

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У АЛЬПАК

Э.А. Шуралев – к.в.н., старший преподаватель, с.н.с.

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности,
г. Казань, e-mail: eduard.shuralev@mail.ru**COMPARISON OF TEST-SYSTEMS FOR DETECTION OF TUBERCULOSIS IN ALPACAS**

E.A. Shuralev – PhD, Senior Lecturer, Senior Research Fellow

Kazan Federal University,
Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety,
Kazan, e-mail: eduard.shuralev@mail.ru**Аннотация:**

Туберкулез, вызываемый *Mycobacterium bovis*, является серьезной проблемой, заболевание регистрируется у многих сельскохозяйственных и диких животных. У альпак (*Vicugna pacos*) симптомы, такие как кашель, заболевания дыхательных путей, потеря веса, проявляются только на поздних стадиях болезни. В настоящее время единственным доступным прижизненным диагностическим тестом при туберкулезе является внутрикожная туберкулиновая проба, которая не имеет достаточной чувствительности и специфичности. В этой работе мы проводим сравнительный анализ трех диагностических тест-систем. Пробы сыворотки крови 44 животных были получены в исследовательской группе по изучению туберкулеза Агентства ветеринарных лабораторий (г. Уэйбридж, Соединенное Королевство), где предварительно проводился γ -интерферон тест и Stat-Pak. Сыворотки крови животных были также исследованы в TB-Enferplex тесте в серологической лаборатории компании Enfer Scientific, г. Нэйс, Ирландия. Данному исследованию предшествовали идентификация и бактериологическое подтверждение туберкулеза в хозяйстве, откуда были получены пробы. Патоморфологическими и гистологическими методами у 15 из 44 альпак были выявлены типичные туберкулезные поражения. Тестом Stat-Pak идентифицировали 12, γ -интерферон тестом все 15, а методом Enferplex 14 из этих 15 животных. Каппа-индекс согласованности для проб от животных с подтвержденным инфекционным статусом при сравнении Stat-Pak и γ -интерферон теста составил 0,841, для TB-Enferplex и Stat-Pak – 0,782, а при сравнении γ -интерферон теста с TB-Enferplex – 0,949. Высокая чувствительность и специфичность испытанных тест-систем указывает на потенциальную возможность применения всех трех тестов в комбинациях для прижизненной диагностики туберкулеза у альпак.

Abstract:

Mycobacterium bovis infection is a persistent problem that affects many domestic and wildlife species. When the infection is present in alpacas (*Vicugna pacos*) the symptoms such as coughing, respiratory problems, weight loss, may not be shown until the disease has reached advanced stages. Currently the single intradermal comparative tuberculin test is used for diagnosis mainly. However the sensitivity and the specificity of the test are not sufficient. Here we compare three tests for the detection of tuberculosis in alpacas. Samples of 44 animals were obtained from TB Research Group, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, United Kingdom, and the Stat-Pak rapid test and IFN- γ assay was carried-out there, and Enferplex TB assay was performed in Serological laboratory of Enfer Scientific, Naas, Ireland. In this herd tuberculosis was identified and confirmed using bacteriology previously to this study. Post mortem examination was carried-out in all animals. 15 of 44 alpacas had visible lesions. The Stat-Pak detected 12, IFN- γ all 15 and Enferplex assay 14 of these 15 animals. The kappa agreement for the samples from animals with confirmed infection status comparing the Stat-Pak and the IFN- γ assay was 0.841, for the Enferplex TB assay and the Stat-Pak was 0.782 and IFN- γ assay versus Enferplex TB assay was 0.949. High sensitivity and specificity of the test-systems indicates the potential for use of all three tests in combinations for the ante-mortem diagnosis of tuberculosis in alpacas.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: альпака, туберкулез, серологическая диагностика, каппа-индекс.

KEYWORDS: alpaca, tuberculosis, serological diagnostics, kappa index.

Туберкулез встречается у животных многих видов. *Mycobacterium bovis* особенно патогенен для копытных, восприимчивыми животными являются как домашние, так и дикие животные. Одним из таких видов является альпака (*Vicugna pacos*).

Альпака – домашнее парнокопытное животное, продуцирующее высококачественную шерсть, из которой делают одеяла, пледы и одежду. На сегодняшний день около трех миллионов этих животных обитает в высокогорном поясе Южной Америки (Анды), большая часть из которых разводится в Перу. Альпак также разводят и в других странах, таких как Великобритания, Ирландия, Испания и других, их также содержат во многих зоопарках мира [1,2].

В настоящее время не существует официально зарегистрированной программы по диагностике туберкулеза у альпак, и единственной возможностью является постмортальное исследование с обнаружением патологоанатомических изменений, характерных для туберкулеза, и выделение возбудителя при вскрытии животных, с клиническими признаками болезни. Инфекция *M.bovis* у южноамериканских верблюдовых не сопровождается видимыми клиническими признаками долгое время после заражения, и только на поздних стадиях заболевание характеризуется внезапным проявлением симптомов и быстрой смертью. Для прижизненной диагностики используется кожная туберкулиновая проба, которая имеет очень низкую чувствительность [3]. Разработка высокоэффективной диагностической тест-системы для прижизненной диагностики туберкулеза у альпак остаётся актуальной.

В данной работе показаны результаты сравнительного анализа трех диагностических тест-систем: γ -интерферон тест (IFN- γ), основанный на клеточном иммунитете, и два серологических теста – Stat-Pak и TB-Enferplex (TB-Enf). Исследования проводились в серологической лаборатории компании Enfer Scientific (г. Нейс, Ирландия).

Материалы и методы. Пробы сыворотки крови 44 альпак были получены в исследовательской группе по изучению туберкулеза Агентства ветеринарных лабораторий (г. Уэйбридж, Соединенное Королевство), где проводились IFN- γ и Stat-Pak. Сыворотки крови животных были также исследованы в TB-Enf в серологической лаборатории компании Enfer Scientific, г. Нэйс, Ирландия. Данному исследованию предшествовали идентификация и бактериологическое подтверждение туберкулеза в хозяйстве, откуда были получены пробы.

От каждого животного было взято по одной пробе гепаринизированной крови (для γ -интерферон теста) и сыворотки крови (для серологических тестов).

Для постмортальных исследований кусочки тканей органов подвергали гомогенизации с последующим высевом гомогената на питательные среды и наблюдением за ростом культур в течение 14 недель. Выделенные культуры *M.bovis* генотипировали в ПЦР.

γ -интерферон ИФА тест ставили, используя реактивы МАВТЕСН (Швеция). В лунки планшет вносили 50 мкл антител в карбонатном буфере и инкубировали в течение 12 ч. Затем 200 мкл блокирующего раствор на основе бычьего сывороточного альбумина инкубировали в течение 1 ч. После промывки вносили по 50 мкл проб крови альпак стимулированных и нестимулированных PPD, а также положительный и отрицательный контроли, и инкубировали в течение 1 ч, с последующей промывкой планшет и добавлением 50 мкл антивидовых антител. Планшеты инкубировали в течение 1 ч, промывали и добавляли по 50 мкл стрептавидин-щелочной фосфатазы с последующей 1 ч инкубацией, промывкой и внесением субстрата на 30 мин. Читку реакции проводили в ИФА ридере.

Серологический тест Stat-Pak (Chembio Diagnostic Systems, г. Медфорд, США) основан на микобактериальных антигенах, иммобилизованных на нитроцеллюлозной полоске, с синей латексной системой детекции сигнала для быстрого обнаружения антител [4]. 30 мкл сыворотки крови вносили в лунку кассеты, где происходило ее впитывание. 3 капли буферного раствора (включен в комплект) были добавлены в лунку, с последующей инкубацией в течение 20 мин и учета результатов. Для действительности теста полная синяя полоса должна появиться на месте линии контроля (зона С). Для положительного теста полная синяя полоса должна также появиться на месте тест-линии (зона Т).

TB-Enferplex тест ставили по описанной ранее методике [5] с модификациями для исследования альпак. Пробы сыворотки крови разводили 1:200 в буферном растворе, 50 мкл вносили в лунки микропланшет для мультиплексного иммуноанализа и инкубировали в течение 60 мин, с последующей промывкой и добавлением антивидовых антител в разведении 1:5000. Планшеты инкубировали в течение 60 мин, промывали, добавляли хемилюминесцентный субстрат и прово-

дили читку реакции в мультиплекс-ридере. Данные обрабатывали с учетом уровня антител к каждому из 4 исследуемых антигенов (rMPV70, MPV70-пер, rMPV83, rRv3616с).

При статистической обработке результатов учитывали каппа-индекс, который рассчитывали с использованием программы Minitab, версия 15.0.

Результаты исследований. Патоморфологическими и гистологическими методами у 15 из 44 альпак были выявлены типичные туберкулезные поражения (см. рис. 1) с выделением культуры возбудителя туберкулеза. Методом ПЦР была подтверждена принадлежность ее к *M.bovis*.



Рис. 1. Твердые творожистые узелки в средостенных лимфатических узлах и легком альпаки, больной туберкулезом. Фото: Ann Sharpe.

IFN- γ выявил все 15 инфицированных животных. Серологический тест Stat-Pak идентифицировал 12, а TB-Enf – 14 из этих 15 животных. Сравнительный анализ результатов этих трех тестов приведен в таблице 1. Наибольшая согласованность результатов установлена при сравнении IFN- γ и TB-Enf тестов, при этом каппа-индекс составил 0,949. При сопоставлении данных, полученных при исследовании животных методами Stat-Pak и IFN- γ каппа-индекс был на уровне 0,841. Наименьшая согласованность результатов исследований наблюдалась при сравнении данных, полученных TB-Enf и Stat-Pak тестами, а каппа-индекс составил 0,782.

Таблица 1.

Сравнительное обобщение результатов диагностических тестов, полученных при обследовании 44 альпак

		IFN- γ		Всего			IFN- γ		Всего			TB-Enf		Всего
		пол.	отр.				пол.	отр.				пол.	отр.	
Stat-Pak	пол.	12	0	12	TB-Enf	пол.	14	0	14	Stat-Pak	пол.	11	1	12
	отр.	3	29	32		отр.	1	29	30		отр.	3	29	32
Всего		15	29	44	Всего		15	29	44	Всего		14	30	44
Каппа-индекс*		0,841 (0,669-1,012)			Каппа-индекс*		0,949 (0,849-1,048)			Каппа-индекс*		0,782 (0,581-0,984)		

* - в скобках указан 95% доверительный интервал.

При исследовании животных тестом TB-Enferplex, основанным на выявлении специфических антител к различным микобактериальным антигенам, обнаружено, что наибольшей активностью характеризуется rMPV83, уровень антител к которому у большинства альпак, инфицированных *M.bovis*, выявлялся на уровне 30000-50000 RLU. Наименьший уровень антител наблюдался к антигену rRv3616с, только у двух животных сигналы улавливались на уровне выше 30000 RLU. Высокая специфичность при диагностике туберкулеза у альпак установлена у рекомбинантных антигенов rRv3616с и rMPV70. Другие два антигена rMPV83 и MPV70-пер показали некую кросс-

реактивность, когда антитела сывороток крови здоровых животных реагировали в мультиплексной реакции с этими антигенами. При этом с rMPV83 реагировало 5, а с MPV70-пер – 2 из 29 животных. Уровень же антител во втором случае не превышал 20000 RLU.

Обсуждение результатов. Современное состояние проблемы диагностики туберкулеза требуют новых подходов. Закрепившаяся кожная туберкулиновая проба не позволяет своевременно выявлять зараженных животных, что приводит к распространению инфекции. Особо остро стоит задача создания новых диагностических тест-систем для обнаружения инфицированных животных дикой природы, одним из видов которых является альпака.

В нашей работе мы провели сравнительный анализ трех тест-систем, предназначенных для диагностики туберкулеза, в модификациях для применения на альпаках. γ -интерферон тест позволяет оценить статус животного оценивая клеточный иммунитет при туберкулезе. Его высокая чувствительность позволяет своевременно выявить больное животное уже на ранних стадиях инфицирования. γ -интерферон тест разработан для диагностики туберкулеза многих видов животных, в том числе крупного рогатого скота, коз, барсуков, кабана [6-9]. В нашей работе мы модифицировали этот тест для обнаружения *M.bovis* инфекции у альпаки. Этот тест показал высокую чувствительность, что согласовывается с результатами других авторов, использовавших γ -интерферон тест на других видах. Все 15 животных, у которых туберкулез был подтвержден постмортальными патоморфологическими и бактериологическими исследованиями, были положительны в γ -интерферон тесте. Однако этот метод является малоэффективным в виду того, что для исследования необходимы свежие пробы крови (не более 4 часов после взятия), что не всегда возможно в полевых условиях.

Более целесообразно использование серологических реакций, когда для тестирования необходима сыворотка крови животного. Мы провели исследования двух таких реакций – Stat-Pak и ТВ-Enferplex, которые показали свою высокую чувствительность и специфичность в исследованиях на других видах животных [4,5,9-11]. В модификациях применительно к альпакам эти тест-системы также показали высокую чувствительность, причем ТВ-Enferplex это было более выражено – 14 из 15 зараженных животных были позитивными, в то время как в тесте Stat-Pak – только 12. Надо отметить, что в ТВ-Enferplex нами были исследованы только 4 антигена: rMPV70, MPV70-пер, rMPV83, rRv3616с, так как это были только предварительные испытания. Однако этим методом можно исследовать уровень антител ко многим микобактериальным антигенам (более 25) [5], что позволяет запланировать дальнейшие исследования в этом направлении применительно к альпакам и другим видам верблюдовых.

Сравнительный анализ результатов показал высокую корреляцию между этими тремя тестами с каппа-индексом 0,782-0,949. Это также доказывает высокую чувствительность тест-систем: γ -интерферон теста, Stat-Pak и ТВ-Enferplex.

Заключение. Высокая корреляция результатов, полученных при сравнительном анализе трех тест-систем (γ -интерферон теста, Stat-Pak и ТВ-Enferplex) позволяет предположить, что эти тест-системы при совместном применении, а также вместе с кожной туберкулиновой пробой могут быть использованы для своевременной диагностики туберкулеза у альпак, что позволит усовершенствовать меры борьбы и контроля этого заболевания. Дополнительные исследования методом мультиплексного иммуноанализа (ТВ-Enferplex) с использованием большего количества антигенов позволит повысить чувствительность диагностической тест-системы.

Автор выражает благодарность J.Clarke, C.Whelan, A.O'Brien (Enfer Scientific), M.Vordermeier (Veterinary Laboratories Agency), K.Lyashchenko (Chembio Diagnostic Systems) за предоставленные пробы и оказанную помощь в проведении исследований.

Литература

1. Twomey D.F., Crawshaw T.R., Anscombe J.E., Barnett J.E., Farrant L., Evans L.J., McElligott W.S., Higgins R.J., Dean G.S., Vordermeier H.M., de la Rua-Domenech R. Assessment of antemortem tests used in the control of an outbreak of tuberculosis in llamas (*Lama glama*) // Vet Rec. 2010. V.167, №13. P.475-480.
2. García-Bocanegra I., Barranco I., Rodríguez-Gómez I.M., Pérez B., Gómez-Laguna J., Rodríguez S., Ruiz-Villamayor E., Perea A. Tuberculosis in alpacas (*Lama pacos*) caused by *Mycobacterium bovis*. // J Clin Microbiol. 2010. V.48, №5. P.1960-1964.
3. Alvarez J., Bezos J., de Juan L., Vordermeier M., Rodriguez S., Fernandez-de-Mera I.G., Mateos A., Domínguez L. Diagnosis of tuberculosis in camelids: old problems, current solutions and future challenges. // Transbound Emerg Dis. 2012. V.59, №1. P.1-10.

4. Lyashchenko K.P., Greenwald R., Esfandiari J., Meylan M., Burri I.H., Zanolari P. Antibody responses in New World camelids with tuberculosis caused by *Mycobacterium microti*. // *Vet Microbiol.* 2007. V.125, №3-4. P.265-273.
5. Whelan C., Shuralev E., O'Keeffe G., Hyland P., Kwok H.F., Snoddy P., O'Brien A., Connolly M., Quinn P., Groll M., Watterson T., Call S., Kenny K., Duignan A., Hamilton M.J., Buddle B.M., Johnston J.A., Davis W.C., Olwill S.A., Clarke J. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. // *Clin Vaccine Immunol.* 2008. V.15, №12. P.1834-1838.
6. Casal C., Bezos J., Díez-Guerrier A., Álvarez J., Romero B., de Juan L., Rodriguez-Campos S., Vordermeier M., Whelan A., Hewinson R.G., Mateos A., Domínguez L., Aranaz A. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon- γ assay for diagnosis of bovine tuberculosis. // *Prev Vet Med.* 2012. V.105, №1-2. P.149-154.
7. de Val Pérez B., López-Soria S., Nofrías M., Martín M., Vordermeier H.M., Villarreal-Ramos B., Romera N., Escobar M., Solanes D., Cardona P.J., Domingo M. Experimental model of tuberculosis in the domestic goat after endobronchial infection with *Mycobacterium caprae*. // *Clin Vaccine Immunol.* 2011. V.18, №11. P.1872-1881.
8. Dalley D., Davé D., Lesellier S., Palmer S., Crawshaw T., Hewinson R.G., Chambers M. Development and evaluation of a gamma-interferon assay for tuberculosis in badgers (*Meles meles*). // *Tuberculosis (Edinb).* 2008. V.88, №3. P.235-243.
9. Rhodes S.G., Gunn-Moore D., Boschirolì M.L., Schiller I., Esfandiari J., Greenwald R., Lyashchenko K.P. Comparative study of IFN γ and antibody tests for feline tuberculosis. // *Vet Immunol Immunopathol.* 2011. V.144, №1-2. P.129-134.
10. Shuralev E., Quinn P., Doyle M., Duignan A., Kwok H.F., Bezos J., Olwill S.A., Gormley E., Aranaz A., Good M., Davis W.C., Clarke J., Whelan C. Application of the Enfer chemiluminescent multiplex ELISA system for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in goats. // *Vet Microbiol.* 2012. V.154, №3-4. P.292-297.
11. Landolfi J.A., Mikota S.K., Chosy J., Lyashchenko K.P., Giri K., Gairhe K., Terio K.A. Comparison of systemic cytokine levels in *Mycobacterium* spp. seropositive and seronegative Asian elephants (*Elephas maximus*). // *J Zoo Wildl Med.* 2010. V.41, №3. P.445-455.