

ОЦЕНКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ МУЛЬТИАНТИГЕНОВ *Mycobacterium bovis*

Шуралев Э.А. – к.в.н., доцент, в.н.с.
Казанский (Приволжский) федеральный университет

Ключевые слова: туберкулез; крупный рогатый скот; антигены; антитела; чувствительность; специфичность.

Key words: tuberculosis; cattle; antigens; antibodies; sensitivity; specificity.

Тесты на основе микобактериальных антигенов являются одними из основных направлений исследовательских программ по туберкулезу (ТБ) [1-3]. Они основаны на выявлении антител к различным комбинациям иммунодоминантных эпитопов иммуногенных секретируемых белков *Mycobacterium bovis* и *M.tuberculosis*, их клеточных лизатов, гликопротеинов [4-6]. Уровень чувствительности и специфичности серологических тестов на основе таких антигенов, как MPB83, MPB70, ESAT-6, CFP-10, MPB59, MPB64, Acr1, 38 kDa и других, достигают 50-90%, а при использовании комбинаций из них – более 95% [7-9]. Результаты проведенных ранее исследований показали высокую диагностическую значимость ряда антигенов [1, 5, 7-9], которые могут быть использованы и при разработке экспресс-методов диагностики туберкулеза (ТБ). В данной работе представлены результаты исследования образцов проб сыворотки крови КРС методом иммунохроматографии, на основе трех комбинаций антигенов: рекомбинантные антигены секретируемых белков, нативные белки клеточной стенки и липополисахариды *M.bovis*.

Целью данной работы явилось – определение чувствительности и специфичности иммунохроматографического теста на основе указанных антигенных комплексов для выявления серопозитивного КРС при ТБ.

Материалы и методы. Образцы сыворотки крови (коллекция ФЦТРБ-ВНИВИ) из четырех популяций КРС были использованы в данной работе. У 24 животных неблагополучного по ТБ хозяйства (популяция 1) инфекция была подтверждена наличием видимых патоморфологических изменений, типичных для ТБ КРС, и/или выделением культуры *M.bovis* из патматериала, и все они были туберкулин-положительными. 50 животных двух групп (популяции 2 и 3) были из благополучных по ТБ хозяйств (по 25 гол. в каждой). Последняя

группа (популяция 4) из 34 гол. была из неблагополучного по ТБ хозяйства, но ТБ статус у этих животных не был подтвержден.

Иммунохроматографический тест представляет собой скрининговый тест на мембранной основе для быстрого обнаружения антител к *M.bovis* в образцах сыворотки крови. На мембранные полоски в виде линий иммобилизируются антигены, с которыми при прохождении сквозь поры мембраны сывороточные антитела специфически реагируют, образуя комплекс «антиген-антитело». Визуализация результатов такой реакции осуществляется за счет включения в реакционную смесь антиглобулиновых антител, меченных коллоидным золотом.

Относительную чувствительность и специфичность с 95%-ным доверительным интервалом (CI) значений рассчитывали с использованием программы GraphPad Prizm (GraphPad, США).

Результаты и обсуждение. Комбинации антигенов, указанные выше, были иммобилизованы на мембране в зоне «Т» (тест-линии 1, 2 и 3) тест-полоски. После того, как проба сыворотки и буферный раствор вносятся в лунку тест-кассеты, образец проходит через меченый золотом антителосвязывающий белок (конъюгат), который связывается с иммуноглобулинами, содержащимися в образце. Если образец содержит антитела к одному или всем антигенам, то комплекс «антитело-конъюгат» присоединяется к одной или нескольким тестовым линиям: в зоне «Т» тестовой карты появляется одна или несколько розово-пурпурных полос (рис. 1). Затем оставшийся комплекс антитело-конъюгат проходит дальше по мембране до тех пор, пока не достигнет контрольной зоны «С». Опять появляется розово-пурпурная полоса, указывающая, что тест был выполнен правильно.

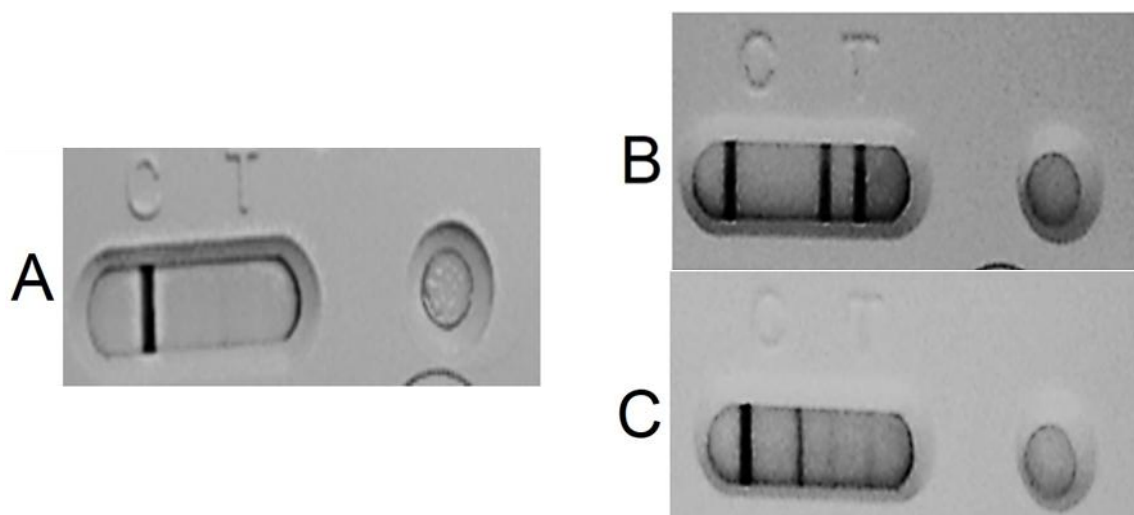


Рисунок 1 - Результаты иммунохроматографического теста на туберкулез:

А – отрицательный результат,
В, С – положительный результат.

Образование полос в зонах «Т» и «С» занимает менее 10 мин. Это является преимуществом для такого рода серологических тестов. Другой особенностью данного метода является тот факт, что для обнаружения антител получение сыворотки не является обязательным этапом. Исследовать можно цельную кровь непосредственно в хозяйстве или мясокомбинате перед убоем скота. Читка и интерпретация результатов также проста и не требует специального оборудования или профессиональных навыков.

Используя, сыворотки крови КРС из

популяции 1 была определена чувствительность иммунохроматографического теста, основанного на мультиантигенном подходе. Для определения специфичности использовали аналогичные пробы из популяций 2 и 3. Результаты, приведенные в таблице 1, показывают, что при учете реакции с любой из полос, тест показывает высокую степень чувствительности в популяции 1 (95,8%). Специфичность была определена на высоком уровне (92,0-100,0%), когда оценивались результаты в популяциях 2 и 3.

Таблица 1 -Чувствительность и специфичность иммунохроматографического теста на основе трех комбинаций антигенов *M.bovis*

Тест-линии	Популяция 1 (n=24)		Популяция 2 (n=25)		Популяция 3 (n=25)		Популяция 4 (n=34)
	Чувствительность, % (95% CI)	N, гол.	Специфичность, % (95% CI)	N, гол.	Специфичность, % (95% CI)	N, гол.	N, гол.
T1, T2 или T3	95,8 (78,9, 99,9)	23/24	92,0 (74,0, 99,0)	2/25	100,0 (86,3,100,0)	0/25	5/34
T2 или T3	87,5 (67,6, 97,3)	21/24	96,0 (80,0, 99,9)	1/25	100,0 (86,3,100,0)	0/25	2/34
T1	75,0 (53,3, 90,2)	18/24	96,0 (80,0, 99,9)	1/25	100,0 (86,3,100,0)	0/25	3/34
T2	83,3 (62,6, 95,3)	20/24	96,0 (80,0, 99,9)	1/25	100,0 (86,3,100,0)	0/25	2/34
T3	20,8 (7,1, 42,2)	5/24	100,0 (86,3,100,0)	0/25	100,0 (86,3,100,0)	0/25	0/34

Включение в тест рекомбинантных антигенов секретируемых белков (тест-линия 1) в анализ приводило к снижению специфичности в популяции 2 (92,0%). В свою очередь,

использование для интерпретации результатов только тест-линий 2 и 3 имело отрицательное влияние на чувствительность, уменьшая ее с 95,8% до 87,5% (таблица 1). Следо-

вательно, игнорирование тест-линии 1 в интерпретации результатов улучшало специфичность только в популяции 2 от 92,0 до 96,0%, в то время как в популяции 3 специфичность оставалась высокой (100,0%) независимо от того, какие тест-линии учитывались при интерпретации.

Пять из 34 туберкулин-отрицательных животных из популяции 4 (неблагополучное по ТБ хозяйство) были положительными в иммунохроматографическом тесте. Поскольку тест-набор показал высокую специфичность (в популяциях 2 и 3), можно сказать, что эти пять положительных животных, вероятно, являются *M.bovis*-инфицированными. Согласно проведенным нами ранее исследованиям [2, 3], а также литературным данным, в стадах неблагополучных по ТБ КРС хозяйств встречаются инфицированные животные, у которых сформировалась ареактивность к туберкулину. В результате при проведении туберкулинизации могут регистрироваться ложноотрицательные результаты. Для выявления таких животных необходимы альтернативные подходы, один из которых это серологические методы. Полученные в данной работе результаты показывают, что используя высокоспецифичный тест можно выявить зараженный ТБ скот, который отрицательно реагировал в кожной туберкулиновой реакции.

Заключение. Установлено, что по сравнению с другими аналогичными тестами на ТБ, как чувствительность, так и специфичность иммунохроматографического теста сопоставимы. Высокий уровень этих показателей был достигнут за счет использования комбинаций антигенов *M.bovis*. Полученные данные доказывают, что серологический тест, как вспомогательный метод, может повысить эффективность диагностики ТБ КРС при использовании в сочетании (параллельно) с туберкулинизацией. Показаны относительно высокие показатели специфичности и чувствительности теста (92,0-100,0% и 95,8% соответственно).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Шуралев, Э. А. Серологическая диаг-

ностика туберкулеза коз и ее преимущества // Современные тенденции научного обеспечения в развитии АПК: фундаментальные и прикладные исследования: материалы науч.-практ. конф. - Омск, 2016. - С. 311-316.

2. Шуралев, Э.А. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Э.В. Ндаишимийе, М.Н. Мукминов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2012. - Т.211. - С. 202-206.

3. Шуралев, Э.А. Факторы риска и индикация *Mycobacterium bovis* на территориальном уровне / Э.В. Ндаишимийе, М.Н. Мукминов и др. // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2013. - Т.215. - С. 367-371.

4. Шуралев, Э.А. Микобактериальные антигены: синтетические пептиды и рекомбинантные белки / Э.А. Шуралев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2013. - Т.216. - С. 403-407.

5. Шуралев, Э.А. Образование антител у северного оленя, инфицированного *Mycobacterium bovis* / Э.А. Шуралев // Ветеринария. - 2016. - № 9. - С. 18-20.

6. Шуралев, Э.А. Предварительные результаты изучения антителогенеза у барсуков при экспериментальном туберкулезе // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - Казань. 2015. - Т.221. - С.261-266.

7. Шуралев, Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у альпак // Ветеринарный врач. - 2012. - №5. - С.30-33.

8. Шуралев, Э.А. Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов / М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева, А.Р. и др. // Ветеринария. - 2013. - №2. - С. 25-28.

9. Шуралев, Э.А. Выявление специфических антител у вапити при туберкулезе / М.Н. Мукминов, К. Велан, Дж. Кларк // Ветеринария. - 2013. - №8. - С. 54-57.

ОЦЕНКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА НА ОСНОВЕ МУЛЬТИАНТИГЕНОВ *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Шуралев Э.А.
Резюме

Представлены результаты исследования образцов проб сыворотки крови крупного рогатого скота иммунохроматографическим тестом, основанным на комбинации антигенов: рекомбинантные антигены секретируемых белков, нативные белки клеточной стенки и липополисахариды