использованием тест-систем ПЦР-1 и ПЦР-3, представлены в табл. 1. ДНК выделяли методом спиртового осаждения. Обе системы показали практически идентичные результаты при анализе жидких образцов. В двух сухих образцах (№ 8 и № 22), в отличие от жидких, провирусная ДНК не была выявлена, причем образец № 8 оказался отрицательным в обеих системах. Это связано, вероятно, с малым количеством выделенной из сухих образцов ДНК, что может быть следствием недостаточного количества сухого образца, взятого для анализа. В эксперименте использовали 3 квадратных участка мембраны с образцом, что эквивалентно половине объема аликвоты жидкой крови (100 мкл).

Течение болезни таково, что число инфицированных лимфоидных клеток в крови зараженного животного индивидуально у каждой особи и сильно зависит от стадии протекания болезни. Так, например, вирус может поражать только внутренние органы и ткани, а количество клеток периферической крови, содержащих провирусную ДНК, может быть недостаточным для амплификации в аликвоте, используемой для выделения генетического материала. Для увеличения чувствительности метода следует использовать большее число участков мембраны на стадии элюирования сухого образца и проводить анализ в нескольких повторах. Сравнение полученных в ПЦР результатов с результатами серологического исследования образцов методом ИФА показало, что 2 ПЦР-положительных образца оказались серонегативными, а 4 сероположительных – ПЦР-отрицательными. В первом случае результат является следствием прямого выявления поражающего фактора (провиральной ДНК) методом ПЦР, в отличие от косвенного серологического, который не может выявить антитела у животных на ранних стадиях инфицирования. Во втором случае расхождение результатов может быть следствием либо недостаточной чувствительности ПЦР при

выявлении провирусной ДНК в связи с ее малым содержанием в крови в определенные стадии болезни, либо ошибкой ИФА, давшего ложноположительные результаты. Ложноположительные результаты в ИФА могут быть следствием повышенного уровня антител либо у взрослых особей после вакцинации или отела, либо у молодняка зараженных коров (до шести месяцев), имеющих так называемый колосторальный иммунитет. Анализ этих образцов следует повторить спустя несколько месяцев с помощью ИФА и ПЦР, а подозрительных животных изолировать от общего стада.

В табл. 2 представлено сравнение результатов, полученных для жидких и сухих образцов с помощью систем ПЦР-1 и ПЦР-2 при амплификации ДНК, полученной двумя методами выделения. В двух сухих образцах (№ 2 и № 20) при использовании сорбентного метода выделения искомая ДНК не была обнаружена, а при выделении методом спиртового осаждения данные сухие образцы аналогично жидким были определены как положительные. Выделение генетического материала из сухих образцов с помощью сорбентных магнитных частиц оказалось менее эффективным, чем выделение ДНК методом спиртового осаждения. Во втором случае были выявлены дополнительно 4 положительных образца. Кроме того, время проведения стадий выделения ДНК по методике, основанной на спиртовом осаждении, значительно меньше, чем при сорбентном выделении, включающем большое число промывок сорбента. Каждая последующая промывка сорбента может приводить к потерям сорбированной на нем ДНК, что отразилось на конечных результатах. Как видно из табл. 2, результаты амплификации выделенной ДНК для разных ПЦР тест-систем в некоторых случаях расходятся, что, вероятно, связано с разным набором праймеров, используемых в этих системах. Подбор праймеров при создании тест-системы основывается на данных о последовательности нуклеотидов того или иного участка провирусной ДНК различных генотипов вируса и может быть направлен как на консервативные участки, так и на переменные. Выделяют 8 различных генотипов вируса лейкоза КРС, которые имеют выраженное географическое распространение [7]. Однако даже в пределах одного хозяйства могут наблюдаться несколько генотипов вируса, завезенных вместе с зараженными особями из других стран и регионов. Это усложняет создание универсального набора праймеров и приводит к появлению ложноотрицательных результатов при ПЦР анализе, снижая его эффективность.

Т а б л и ц а 1

Результаты анализа сухих и жидких образцов цельной крови КРС методом ПЦР (спиртовое осаждение) и методом ИФА

Тест-система	ПЦР-1		ПЦР-3		ИФА
	сухой	жидкий	сухой	жидкий	
1	отр	отр	отр	отр	отр
2	отр	отр	отр	отр	отр
3	отр	отр	отр	отр	отр
4	отр	отр	отр	отр	отр
5	отр	отр	отр	отр	отр
6	отр	отр	отр	отр	отр
7	отр	отр	отр	отр	отр
8	отр	пол	отр	пол	пол
9	отр	отр	отр	отр	отр
10	отр	отр	отр	отр	пол
11	отр	отр	отр	отр	отр
12	отр	отр	отр	отр	отр
13	отр	отр	отр	отр	отр
14	пол	пол	пол	пол	пол
15	отр	отр	отр	отр	отр
16	отр	отр	отр	отр	отр
17	отр	отр	отр	отр	отр
18	отр	отр	отр	отр	пол
19	отр	отр	отр	отр	пол
20	отр	отр	отр	отр	пол
21	пол	пол	пол	пол	пол
22	пол	пол	отр	пол	пол
23	пол	пол	пол	пол	пол
24	пол	пол	пол	пол	пол
25	отр	отр	отр	отр	отр
26	–	–	пол	пол	пол
27	–	–	отр	отр	отр
28	–	–	пол	пол	пол
29	–	–	пол	пол	пол
30	–	–	пол	пол	отр
31	–	–	отр	отр	отр
32	–	–	отр	отр	отр
33	–	–	отр	отр	отр
34	–	–	отр	отр	отр
35	–	–	пол	пол	отр

О б о з н а ч е н и я: пол – положительные пробы; отр – отрицательные пробы; прочерк (–) означает, что определения не проводили.

Т а б л и ц а 2

Результаты анализа сухих и жидких образцов цельной крови КРС методом ПЦР с использованием двух методов выделения ДНК и методом ИФА

Номер образца	Тест-система					
	ПЦР-1* (жидкий)	ПЦР-1* (сухой)	ПЦР-2* (жидкий)	ПЦР-2* (сухой)	ПЦР-2** (сухой)	ИФА (сухой)
1	пол	пол	пол	пол	пол	пол
2	пол	отр	пол	отр	пол	пол
3	отр	отр	отр	отр	пол	отр
4	отр	отр	отр	отр	отр	отр
5	отр	отр	отр	отр	отр	отр
6	отр	отр	пол	отр	отр	пол
7	отр	отр	отр	отр	отр	отр
8	отр	отр	отр	отр	пол	отр
9	отр	отр	отр	отр	пол	отр
10	отр	отр	отр	отр	отр	отр
11	отр	отр	отр	отр	отр	пол
12	отр	отр	отр	отр	отр	отр
13	отр	отр	отр	отр	отр	пол
14	отр	отр	отр	отр	отр	отр
15	отр	отр	отр	отр	отр	отр
16	отр	отр	отр	отр	пол	отр
17	отр	отр	отр	отр	отр	отр
18	пол	пол	пол	пол	пол	пол
19	отр	отр	отр	отр	отр	отр
20	пол	отр	отр	отр	пол	пол

О б о з н а ч е н и я: пол – положительные пробы; отр – отрицательные пробы.

*Сорбентный метод выделения, **спиртовое осаждение.

Всего в ходе работы было исследовано 55 образцов крови КРС. Методом ПЦР различными тест-системами было выявлено 19 положительных образцов (35%) и 37 отрицательных (65%). Методом ИФА в 20 образцах (36%) были обнаружены антитела к вирусу лейкоза КРС, 35 образцов (64%) были определены как серонегативные. Оба метода дали сходное число положительных проб, однако для 12 образцов (22%) результаты анализа расходятся (табл. 3). При учете результатов обоих методов 26 из 55 образцов (47%) определены как положительные на лейкоз КРС, что свидетельствует о высокой степени инфицирования животных в стаде.

Таким образом, для наиболее полного выявления зараженных животных пробы необходимо исследовать комплексно двумя методами. Это по-

зволит повысить эффективность оздоровления стада и снизить вероятность передачи инфекции здоровым особям при своевременном изолировании зараженных животных. Сравнение результатов, полученных с помощью методов ПЦР и результатов ИФА-анализа, еще раз подтверждает невозможность однозначного выявления зараженных животных, основываясь только на результатах косвенного серологического исследования, в связи с особенностями протекания болезни. Однако серологические методы, такие как РИД и ИФА, до сих пор остаются наиболее удобными и дешевыми для планового мониторинга большого числа голов.

Использование технологии сухих пятен для отбора биоматериала и последующего анализа имеет

Т а б л и ц а 3

Сходимость результатов ПЦР и ИФА при анализе 55 образцов крови КРС

Результат	Число образцов	%	Сходимость и расхождение результатов	
ПЦР (пол) ИФА (пол)	14	25	сходимость результатов ПЦР и ИФА	78%
ПЦР (отр) ИФА (отр)	29	53		
ПЦР (отр) ИФА (пол)	6	11	расхождение результатов ПЦР и ИФА	22%
ПЦР (пол) ИФА (отр)	6	11		

ряд преимуществ по сравнению с традиционным отбором жидких образцов. Одним из таких преимуществ является возможность отбора крови непосредственно на носитель, что позволяет исключить стадию выделения сыворотки крови. Как известно, для проведения ИФА используют только определенные биологические жидкости, такие как сыворотка или плазма крови. Цельная кровь не используется для проведения ИФА в связи со сложностью хранения и отбора аликвот, что является следствием неравномерного распределения анализируемых веществ в ее объеме, а также большим объемом клеточного материала, затрудняющим работу с пробой. Отбор цельной крови животного непосредственно на мембранный носитель позволяет равномерно распределить анализируемые вещества, содержащиеся в крови, вдоль полоски мембранного материала и после смывания сухого образца с мембраны получить гомогенный раствор, пригодный для проведения ИФА. Кроме того, сухие образцы крови

характеризуются высокой стабильностью при хранении.

Таким образом нами показано, что сухие образцы крови могут быть использованы для мониторинга стад на наличие вируса лейкоза КРС методами ПЦР и ИФА. При анализе образцов сухой крови методом ПЦР в режиме реального времени для выявления провирусной ДНК следует обращать внимание на применяемый метод выделения и использовать тест-систему, наиболее полно определяющую зараженных особей. Комплексное использование методов ПЦР и ИФА позволяет в более короткие сроки осуществить диагностические мероприятия, направленные на оздоровление стад. При этом использование в качестве исследуемых проб сухих образцов цельной крови КРС, полученных с помощью мембранных носителей, упрощает процедуру хранения и доставки образцов в лабораторию и повышает доступность ветеринарной диагностики перспективными методами исследования.

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»; проект № RFMEFI57814X0010 (Соглашение номер 14.578.21.0010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demirev P.A. // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85. N 2. P. 779.
2. 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. Патент РФ № 2519030.
3. Samsonova J.V., Osipov A.P., Kondakov S.E. // *Vet. J.* 2014. Vol. 199. N 3. P. 471.
4. Samsonova J.V., Chadina A.S., Osipov A.P., Kondakov S.E., Makarova T.E., Komarov A.B. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2014. Vol. 69. N 6. P. 282.
5. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота. Минсельхоз России, Департамент ветеринарии. 23.08.2000 № 13-7-2/2130.
6. Rola-Luszczak M., Finnegan C., Olech M., Choudhury B., Kuzmak J. // *J. Virol Meth.* 2013. Vol. 189. N 2. P. 258.
7. Lojkić, I., Balić D., Rudan N., Kovačić M., Čač Ž., Periškić M., Bedeković T., Roić B., Grozdanić I. // *Vet Arhiv.* 2013. Vol. 83. P. 581.

COMPARISON OF PCR AND ELISA METHODS FOR DETECTION OF BOVINE LEUCOSIS IN DRIED BLOOD SPOTS

N.Yu. Saushkin^{1*}, J.V. Samsonova^{1,2}, A.P. Osipov^{1,2}, C.E. Kondakov^{1,2},
N.I. Khammadov³, K.V. Usoltsev³, Kh. Z. Makaev³, A.N. Chernov³

*(¹Division of Chemical Enzymology, Chemistry Faculty, Lomonosov Moscow State University; ²National University of Science and Technology "MISIS", Moscow; ³Federal Center of Toxicological, Radiological and Biological Security, Kazan; *e-mail: sushk_90@mail.ru)*

PCR and ELISA methods for detection of bovine leucosis in dried blood spots on porous membranes were compared. Dried samples were analyzed by real-time PCR using several diagnostic test-systems. 19 and 20 samples were detected as positive by PCR and ELISA, correspondently. 14 samples among them were positive in both methods. PCR and ELISA recovered 26 positive samples (47%) in total. The results of analysis of dried and native samples were in good agreement. Obtained results showed that whole blood sampling in a form of dried spots on membrane can be used as a convenient and reliable way for biological fluid sampling for bovine leucosis screening.

Key words: enzootic bovine leucosis, ELISA, PCR, porous membranes, dried 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 (APOsipov@mail.ru); Кондаков Сергей Эмильевич – вед. науч. сотр. кафедры функциональный наносистем и высокотемпературных материалов НИТУ МИСиС, докт. фарм. наук (ksekse@mail.ru); Хаммадов Наиль Ильдарович – вед. науч. сотр. лаб. молекулярной биологии и биохимии ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, канд. биол. наук (nikhammadov@mail.ru); Усольцев Константин Валерьевич – вед. науч. сотр. лаб. молекулярной биологии и биохимии ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, канд. вет. наук (ukv3@mail.ru); Макаев Харис Нурутдинович – зав. отделом биобезопасности ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, докт. вет. наук, профессор; Чернов Альберт Николаевич – зам. директора по НИР и инновациям ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», г. Казань, докт. биол. наук (rt-kazan@mail.ru).