

## Выявление специфических антител у вапити при туберкулезе

**Эдуард Аркадьевич Шуралев**, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник  
ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», 420075,  
Казань, Научный городок-2, ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Тел.: +7-843-2395320, e-mail: [ynivi@mail.ru](mailto:ynivi@mail.ru),

**Малик Нилович Мукминов**, доктор биологических наук, профессор  
ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.  
18. Тел.: +7-843-2315357, e-mail: [malik-bee@mail.ru](mailto:malik-bee@mail.ru),

**Клэр Велан**, PhD биологических наук, заведующий лабораторией

**Джон Кларк**, MSc биологических наук, заведующий отделом  
Enfer Scientific, Unit T, M7 Business Park, Newhall, Naas, Co. Kildare, Ireland. Тел.: +35345983800, e-mail:  
[clarewhelan@enfergroup.com](mailto:clarewhelan@enfergroup.com)

**Резюме.** В данной публикации описываются результаты сравнительного анализа туберкулезных диагностических методов, полученные на вапити (*Cervus elaphus* subspp.), североамериканском подвиде благородного оленя. Результаты указывают на потенциальную возможность использования мультиплексного иммуноанализа как серологического метода для диагностики туберкулеза у семейства оленьих в качестве альтернативного теста или в дополнение к другим диагностическим приемам.

**Ключевые слова:** *Mycobacterium bovis*, вапити, мультиплексный хемилюминесцентный иммуноанализ.

### Detection of specific antibodies in elk infected by tuberculosis

Eduard A. Shuralev, Malik N. Mukminov, Clare Whelan, John Clarke

**Summary.** This publication describes the results of a comparative analysis of tuberculosis diagnostic tests obtained on elk (*Cervus elaphus* subspp.) the North American subspecies of red deer. The results indicate the potential use of a multiplex immunoassay as a serological method for the diagnosis of tuberculosis in the Cervidae family as an alternative test or in addition to other diagnostic methods.

**Key words:** *Mycobacterium bovis*, elk, multiplex chemiluminescent immunoassay.

Последнее время все больше внимания уделяется роли диких животных в распространении микобактерий туберкулеза во всем мире. Эпизоотолого-эпидемиологический анализ, проведенный В.Г. Ощепковым с соавт. (Ощепков и соавт., 2012) указывает на наличие как минимум 120 видов позвоночных и беспозвоночных животных, являющихся носителями и распространяющими возбудителей туберкулеза, причем в РФ наибольшую опасность в этом плане представляют лоси, косули, маралы, пятнистые олени, барсуки и другие. Ю.Ю. Данко (Данко, 2011) указывает на источник возбудителя туберкулеза в Калининградской области среди пятнистых уссурийских оленей. О проблеме распространения туберкулеза среди оленьих сообщают ученые многих стран мира (Brook *et al.*, 2013; Walter *et al.*, 2012).

Есть многочисленные сообщения о потенциальных альтернативных диагностических тестах, которые могут быть полезными для скрининга при туберкулезе оленьих. Новый серологический тест «CervidTB STAT-ПАК» (компании «ChemBio Diagnostic Systems», США) дал многообещающие результаты с чувствительностью 75-96% и специфичностью 60-100% (Buddle *et al.*, 2010). Есть сообщения и о возможности использования  $\gamma$ -интерферон теста для выявления туберкулеза среди оленьих, а с дальнейшим развитием таких тест-систем могут быть созданы коммерциализуемые диагностикумы (Waters *et al.*, 2008).

Наряду с тем, что молекулярно-биологические методы широко внедряются в научные подходы диагностики туберкулеза (Александрова и соавт., 2011), последние достижения в области получения и очистки высокоспецифичных биомаркеров, в сочетании с высокой чувствительностью инновационных тест-систем (Ощепков и соавт., 2009; Якупов и соавт., 2011), позволяют по-новому взглянуть на серологические методы диагностики, которые ранее были малоэффективными, в частности при использовании РРД или антигенов клеточной стенки микобактерий. Мультиплексный хемилюминесцентный иммуноанализ с использованием серии специфичных микобактериальных антигенов имеет потенциальную возможность быть пригодным для использования в программах искоренения туберкулеза. Обширная оптимизация метода и исследования более 70 рекомбинантных белков и синтетических пептидов в качестве биомаркеров привела к разработке туберкулезных диагностических тест-систем для целого ряда видов, в том числе крупного рогатого скота, козы, барсука, кабана, альпаки и других (Шуралев и соавт., 2012; Шуралев и соавт., 2013).

**Материалы и методы.** Пробы сывороток крови вапити из разных источников были доставлены в биотехнологическую компанию Enfer Scientific, г. Нэйс, Ирландия, где нами проводились исследования методом мультиплексного хемилюминесцентного иммуноанализа.

Группа А. 5 интактных (контроль) и 11 экспериментально *M.bovis*-инфицированных животных – всего 199 проб от 16 вапити – получены из Службы сельскохозяйственных исследований Департамента сельского хозяйства США (USDA/ARS). Суть опыта описывалась ранее (Harrington *et al.*, 2008) и вкратце сводится к следующему: животные в 10-месячном возрасте подвергались экспериментальному заражению

интратонзиллярно культурой штамма 02/1007 *M.bovis* (CIFA) в дозе  $1,5 \times 10^3$  КОЕ. Кровь брали в динамике (табл. 1).

Группа В. 19 проб сыворотки крови вапити из естественно зараженных стад национального парка Riding Mountain, Манитоба, Канада, были предоставлены агентством «Parks Canada». Постмортальными бактериологическими исследованиями культура *M.bovis* была выделена у всех животных.

Группа С. Агентством «Parks Canada» было предоставлено 20 проб сыворотки крови вапити из дикой популяции национального парка Elk Island, Альберта, Канада, территория которого благополучна по туберкулезу в течение 40 лет.

Группа D. 28 образцов сыворотки крови вапити штата Миннесота были получены из USDA/ARS. Животные были отрицательными в туберкулиновой пробе и постмортальных исследованиях. Как минимум 5 лет на этой территории туберкулез не выявлялся.

Группа E. 63 образцов сыворотки крови одомашненных вапити были получены из Туберкулезного банка сывороток Службы ветеринарной и фитосанитарной инспекции Департамента сельского хозяйства США (USDA/APHIS) как «слепые» пробы. Результаты кожной туберкулиновой пробы и постмортальные бактериологические данные были раскрыты только после того, как все образцы были подвергнуты мультиплексному иммуноанализу.

Сыворотки крови указанных групп животных исследовали методом мультиплексного хемилюминесцентного иммуноанализа, при этом выявляли уровень антител к микобактериальным антигенам аналогично ранее проведенным испытаниям на крупном рогатом скоте (Шуралев и соавт., 2012). Анализ проводили по описанной ранее методике с предварительной оптимизацией для оленьих, используя заведомо положительные и отрицательные сыворотки крови.

Статистическая обработка результатов проводилась с учетом двухвыборочного t-критерия для зависимых выборок с 95% доверительным интервалом (ДИ), используя программное обеспечение Minitab, версия 15,0 (Minitab Inc, State College, Пенсильвания, США).

**Результаты и обсуждения.** Все 5 контрольных животных группы А оставались отрицательными в мультиплексном иммуноанализе в течение всего срока эксперимента (Табл. 1). Одно экспериментально зараженное вапити из этой группы (животное №120) было отрицательным во всех временных точках, у данного животного не было выявлено явных видимых или гистологических постмортальных признаков туберкулеза, культура *M.bovis* не была выделена, животное отрицательно реагировало во всех тестах специфического клеточного и гуморального иммунного ответа. В мультиплексном иммуноанализе уровень антител ко всем антигенам был менее 1000 RLU.

**Таблица 1. Результаты мультиплексного хемилюминесцентного иммуноанализа вапити группы А (экспериментальное заражение *M.bovis*).**

Подгруппа	№№ животных	Неделя до и после заражения													ПМИ ТБ
		-1	4	6	8	10	12	16	20	24	27	28	29	30	
												Неделя после КТП			
										1	2	3	4		
Контроль	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отр
	43	-	-	-	-	-	нп	-	-	-	-	-	-	нп	Отр
	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отр
	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отр
	113	-	-	-	-	-	-	-	-	нп	-	-	-	-	Отр
Зараженные	36	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Пол
	37	-	-	-	-	-	-	-	нп	-	+	+	+	-	Пол
	40	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Пол
	41	-	-	-	-	-	+	+	нп	+	+	+	+	+	Пол
	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Пол
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	нп	-	-	-	Пол
	51	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Пол
	116	-	-	-	нп	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Пол
	118	нп	-	-	нп	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Пол
	119	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Пол
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Отр	

КТП – кожная туберкулиновая проба; ПМИ ТБ – пост-мортальные исследования на туберкулез (гистопатология и/или бактериология); Пол – положительно (обнаружены характерные туберкулезные поражения органов и/или выделена культура *M.bovis*), Отр – отрицательно (не обнаружены характерные туберкулезные поражения органов и не выделена культура *M.bovis*); нп – пробы не отбирались; «-» – результаты мультиплексного иммуноанализа отрицательные; «+» – результаты мультиплексного иммуноанализа положительные.

Из таблицы 1 видно, что при экспериментальном заражении 7 из 11 животных реагировали положительно в мультиплексном иммуноанализе. Надо отметить, что в данном случае речь идёт о комплексном учёте реакции к нескольким биомаркерам, что заложено в программном обеспечении читки и интерпретации результатов. Индивидуальный подход раскрывает динамику антителогенеза к отдельным антигенам микобактерий. В качестве примера на рис. 1 показан уровень антител в динамике патогенеза туберкулезной инфекции у экспериментально зараженного вапиту.

Диагностическая эффективность антигенов в иммуноанализе была следующей: rESAT-6 – 7, rCFP-10 – 6, rMPB70 – 10, rMPB83 – 7, rRv3616c – 2, solPPD-b – 7, ESAT-6per – 2, CFP-10per1 – 1, и MPB70per – 2 из 11 экспериментально зараженных вапиту продуцировали специфические антитела, выявляемые мультиплексным хемилюминесцентным иммуноанализом на уровне выше 1000 RLU. Синтез антител к указанным антигенам у большинства животных этой подгруппы начинался с 6 – 8 недели после экспериментального заражения, достигая диагностически значимого уровня в сроки, указанные в таблице 1.

В подгруппе контрольных (интактных) уровень антител в сыворотках крови был ниже диагностического – менее 3000 RLU. Не было установлено какой-либо зависимости образования антител с введением PPD<sub>b</sub> при кожной туберкулиновой пробе.

В группе В положительно реагировало 13 из 19 животных. У 6 оставшихся антитела выявлялись к антигенам rMPB70, rMPB83, rRv3616c, solPPD-b, однако они не достигали диагностически значимого уровня.

Все 20 голов вапиту группы С и 28 – группы D были отрицательны в мультиплексном иммуноанализе.

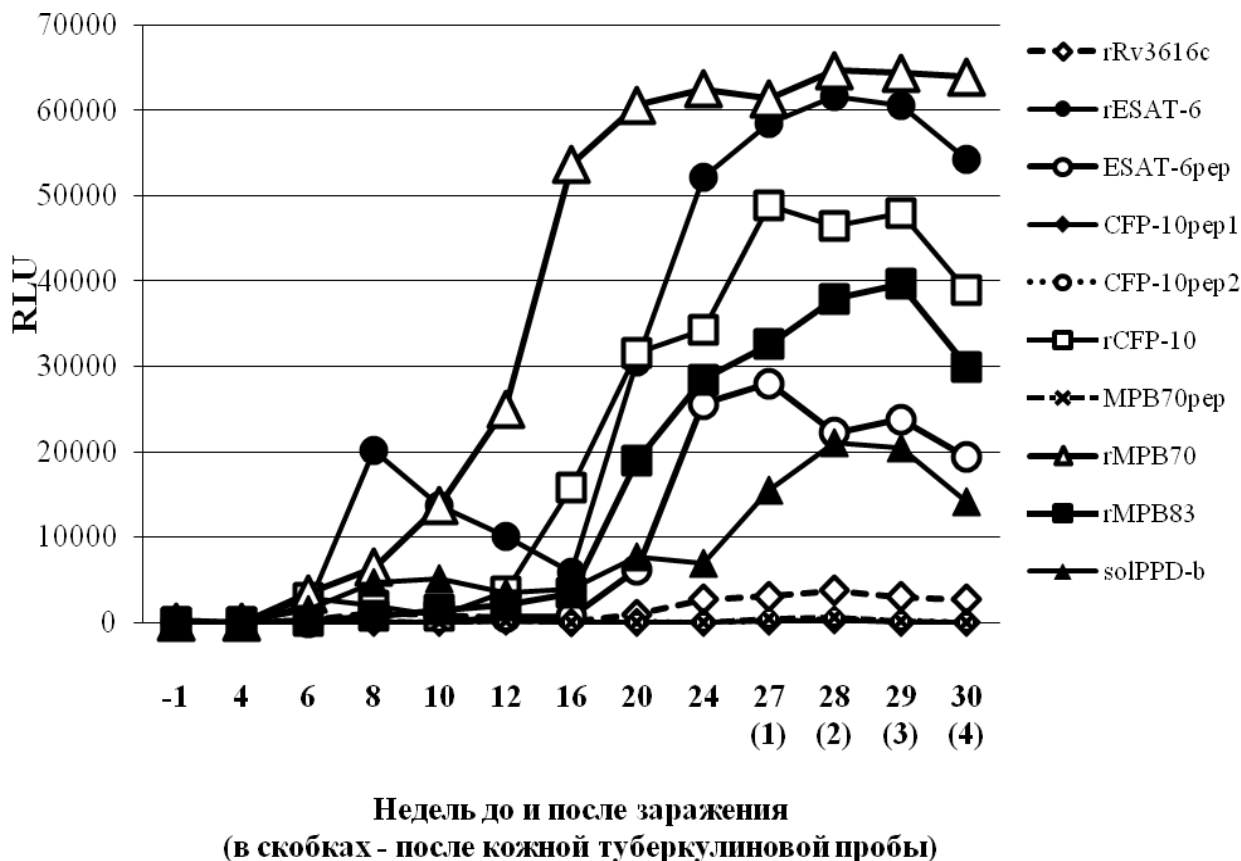


Рис. 1. Антителогенез у вапиту (животное №36), экспериментально зараженного *M.bovis*.

В группе E 13 из 63 проб были от вапиту из благополучных по туберкулезу территорий. Все эти животные реагировали отрицательно в мультиплексном иммуноанализе. 30 из 63 проб были от животных, у которых диагноз на туберкулез был подтвержден постмортальными гистопатологическими и/или бактериологическими методами. Положительные результаты в мультиплексном иммуноанализе получены в 26 случаях. Оставшиеся 20 проб были от животных с неподтвержденным диагнозом, но из стад, где выявлялся туберкулез. 11 из этих 20 вапиту реагировали положительно в мультиплексном иммуноанализе.

В связи с отсутствием высокоэффективных средств диагностики туберкулеза у оленей новые подходы в этом направлении остаются актуальными (Buddle *et al.*, 2010; Waters *et al.*, 2011). Серологические методы с использованием одного антигена не всегда могут обеспечить максимальный уровень чувствительности и специфичности необходимые для иммуноскрининга. Использование нескольких антигенов позволяет обнаружить / диагностировать заболевание на различных стадиях инфекционного процесса, а также выявлять инфицированные особи в различных популяциях, где иммунный ответ на

отдельные специфичные антигены может различаться (Шуралев и соавт., 2012; Шуралев и соавт., 2013). Этот факт подтверждается и в этом исследовании: различные животные по-разному реагируют на определенные антигены, что связано как с индивидуальными особенностями иммунного ответа хозяина, так и с биологическим циклом самих микроорганизмов. Кинетика антител к различным антигенам микобактерий колеблется, в зависимости от природы антигена в жизненном цикле *M.bovis* (Harrington *et al.*, 2008).

Результаты данной работы указывают на возможность использования инновационного серологического теста для выявления туберкулеза у оленьих, в частности у вапити, североамериканского подвида благородного оленя. Надо отметить, что дальнейшие исследования необходимы для достижения максимально высокой чувствительности и специфичности мультиплексного иммуноанализа. Комплексный подход с использованием более чем одного диагностического теста, с оценкой как гуморального, так и клеточного иммунитета, может быть ключом к успешной борьбе с данным заболеванием в долгосрочной перспективе.

#### **Список литературы.**

1. *Александрова, Н.М.* Индикация возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота молекулярно-генетическими методами/ Н.М. Александрова, Т.Х. Фаизов, А.В. Иванов, И.К. Фахртдинов// Вест. Казанского гос. аграрного ун-та. – 2011. – Т.21, №3. – С. 109-112.
2. *Данко, Ю.Ю.* Эпизоотологические особенности туберкулеза пятнистых уссурийских оленей в Калининградской области/ Ю.Ю. Данко// Иппология и ветеринария. – 2011. – №2. – С.136-138.
3. *Ощепков, В.Г.* О роли диких, синантропных и мелких домашних животных в резервации и распространении микобактерий туберкулеза/ В.Г. Ощепков, В.Ф. Бордюг, Н.Н. Кошечев, А.Д. Панкратова, А.Г. Гардер// Достижения науки и техники АПК. – 2012. – №2. – С.74-76.
4. *Ощепков, В.Г.* Дифференциальная диагностика туберкулеза с применением хемилюминесцентного метода/ В.Г. Ощепков, Л.А. Таллер, Г.М. Дюсенова, Т.А. Вассмирская, Е.Ю. Секин // Достижения науки и техники АПК. – 2009. - №12. – С. 41-43.
5. *Шуралев, Э.А.* К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота/ Э.А. Шуралев, Э.В. Ндаишимийе, М.Н. Мукминов// Ученые записки КГАВМ им.Н.Э.Баумана. – 2012. – Т.211. – С.202-206.
6. *Шуралев, Э.А.* Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов/ Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева, А.А. Васин, А.В. Иванов, К. Велан// Ветеринария. – 2013. – №2. – С.25-28.
7. *Якупов, Т.Р.* Иммуноблот анализ в диагностике туберкулеза/ Т.Р. Якупов, К.С. Хаертдинов// Ветеринарный врач. – 2011. - №1. – С. 29-31.
8. *Brook, R.K.* Evaluating use of cattle winter feeding areas by elk and white-tailed deer: implications for managing bovine tuberculosis transmission risk from the ground up/ R.K. Brook, E.V. Wal, F.M. van Beest, S.M. McLachlan// Prev Vet Med., 108(2-3). – 2013. – P. 137-147.
9. *Buddle, B.M.* Sensitivity, specificity, and confounding factors of novel serological tests used for the rapid diagnosis of bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*)/ B.M. Buddle, T. Wilson, M. Denis, R. Greenwald, J. Esfandiari, K.P. Lyashchenko, S. Liggett, C.G. Mackintosh// Clin Vaccine Immunol., Apr; 17(4). – 2010. – P. 626-630.
10. *Harrington, N.P.* Antibody responses of cervids (*Cervus elaphus*) following experimental *Mycobacterium bovis* infection and the implications for immunodiagnosis/ N.P. Harrington, O.P. Surujballi, J.F. Prescott, J.R. Duncan, W.R. Waters, K. Lyashchenko, R. Greenwald// Clin Vaccine Immunol., 15(11). – 2008. – P. 1650-1658.
11. *Walter, W.D.* On-farm mitigation of transmission of tuberculosis from white-tailed deer to cattle: literature review and recommendations/ W.D. Walter, C.W. Anderson, R. Smith, M. Vanderklok, J.J. Averill, K.C. Vercauteren// Vet Med Int. – 2012. – 2012:616318. – doi:10.1155/2012/616318
12. *Waters, W.R.* Blood culture and stimulation conditions for the diagnosis of tuberculosis in cervids by the Cervigam assay/ W.R. Waters, M.V. Palmer, T.C. Thacker, K. Orloski, P. Nol, N.P. Harrington, S.C. Olsen, B.J. Nonnecke// Vet Rec., 162(7). – 2008. – P. 203-208.
13. *Waters, W.R.* Bovine Tuberculosis in a Nebraska Herd of Farmed elk and Fallow deer: A Failure of the Tuberculin Skin Test and Opportunities for Serodiagnosis/ W.R. Waters, G.E. Stevens, M.A. Schoenbaum, K.A. Orloski, S. Robbe-Austerman, N.B. Harris, S.M. Hall, B.V. Thomsen, A.J. Wilson, R.E. Brannian, J.T. Nelson, S. Schafer, J. Esfandiari, M. Dutton, R. Greenwald, K.P. Lyashchenko// Vet Med Int., V.2011. – 2011. – Article ID 953985. – 8 pages.