

ОСОБЛИВОСТІ ПРИГОТУВАННЯ ПРОБ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РЕТРОВІРУСНОГО ЛЕЙКОЗУ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУННОГО БІОСЕНСОРУ

М. Ф. СТАРОДУБ, доктор біологічних наук, професор кафедри
молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки

М. В. САВЧУК, кандидат сільськогосподарських наук, науковий співробітник

М. І. ФЕДЕЛЕШ-ГЛАДИНЕЦЬ, кандидат сільськогосподарських наук, доцент

О. П. ТАРАН, кандидат біологічних наук, старший викладач

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: taranmaruna@gmail.com

Анотація. В статті розглянуто оптимальні варіанти підготовки зразків крові та молока з метою біосенсорної діагностики ретровірусного лейкозу ВРХ та оцінки походження молочної продукції від хворих чи здорових тварин. Було проаналізовано ефективність використання проб в нативному стані та після їх обробки з видаленням з них еритроцитів, їх мембран, жирового компоненту та казеїну. Встановлено, що за виконання скринінгового аналізу він може бути здійснений з використанням зразків цільної крові та молока. Особливо це можливо в разі діагностики хвороби на етапі її прогресивного розвитку. Використання таких проб значно скорочує час виконання аналізу та забезпечує його простоту. Але в разі необхідності здійснення верифікації даних і виявлення вірусу ретровірусного лейкозу ВРХ уже в ранні періоди, то відповідно до отриманих нами результатів слід використовувати проби, підготовлені у вигляді сироватки крові чи сироватки молока. Останні слід використовувати також з метою прецизійної оцінки походження молока, особливо коли виникає необхідність контролю його якості у разі збирання від декількох тварин, серед яких могли бути хворі особини, а також на ранніх стадіях розвитку патологічного процесу.

Ключові слова: ретровірусний лейкоз, імунобіосенсорний аналіз, підготовка проб крові та молока

Актуальність. Експрес-визначення ретровірусних інфекцій серед людей та тварин є важливою глобальною проблемою. Відомо, що деякі ретровіруси викликають злоякісні пухлини та синдром набутого імунodefіциту (СНІД) у людей, лейкоз та інші захворювання. Вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) індукує одне з декількох відомих ретровірусних інфекцій, яке впливає на велику рогату худобу в усьому світі та ендемічний у багатьох молочних стадах [1]. Велика рогата худоба будь-якого віку може бути інфікована вірусом лейкозу, але більшість з них може бути інфікована незабаром після народження через надходження молока від інфікованої корови. Тому основним способом запобігання поширенню захворювань, викликаних ретровірусною інфекцією, є своєчасна діагностика [2]. Традиційні методи виявлення вірусу лейкозу ВРХ є довготривалими і трудомісткими, тому вони не відповідають

вимогам для експресної діагностики. Для поліпшення діагнозу було розроблено ряд різних методів виявлення інфекції лейкозу ВРХ, включаючи полімеразну ланцюгову реакцію [3] та різні типи імунологічних методів, таких як ферментний імуносорбентний аналіз, імунодифузія в агаровому гелі, радіоімунний аналіз, імуноблот [4, 5] та ін. Традиційні імунологічні методи мають високу специфічність та чутливість, але більшість з них потребують багато часу та додаткових дорогих матеріалів, таких як мічені антитіла [6].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Оскільки вірус лейкозу ВРХ є одним з найпоширеніших інфекційних агентів великої рогатої худоби та ендемічним у багатьох молочних стадах, програми контролю та ліквідації на основі швидкого, простого і чутливого способу його виявлення є необхідними. Ці вимоги можуть бути успішно вирішені за допомогою імуносенсорів [7-12]. Розроблено декілька сенсорів для виявлення цього вірусу на основі поверхневого плазмонного резонансу (SPR) [7], оптичної еліпсометрії [8], акустичної люмінесценції [9] та фотолюмінесценції [13]. Для успішного здійснення експресного біохімічного аналізу з метою діагностики ретровірусного лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунобіосенсорної технології особливе значення набуває відпрацювання основного алгоритму стандартизованої підготовки проб крові. В цьому відношенні слід вирішити завдання, а саме у якому вигляді необхідно використовувати зразок: цільної крові, її гемолізату або сироватки. Окрім того, інколи важливо отримати інформацію щодо походження молочної продукції, а саме встановити чи отримана вона від здорових, чи від хворих тварин. В такому випадку виникає необхідність визначити, чи наявні специфічні антитіла в молоці, що буде свідчити про стан тварин, від яких воно отримане.

Метою нашого дослідження було проведення порівняння ефективності біосенсорного виявлення вірусу лейкозу ВРХ у зразках залежно від їх препаративної підготовки. Для отримання відповідей на поставлені питання були проведені відповідні експериментальні дослідження, результати яких детально обговорюються в даній статті.

Матеріали і методи дослідження. Всі використані реагенти були отримані від фірми Millipore–Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США). Сироватка зразків молока від здорових і хворих тварин на ретровірусний лейкоз надані були фірмою "Лейконад", Полтава. Для експериментів готували наступні варіанти проб крові: 1) цільна та нативна; 2) цільна з додаванням гепарину; 3) гемолізована, шляхом розбавлення вихідного зразка в 2 рази дистильованою водою; 4) плазма крові, отримана внаслідок видалення еритроцитів при центрифугуванні крові за 5000 об / хв.; 5) сироватка крові, що приготована в процесі згортання крові шляхом витримки її за 37 °С протягом години (для утворення згустку), а потім механічним його відокремленням від стінок пробірки і витримки проби деякий час (близько 1 години) в холодильнику.

За дослідження проб молока готували такі зразки: 1) цільне молоко; 2) молоко після видалення жирового компоненту шляхом його центрифугування за 10000 об / хв протягом 10 хвилин за допомогою приладу, 3) сироватка після видалення жирового компоненту та дії 5,0 % оцтової кислоти у співвідношенні 5:1 для отримання осаду казеїну.

Виявлення антитіл, специфічних до лейкозного ретровірусу, в зразках, що були представлені для аналізу, здійснювали за допомогою імунного біосенсора на основі повехневого плазмонного резонансу (ППР), виготовленого в Інституті кібернетики ім. В. М. Глушкова НАН України. Тотальний антиген ретровірусу лейкозу (ВРХ) був наданий фірмою "Лейконад", Полтава. Його підготовку для аналізу проводили за схемою, що була описана раніше [14-16].

Результати дослідження та їх обговорення. Загальний відгук імунного біосенсорана на основі ППР в процесі формування біочутливих шарів та за тестування сироваток крові від хворих тварин з різним рівнем розведення представлено на рис. 1.

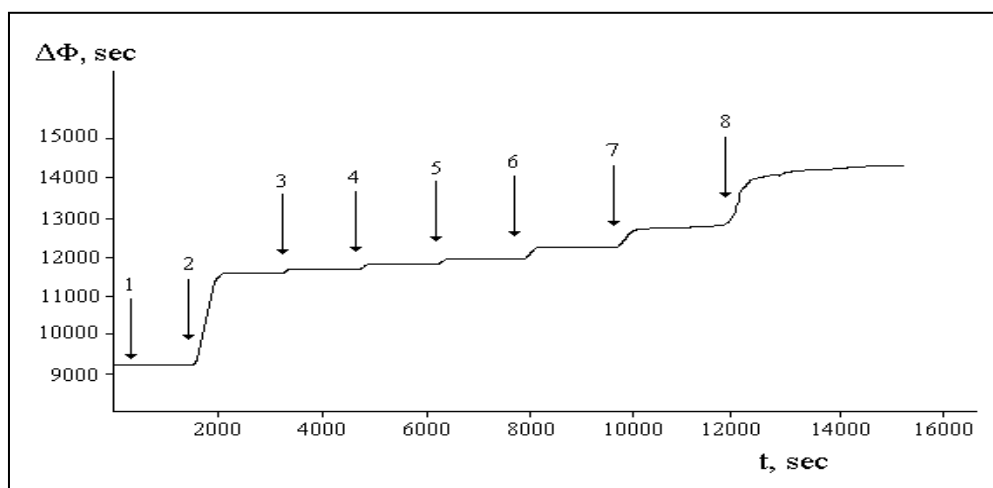


Рис. 1. Відгук імунного сенсора на внесення біологічних компонентів у комірку: 1 -ФСБ, 2 – антиген вірусу лейкозу (1 мг/мл), 3 - 1% розчин БСА, 4, 5, 6, 7, 8 - антисироватки в розведеннях: 1: 20000, 1:10000, 1:5000, 1:2500, 1: 1000 відповідно

Слід зазначити, що після промивки трансдюсера ППР трис-НСІ буфером рН 7,3 на його поверхню іммобілізували тотальний антиген вірусу лейкозу (20 мкг / мл). Після цього вільні місця, що залишились на поверхні, блокували розчином бичачого сироваткового альбуміну (БСА) за концентрації 20 мкг / мл в трис-НСІ буфері рН 7,3. Нашими попередніми дослідженнями показано, що ППР імунобіосенсор дозволяє виявляти специфічні антитіла в сироватках крові та зразках молока хворих корів при їх 10000 та 100 разовому розведенні відповідно. Разом з тим, за нанесення на раніше підготовлену трнсдюсерну поверхню вище зазначених досліджуваних зразків від здорових тварин навіть в нерозведеному стані відхилення резонансного кута ППР, якщо і спостерігається, то в межах 5 %, що не є достовірним. Таке відхилення, на нашу думку, може бути зумовленим рядом факторів, про що мова йде нижче, а саме: еритроцитами, їх мембранами, жировим компонентом та іншими, які зумовлюють неспецифічну відповідь.

Проведеними дослідженнями було встановлено, що як нативна цільна кров, так і кров із додаванням гепарину не дозволяє отримати стабільні результати (табл. 1). Це, очевидно, пов'язано з тим, що у плазмі крові можуть неконтрольовано з'являтися гемолізовані еритроцити, з одного боку,

а з іншого – гепарин, як відомо, може впливати на інтенсивність утворення комплексу антиген-антитіло, тому у цьому випадку важко стандартизувати його кількість.

Те ж саме стосувалось і зразків крові, попередньо гемолізованих розбавленням їх в дистильованій воді. Результати аналізу змінювались з часом його проведення та варіювали від одного аналізу до іншого. Очевидно, це пов'язано з досить значним вмістом мембран еритроцитів та гемоглобіну, які налипають на поверхню перетворювача. Для попередження цього слід використовувати високі концентрації твін-20 (понад 1 %), а видалення останнього з поверхні є завданням, що значно ускладнює процедуру проведення аналізу.

Виявилось, що оптимальним способом підготовки проб для аналізу є отримання з них сироватки. Цього можна досягти за допомогою досить простої процедури, а саме внаслідок підготовки зразка крові, як вказано вище в розділі "Методи". Приготований таким способом зразок сироватки крові забезпечує отримання повторюваних результатів, у яких стандартне відхилення значень коливається в межах 5 %.

1. Коливання відгуку імунного біосенсору за аналізу проб крові хворих тварин, підготовлених різними способами

№ п/п	Зразки для аналізу	Величина відгуку кута їх відхилення
1.	Цільна кров	1800,0 ± 600,0
2.	Цільна кров з додаванням гепарину	1790 ± 610,0
3.	Гемолізована кров	1700,0 ± 570,0
4.	Плазма крові	1400,0 ± 430,0
5.	Сироватка крові	1250,0 ± 72,0

В разі використання молока для аналізу, як і в попередньому випадку, нас, перш за все, цікавило, чи можна використовувати безпосередньо пробу без попередньої її підготовки, чи необхідно готувати з неї сироватку. Також необхідно було встановити умови такої пробопідготовки.

Виявилось, що зразки цільного молока, так само, як і крові, не придатні для отримання стабільних результатів аналізу. Дані експерименту коливались в межах 30-50 % стандартного відхилення, а то й більше. Ми вважаємо, що це обумовлено наявністю жирового компоненту в молоці, а також високим вмістом білкових компонентів, які здатні до неспецифічної іммобілізації на твердих поверхнях. Тому були запропоновані процедури попередньої підготовки зразків молока, які включали видалення жирового компоненту та осаду казеїну.

Слід зазначити, що для практичного використання та для конкретного набору реактивів в серії експериментів необхідно контролювати рН розчину, що утворюється після застосування оцтової кислоти. Його значення повинно бути в межах 5,0. Таким чином, підготовлені проби давали стабільні результати. За аналізу однієї і тієї ж проби, відхилення не перевищувало 10 % (табл. 2).

2. Коливання відгуку імунного біосенсору за аналізу проб молока хворих тварин, приготованих різними способами

№ п/п	Зразки для аналізу	Величини відгуку та їх відхилення
1.	Цільне молоко	800,0 ± 300,0
2.	Сиворотка після видалення жирового компоненту	750 ± 240,0
3.	Сироватка молока	880,0 ± 78,0

Висновки і перспективи. Базуючись на отриманих результатах, можна зробити наступні висновки, що стосуються двох принципових аспектів щодо особливостей підготовки проб крові та молока в разі діагностики ретровірусного лейкозу ВРХ, з одного боку, а з іншого – в разі оцінки походження молочних продуктів від здорових чи хворих тварин.

В цьому відношенні слід виділяти два принципово різних підходи за вимогами до результатів аналізу, а саме: на скринінговому та верифікаційному рівні. За виконання першого типу аналізу він може бути здійснений з використанням зразків крові та молока без попередньої підготовки. Особливо це доцільно в разі діагностики хвороби на етапі її прогресивного розвитку. Використання таких проб значно скорочує час виконання аналізу та забезпечує його простоту. Але в разі необхідності здійснити верифікацію отриманих результатів або для виявлення патогена в ранні періоди розвитку ретровірусного лейкозу ВРХ, то відповідно до наших експериментальних даних, слід використовувати проби, підготовлені в якості сироваток крові чи молока. Останні слід використовувати також з метою прецизійної оцінки походження партій молока, особливо коли виникає необхідність контролю якості молока, зібраного від декількох тварин, серед яких могли бути присутні хворі особини і, крім того, на ранніх стадіях розвитку патологічного процесу.

References

1. Kurtinaitiene, B. Ambrozaite, D. Laurinavicius, V. Ramanaviciene, A. Ramanavicius, A. (2008). Amperometric immunosensor for diagnosis of BLV infection, Biosens. Bioelectron. 23, 1547–1554.
2. Kirkland, P. D. (2005). Enzootic bovine leukosis, Aust. New Zeal. Stand. Diagnostic Proced. 1–14.
3. Hassanpour, M., Nadalian, M., Safi, S. Madani, R., Bokaie, S. (2014). Epidemiological survey of Bovine Leukemia Virus (BLV) infection and its effective factors emphasis ELISA and nested PCR in dairy herds around Babol city (North of Iran) as a Caspian climate. Eur. J. Zool. Res. 3, 166–171.
4. Balić, D., I., Lojkić, M. Periškić, T. Bedeković, A. Jungić, N. Lemo, B. Roić, Ž. Čač, L. Barbić, J. (2012). Madić, Identification of a new genotype of bovine leukemia virus, Arch. Virol, 157, P. 1281–1290.
5. Choudhury, B., Finnegan, C., Frossard, J. P., Venables, C., Steinbach, F. (2013). Colostrum replacer and bovine leukemia virus seropositivity in calves, Emerg. Infect. Dis, 19, 1027–1028.
6. Schwartz, I., Levy, D. (1994). Pathobiology of bovine leukemia virus, Vet Res. 25, 521–536.
7. Ramanaviciene, A., German, N., Kausaite-Minkstiniene, A., Voronovic, J., Kirlyte, J., Ramanavicius, A. (2012). Comparative study of surface plasmon resonance, electrochemical and electroassisted chemiluminescence methods based immunosensor

for the determination of antibodies against human growth hormone, Biosens. Bioelectron, 36, 48–55.

8. Baniukevic, J., Kirlyte, J., Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A. (2013). Application of oriented and random antibody immobilization methods in immunosensor design, Sensors Actuators, B Chem, 189, 217–223.

9. Balevicius, Z., Ramanaviciene, A., Baleviciute, I., Makaraviciute, A., Mikoliunaite, L., Ramanavicius, A. (2011). Evaluation of intact- and fragmented-antibody based immunosensors by total internal reflection ellipsometry, Sensors Actuators, B Chem, 160, 555–562.

10. Makaraviciute, A., Ruzgas, T., Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A. (2014). Antibody fragment immobilization on planar gold and gold nanoparticle modified quartz crystal microbalance with dissipation sensor surfaces for immunosensor applications, Anal. Methods, 6, 2134–2140.

11. Ramanavicius, A., Finkelsteinas, A., Cesiulis, H., Ramanaviciene, A. (2010). Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor, Bioelectrochemistry, 7, 11–16.

12. Ramanavicius, A., Oztekin, Y., Ramanaviciene, A. (2014). Electrochemical formation of polypyrrole-based layer for immunosensor design, Sensors Actuators, B Chem, 197, 237–243.

13. Viter, R., Starodub, N., Smyntyna, V., Tereschenko, A., Kusevitch, Sitnik, J., Buk, J., Macak, J. (2011). Immune biosensor based on silica nanotube hydrogels for rapid biochemical diagnostics of bovine retroviral Leukemia, Procedia Eng, 25, 948–951.

14. Pyrohova, L. V., Starodub, M. F. (2008). Immobilizatsiia antyheny retrovirusu immobilizatsiia antyheny retrovirusu leikozu velykoi rohatoi khudoby leikozu velykoi rohatoi khudoby na poverkhni imunnoho biosensora na poverkhni imunnoho biosensora. Biotekhnolohiia, 1(2), 1-75.

15. Pyrohova, L. V., Starodub, M. F. (2002). Immobilizatsiia imunoglobuliniv za dopomohoiu lektyniv pry stvorenni imunnykh sensoriv na osnovi poverkh nevoho plazmonnoho rezonansu. Ukr. biokhim. Zhurn, 74 (2), 45–50.

16. Starodub, M. F., Starodub, V. M. (2002). Biosensory: vytoky, dosiahnennia i perspektyvy. Ukr. biokhim. Zhurn, 74(4–5), 147–163.

ОСОБЕННОСТИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРОБ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РЕТРОВИРУСНОГО ЛЕЙКОЗА С ПОМОЩЬЮ ИММУННОГО БИОСЕНСОРА

М. Ф. Стародуб, М. В.Савчук, М. И.Феделеш-Гладионец, О. П.Таран

Аннотация. В статье рассмотрены оптимальные варианты подготовки образцов крови и молока с целью диагностики ретровирусного лейкоза КРС и оценки происхождения молочной продукции от больных или здоровых животных. Были проанализированы эффективность использования проб в нативном состоянии и после их обработки с удалением из них эритроцитов, их мембран, жирового компонента и казеина. Установлено, что при выполнении скринингового анализа он может быть осуществлен с использованием образцов цельной крови и молока. Особенно это возможно в случае диагностики болезни на этапе ее прогрессивного развития.

Использование таких проб значительно сокращает время выполнения анализа и обеспечивает его простоту. Но в случае необходимости осуществления верификации данных и выявления вируса ретровирусного лейкоза КРС уже в ранние периоды в соответствии с

полученными нами результатами следует использовать пробы, подготовленные в виде сыворотки крови или сыворотки молока. Последние следует использовать также с целью прецизионной оценки происхождения молока, особенно когда возникает необходимость контроля его качества при сборе от нескольких животных, среди которых могут быть больные особи, а также на ранних стадиях развития патологического процесса.

Ключевые слова: ретровирусный лейкоз, имунобиосенсорный анализ, подготовка проб крови и молока

FEATURES OF PREPARATION OF SAMPLES FOR DIAGNOSTICS OF BOVINE LEUKOSIS USING THE IMMUNE BIOSENSOR

M. F. Starodub, M. V. Savchuk, M. I. Fedelezh-Gladinets, O. P. Taran

Annotation. The article discusses the best options for the preparation of blood and milk samples for the purpose of diagnosing retroviral enzootic bovine leukosis in cattle and assessing the origin of dairy products from sick or healthy animals. The effectiveness of using samples in the native state and after their processing with the removal of red blood cells, their membranes, the fat component and casein were analyzed. It has been established that when performing screening analysis it can be carried out using whole blood and milk samples. This is especially possible in the case of diagnosis of the disease at the stage of its progressive development. The use of such samples significantly reduces analysis time and makes it simpler. But if it is necessary to carry out data verification and detection of cattle retroviral leukemia virus already in the early periods, then, in accordance with the results obtained by us, samples prepared in the form of blood serum or milk serum should be used. The latter should also be used to accurately assess the origin of milk, especially when it is necessary to control its quality when collecting from several animals, among which may be sick individuals, as well as in the early stages of the development of the pathological process.

Keywords: bovine leukosis, immunobiosensor analysis, preparation of blood and milk samples