УДК 619:599.735.5:616-002.5:579.873.21:616-097

Синтетический полипептид рMPB70 выявляет специфические антитела при туберкулезе крупного рогатого скота

Э.А. Шуралев[1,2], кандидат ветеринарных наук, доцент, ведущий научный сотрудник
Т.Х. Фаизов[1], доктор ветеринарных наук, профессор, зав. лабораторией
Н.И. Хаммадов[1], кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
К.А. Осянин[1], кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
К.В. Усольцев[1], кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник
Н.М. Александрова[2], кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
[1]Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, 420075, г. Казань, Научный городок-2
[2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18
E-mail: vnivi@mail.ru

Реферат. Статья посвящена оценке антигенной активности сконструированного синтетического полипептида иммуногенного эпитопа MPB70 для выявления специфических антител при туберкулезе крупного рогатого скота (КРС). Биоинформационным анализом была определена антигенная детерминанта белка MPB70, наиболее специфичная для вирулентных штаммов *Mycobacterium bovis*. Далее был сконструирован и синтезирован полипептид pMPB70m, который использовали в качестве антигена в иммуноферментном анализе (ИФА). Показания читки реакции ИФА с образцами проб сыворотки крови 54 животных из благополучных хозяйств составляли 0,050…0,350 OD, что интерпретируется как отрицательный результат. При исследовании 47 образцов сыворотки крови КРС из неблагополучных по туберкулезу хозяйств методом ИФА, антитела к pMPB70m выявлялись на высоком уровне (0,500…3,500 OD) у 19 животных и интерпретировались как положительные, у 6 животных – они были на низком уровне (0,360…0,470 OD) и интерпретировались как сомнительные. У 22 животных специфические антитела не выявлялись, а результаты читки реакции находились в диапазоне 0,050…0,350 OD, что интерпретируется как отрицательный результат. Средние значения показателя оптической плотности результатов ИФА в группах составили: 0,175±0,102 OD для отрицательных, 0,415±0,044 OD – для сомнительных, и 1,199±0,788 OD – для положительных проб. Статистически подтверждено, что интерпретация результатов ИФА с антигеном pMPB70m достоверна ($p<0,05$) при использовании критериев: ≤ 0,350 OD – результат отрицательный; 0,350…0,500 OD – результат сомнительный; ≥ 0,500 OD – результат положительный. Таким образом, установлена высокая антигенная активность pMPB70m для выявления специфических антител при туберкулезе КРС.

Ключевые слова: *Mycobacterium bovis*, туберкулез, крупный рогатый скот, антигены, антитела, серологическая диагностика

Введение. Туберкулез остается одной из главных проблем современности и создание современных высокоэффективных методов диагностики этого заболевания является актуальным. В настоящее время для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота (КРС) используется туберкулиновый тест, который последнее годы становится малоэффективным в борьбе с этим заболеванием. Регулярно выявляются животные с неспецифическими реакциями на туберкулин, связанными в том числе и с циркуляцией нетуберкулезных микобактерий [1], что требует усовершенствования их дифференциации. С этой целью продолжается работа по повышению эффективности симультанной туберкулиновой пробы с ППД для млекопитающих и комплексного аллергена из атипичных микобактерий [2]. Проводятся испытания нового рекомбинантного аллергена [3].

С другой стороны, существует проблема персистирования L-форм *Mycobacterium bovis* в организме КРС с латентным течением заболевания, способных реверсировать в исходный бактериальный вид, что является фактором рецидива туберкулеза в оздоровленных хозяйствах [4]. Такие животные зачастую дают отрицательную реакцию на туберкулин, а для эффективной диагностики скрытых форм туберкулеза требуются более глубокие исследования иммунного статуса животных с определением фагоцитарной активности крови и цитохимическим исследованием лейкоцитов на миелопероксидазу [5].

Большие успехи достигнуты в совершенствовании ПЦР-индикации *M. bovis* [6, 7], но диагностическая эффективность данного метода высока только при постмортальных исследованиях.

Для более совершенного контроля распространения инфекционных заболеваний необходимы инновационные подходы, с использованием современных иммуноаналитических и молекулярно-биологических методов. При этом актуальной проблемой в борьбе с туберкулезом остается прижизненная лабораторная диагностика данного заболевания у КРС и других видов животных. Поиск высокоспецифичных антигенов *M. bovis* и *M. tuberculosis* даёт предпосылки внедрения в ближайшем будущем серологической, в том числе дифференциальной, диагностики туберкулеза [8, 9]. Особое место в этом направлении занимают иммунохроматографические экспресс-тесты [10, 11, 12]. Успешные результаты получены при использовании тест-системы на основе дот-блот иммуноферментного анализа для проведения скрининговых исследований

на туберкулез [13]. Более информативными в этом плане являются мультиплексные технологии, позволяющие проводить анализ с выявлением антител к нескольким антигенам одновременно [14, 15].

Одним из перспективных направлений является разработка серологических тест-систем на основе синтетических пептидов иммуногенных эпитопов антигенов *M. bovis* [16]. Ранее проведенными исследованиями были выявлены микобактериальные белки, среди которых потенциальными антигенными свойствами обладают секреторные (ESAT-6 и CFP-10) и структурные (MPB70 и MPB83) белки [17], которые также позволяют дифференцировать вакцинированных BCG и инфицированных *M. bovis* животных [18] и идентифицировать животных со скрытым течением туберкулеза, реагирующих отрицательно на туберкулин [19].

Целью данной работы была оценка антигенной активности сконструированного синтетического полипептида иммуногенного эпитопа MPB70 для выявления специфических антител при туберкулезе КРС.

Материалы и методы. Для конструирования синтетического антигена на основе аминокислотных последовательностей иммуногенного эпитопа (антигенных детерминант) белка MPB70 (*M. bovis*) применяли методы биоинформатики с использованием инструментов программы «Standard Protein BLAST» и ресурсов базы данных «National Center for Biotechnology Information» (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Для определения основных физико-химических показателей пептидов на стадии конструирования использовали программу «Peptide property calculator» («Innovagen AB», Швеция) (https://pepcalc.com/). Синтез сконструированных пептидов провели в компании ООО «АТГ Сервис Ген». Полученный материал подвергли хроматографическому анализу на чистоту целевого продукта. Данный синтетический полипептид использовали в качестве испытуемого антигена.

Биологическим материалом для исследований служили пробы сыворотки крови КРС из неблагополучного (n=47) и благополучного (n=54) по туберкулезу хозяйств (из коллекции ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

Сыворотки крови исследовали иммуноферментным анализом (ИФА). Антиген в концентрации 5 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,0) иммобилизировали на дно лунок высокосвязывающих планшет (Corning) в течение 16 часов при 4ºС с последующей 4-х кратной промывкой фосфатно-буферным раствором с 0,05% твина-20 (ФБР-Т). В лунки планшет вносили блокирующий буфер (ФБР-Т с 1% блокирующего агента (БА)) с экспозицией 2 часа при 37ºС с последующей 4-х кратной промывкой ФБР-Т. Сыворотки крови в разведении 1:200 в ФБР-Т с 1% БА инкубировали в течение 60 мин при 30ºС с последующей 4-х кратной промывкой ФБР-Т. Далее вносили кроличьи антитела против IgG КРС, меченные пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich), которые инкубировали в течение 30 мин при 30ºС с последующей 4-х кратной промывкой ФБР-Т. Визуализацию продуктов реакции проводили при помощи тетраметилбензидинового субстрата (ТМБ), который инкубировали в течение 15 мин при 30ºС, с последующей остановкой реакции 0,1М серной кислотой. Читку реакции осуществляли на спектрофотометре Multiskan GO (Thermo Scientific), при этом оценивали уровень антител в оптических единицах (OD) при длине волны 450 нм.

При статистической обработке результатов использовали программу ANOVA (VassarStats) (http://vassarstats.net/), при этом рассчитывали следующие показатели: среднее значение (M), стандартное отклонение (m), медиана (F(x)), максимальное (X_{max}) и минимальное (X_{min}) значения, коэффициент асимметрии (γ_1), дисперсия случайной величины (D[X]), коэффициент эксцесса (γ_2). Для оценки достоверности результатов определяли показатель Student's t-test.

Результаты и обсуждение. Используя базы данных PubMed, была определена антигенная детерминанта (иммуногенный эпитоп) белка MPB70, наиболее специфичная для вирулентных штаммов *M. bovis*. В результате был сконструирован полипептидный антиген pMPB70, который имеет следующую аминокислотную последовательность: SVQGMSQDPVAVAASNNPEL.

В виду низкой адсорбции синтетического полипептида к белковому носителю N-конца, была необходима его модификация без потери функционально важных участков. Нами была проведена модификация полипептида (pMPB70m) с добавлением линк-последовательности (L-), после чего вновь были оценены физико-химические показатели (таблица 1). Модификацией было увеличено количество аминокислотных последовательностей до 25, молекулярная масса составила 2431 г/моль. Добавление линк-последовательности не повлияло на коэффициент экстинкции, а показатели изоэлектрической точки и суммарного заряда сдвинулись в более эффективную позицию. Растворимость в воде синтетического полипептида pMPB70m после модификации также повысилась. Однако для такого рода пептидов необходима предварительная обработка с использованием ДМСО и/или раствора с крайне щелочной pH.

Таблица 1. Основные характеристики сконструированного полипептида pMPB70 и его модифицированного варианта pMPB70m

Показатели	pMPB70	pMPB70m
Химическая формула последовательности	$C_{83}H_{136}N_{24}O_{32}S_1$	$C_{99}H_{164}N_{30}O_{39}S_1$
Количество аминокислотных остатков	20	25
Молекулярная масса	2014 г/моль	2431 г/моль

Коэффициент экстинкции	0 $M^{-1}cm^{-1}$	0 $M^{-1}cm^{-1}$
Изоэлектрическая точка	pI = pH 0,63	pI = pH 3,93
Суммарный заряд при pH=7	- 2	- 1

Полученный синтетический полипептид был исследован на чистоту целевого продукта хроматографическим методом. Чистота продукта составила 98%. Синтезированный полипептид удовлетворял поставленным при дизайне и конструировании требованиям, что позволило использовать его в дальнейшем в качестве антигена в ИФА.

Для интерпретации полученных результатов ИФА с pMPB70m использовали следующие критерии оценки:

- при значениях оптической плотности ≤ 0,350 OD – результат считается отрицательным,
- при значениях оптической плотности 0,350…0,500 OD – результат считается сомнительным,
- при значениях оптической плотности ≥ 0,500 OD – результат считается положительным.

Показания читки реакции ИФА с образцами проб сыворотки крови 54 животных из благополучных хозяйств составляли 0,050…0,350 OD (рисунок), что интерпретируется как отрицательный результат. При исследовании 47 образцов сыворотки крови КРС из неблагополучных по туберкулезу хозяйств методом ИФА, антитела к синтетическому пептиду MPB70 выявлялись на высоком уровне (0,500…3,500 OD) у 19 животных и интерпретировались как положительные, у 6 животных – они были на низком уровне (0,360…0,470 OD) и интерпретировались как сомнительные. У 22 животных специфические антитела не выявлялись, а результаты читки реакции находились в диапазоне 0,050…0,350 OD, что интерпретируется как отрицательный результат.

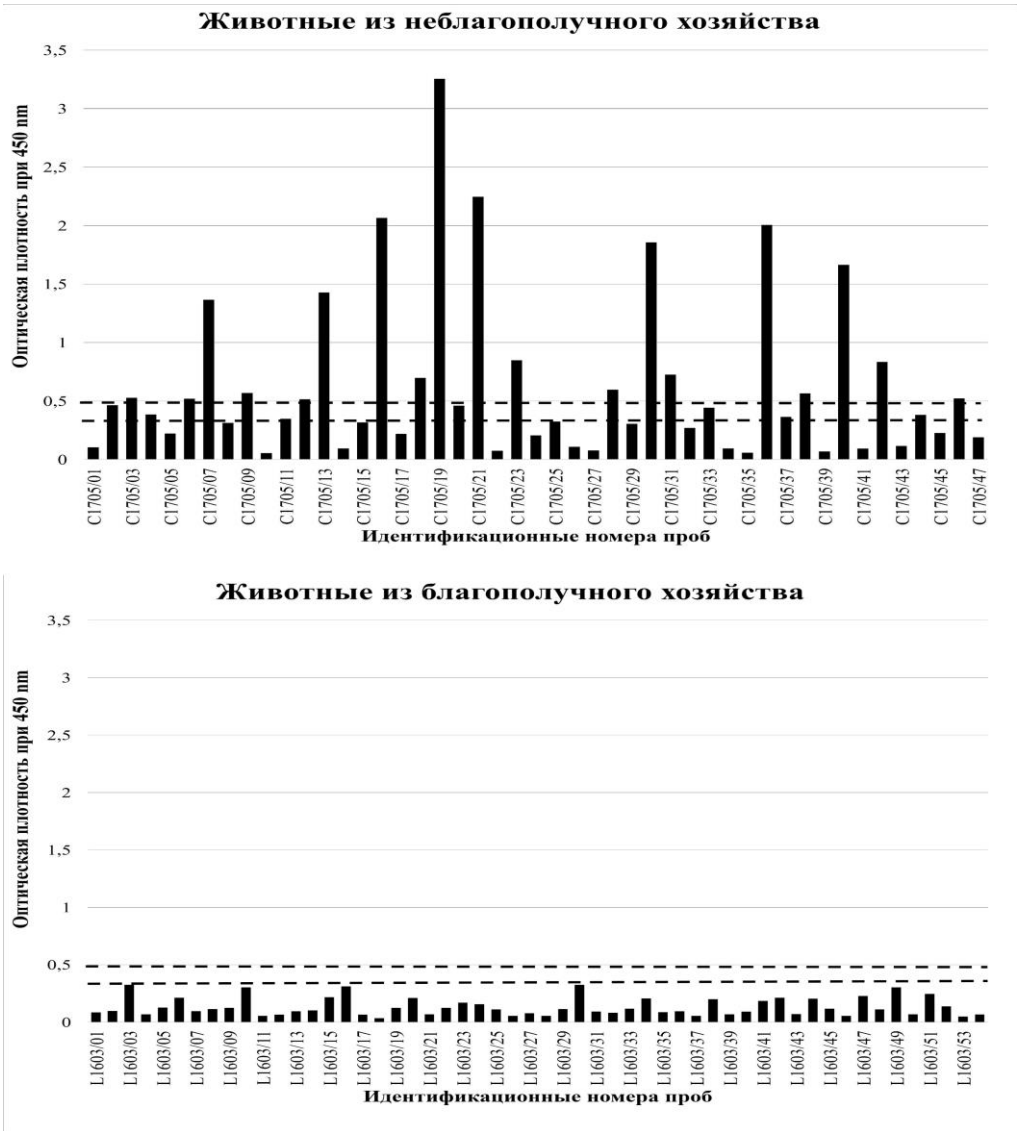

Рисунок. Результаты ИФА к антигену pMPB70m с образцами сывороток крови КРС из благополучного и неблагополучного по туберкулезу хозяйств (пунктирной линией выделен участок, где результат интерпретируется как сомнительный)

Отсутствие положительных результатов ИФА при исследовании 54 голов КРС из благополучного по туберкулезу хозяйства указывает на специфичность изучаемого антигена рMPB70m и невозможность неспецифических реакций «антиген-антитело». Следовательно, положительные результаты ИФА с данным антигеном означают наличие специфических антител в исследуемой сыворотке крови, указывающих на развитие туберкулезного инфекционного процесса в организме животного.

В данном исследовании мы использовали 47 образцов сыворотки крови КРС из неблагополучного по туберкулезу хозяйства. Отбор проб крови осуществлялся до проведения туберкулинизации. Понятно, что среди этих 47 голов туберкулезный процесс был на разных стадиях, и, естественно, не всё поголовье было заражено. Этим объясняется разнообразие уровня антител к антигену рMPB70m, выявляемого в ИФА. К тому же белок MPB70 не во всех случаях приводит к образованию специфических антител в организме КРС, инфицированного *M. bovis*, о чем свидетельствуют ранее проведенные исследования с использованием рекомбинантного антигена MPB70 [17]. В связи с этим рекомендуется проводить исследования по выявлению сывороточных специфических антител к нескольким антигенам *M. bovis* [15, 20].

Для получения ответа на вопрос о диагностической значимости сконструированного и синтезированного антигена был проведен статистический анализ полученных результатов ИФА в проекции сопоставления их согласно интерпретации: для отрицательной, сомнительной и положительной групп. Средние значения показателя оптической плотности результатов ИФА в группах составили: 0,175±0,102 OD для отрицательных, 0,415±0,044 OD для сомнительных, и 1,199±0,788 OD – для положительных проб (таблица 2).

Таблица 2. Статистические показатели результатов ИФА с антигеном рMPB70m

Группа	M	m	F(x)	X_{max}	X_{min}	γ_1	D[X]	γ_2
Отрицательные	0,175	0,102	0,152	0,346	0,054	0,335	0,0103	1,514
Сомнительные	0,415	0,044	0,413	0,464	0,364	0,000	0,0019	0,000
Положительные	1,199	0,788	0,833	3,254	0,514	1,029	0,6230	3,120

В таблице даны следующие показатели: среднее значение (M), стандартное отклонение (m), медиана (F(x)), максимальное (X_{max}) и минимальное (X_{min}) значения, коэффициент асимметрии (γ_1), дисперсия случайной величины (D[X]), коэффициент эксцесса (γ_2).

Оценки различия в указанных группах по критерию Student's t-test (таблица 3) указывают на достоверность полученных результатов. Таким образом, статистически подтверждается, что в указанных выше условиях и режимах проведения ИФА с антигеном рMPB70m интерпретация результатов будет достоверной при использовании критериев: ≤ 0,350 OD – результат отрицательный; 0,350…0,500 OD – результат сомнительный; ≥ 0,500 OD – результат положительный.

Таблица 3. Достоверность различий в разных группах для p<0,05

Показатели	Сравниваемые группы		
	положительная v's отрицательная	сомнительная v's положительная	сомнительная v's отрицательная
степень свободы	19	18	20
абсолютное t-распределение Стьюдента	5,619	4,314	8,570
критическое t-распределение Стьюдента	2,093	2,101	2,086
абсолютное > критическое	ДА	ДА	ДА
результат	достоверно	достоверно	достоверно

Статистической обработкой результатов установлена высокая антигенная активность сконструированного синтетического полипептида рMPB70m для выявления специфических антител при туберкулезе КРС. Полученные данные открывают перспективы серологической диагностики туберкулеза КРС, эффективность (высокая чувствительность и специфичность) которой можно будет достичь при использовании также синтетических полипептидов антигенных детерминант и других антигенов (ESAT-6, CFP-10, MPB83 и других) в комбинации с антигеном рMPB70m, что определяет дальнейшую научную работу в этом направлении.

Заключение. Биоинформационным анализом сконструирован синтетический полипептид антигенной детерминанты белка MPB70 *M. bovis*, физико-химические показатели которого после

модификации с добавлением линк-последовательности (pMPB70m) были удовлетворительными для использования последнего в качестве антигена в ИФА. Проведенными исследованиями проб сыворотки крови КРС, установлена и статистически подтверждена высокая антигенная активность синтетического полипептида pMPB70m для выявления специфических антител при туберкулезе. Дальнейшие исследования секреторных и структурных белков *M. bovis* позволят подобрать комбинации синтетических антигенов для эффективной серологической диагностики туберкулеза КРС.

Литература

1. Проблема неспецифических реакций на туберкулин и совершенствование симультанной пробы для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Н.Г. Толстенко и др. // Ветеринария. 2015. №6. С. 20–25.
2. Совершенствование симультанной туберкулиновой пробы для дифференциации неспецифических реакций у КРС / А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Н.Г. Толстенко и др. // Ветеринария и кормление. 2016. №1. С. 11–13.
3. Ощепков, В.Г., Кощеев, Н.Н. Новый перспективный аллерген (НРА) для диагностики туберкулеза у животных // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т.29, №10. С. 91–94.
4. Макаров, Ю.А., Горковенко, Н.Е., Макаров, И.Ю. Выявление некультивируемых форм микобактерий туберкулеза при латентном течении инфекции // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». 2017. №2. С. 54–58.
5. Макаров, Ю.А., Горковенко, Н.Е. Выявление крупного рогатого скота со скрытым течением туберкулезной инфекции // Ветеринария Кубани. 2015. №6. С. 4–5.
6. ПЦР на современном этапе борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Е.П. Вангели, Н.Г. Толстенко и др. // Ветеринария. 2016. №2. С. 20–23.
7. Дифференциальная диагностика туберкулеза у человека и животных с применением мультиплексной тест-системы / Н.М. Александрова, Н.И. Хаммадов, Э.А. Шуралев и др. // Молекулярная диагностика 2017: сб. трудов IX Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием. М: ООО фирма "Юлис", 2017. С. 493.
8. Валеева, А.Р. Влияние интоксикации кадмием на антителогенез кроликов при экспериментальном инфицировании Mycobacterium bovis // Ветеринарный врач. 2016. №3. С. 48–55.
9. Функционирование и серологическая активность экстракта клеток и продуктов экспрессии Mycobacterium bovis / Э.А. Шуралев, К.С. Хаертынов, А.Р. Валеева и др. // Ветеринария и кормление. 2017. №3. С. 103–105.
10. Изыскание экспресс метода диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / Р.Г. Ильязов, Т.А. Яхно, Р.А. Хамзин и др. // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2014. Т.220, №4. С. 115–118.
11. Использование экспресс-теста Bovine TB для проведения скрининговых исследований на туберкулез крупного рогатого скота / Д.Н. Мингалеев, Р.Х. Равилов, Н.И. Садыков и др. // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2016. Т.225, №1. С. 50–52.
12. Шуралев, Э.А. Оценка иммунохроматографического теста на основе мультиантигенов Mycobacterium bovis // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2017. Т.230, №2. С. 190–193.
13. Джакаит, Д.А. Дот-блот ИФА тест-система для выявления антител к микобактериям туберкулеза крупного рогатого скота // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2017. Т.231. С. 37–40.
14. Выявление специфических антител у вапити при туберкулезе / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, К. Велан и др. // Ветеринария. 2013. №8. С. 54–57.
15. Шуралев, Э.А. Образование антител у северного оленя, инфицированного Mycobacterium bovis // Ветеринария. 2016. №9. С. 18–20.
16. Шуралев, Э.А. Микобактериальные антигены: синтетические пептиды и рекомбинантные белки // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2013. Т.216. С. 403–407.
17. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle / C. Whelan, E. Shuralev, G. O'Keeffe et al. // Clinical and Vaccine Immunology. 2008. V.15(12). P. 1834–1838. doi: 10.1128/CVI.00238-08.
18. Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals / C. Whelan, A.O. Whelan, E. Shuralev et al. // Clinical and Vaccine Immunology. 2010. V.17(5). P. 813–817. doi: 10.1128/CVI.00489-09.
19. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of Mycobacterium bovis-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test / C. Whelan, E. Shuralev, H.F. Kwok et al. // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2011. V.23(3). P. 499–503.
20. Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, А.Р. Валеева и др. // Ветеринария. 2013. №2. С. 25–28.

Synthetic polypeptide pMPB70 detects specific antibodies in cattle with tuberculosis

E.A. Shuralev[1,2], Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Leading Researcher
T.Kh. Faizov[1], Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of Laboratory
N.I. Khammadov[1], Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher
K.A. Osyanin[1], Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher
K.V. Usoltsev[1], Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher
N.M. Aleksandrova[1,2], Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher

[1]Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety
[2]Kazan Federal University

Abstract. The purpose of this article is to evaluate the antigenic activity of the designed synthetic polypeptide of MPB70 immunogenic epitope for the detection of specific antibodies in cattle with tuberculosis. Using the bioinformatic analysis, the antigenic determinant of the MPB70 protein, the most specific for the virulent strains of *Mycobacterium bovis*, was determined. At the next step, a polypeptide pMPB70m was designed and synthesized, and then it was used as an antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). When serum samples from 54 animals from healthy farms were tested, the ELISA results were 0.050 ... 0.350 OD, which is interpreted as a negative. When 47 samples of blood serum from the farm with persisting tuberculosis were tested by ELISA, antibodies to

pMPB70m were detected at a high level (0.500 ... 3.500 OD) in 19 animals and were interpreted as positive, in 6 animals the results were at a low level (0.360 ... 0.470 OD) and interpreted as inconclusive. In 22 animals, specific antibodies were not detected, and ELISA results were in the range of 0.050 ... 0.350 OD, which is interpreted as negative. ELISA mean values of the optical density in the groups were: 0.175±0.102 OD for negative, 0.415±0.044 OD for inconclusive, and 1.199±0.788 OD for positive samples. It was statistically confirmed that the interpretation of the ELISA results with the antigen pMPB70m is reliable ($p<0.05$) when using the criteria: ≤0.350 OD – the result is negative; 0,350 ... 0,500 OD – the result is inconclusive; ≥0.500 OD – the result is positive. Thus, the high antigenic activity of pMPB70m for the detection of specific antibodies in cattle with tuberculosis was confirmed.

Key words: *Mycobacterium bovis*, tuberculosis, cattle, antigens, antibodies, serological diagnosis.

References

1. Problema nespetsificheskikh reaktsii na tuberkulin i sovershenstvovaniye simultannoi probi dlya diagnostiki tuberkuleza krupnogo rogatogo skota [Problem of nonspecific reaction to tuberculin and development of simultaneous probe for bovine tuberculosis diagnostic] / A.H. Naymanov, G.I. Ustinova, N.G. Tolstenko et al. // Veterinariya. 2015. 6: 20–25.
2. Sovershenstvovaniye simultannoi tuberkulinovoi probi dlya differentsiatsii nespetsificheskikh reaktsii u KRS [Development of simultaneous probe for differentiation of nonspecific reactions in cattle] / A.H. Naymanov, G.I. Ustinova, N.G. Tolstenko et al. // Veterinariya i kormleniye. 2016. 1: 11–13.
3. Oschepkov, V.G., Koshcheev, N.N. Novyi perspektivnyi allergen (NPA) dlya diagnostiki tuberkuleza u zhivotnikh [New promising allergen (NRA) for the diagnosis of tuberculosis in animals] // Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2015. 29(10): 91–94.
4. Makarov, Yu.A., Gorkovenko, N.E., Makarov, I.Yu. Viyavleniye nekultiviruyemikh form mikobakterii tuberkuleza pri latentnom techenii infektsii [Detecting noncultivated forms Mycobacteria of tuberculosis at the latent course of an infection] // Rossiiskii zhurnal «Problemi veterinarnoi sanitarii, gigieni i ekologii». 2017. 2: 54–58.
5. Makarov, Yu.A., Gorkovenko, N.E. Viyavleniye krupnogo rogatogo skota so skritim techeniyem tuberkuleznoi infektsii [Identification of cattle with a hidden course of tuberculosis infection] // Veterinariya Kubani. 2015. 6: 4–5.
6. PCR na sovremennom etape borbi s tuberkulezom krupnogo rogatogo skota [Using PCR at bovine tuberculosis] / A.K. Naimanov, E.P. Vangely, N.G. Tolstenko et al. // Veterinariya. 2016. 2: 20–23.
7. Differentsialnaya diagnostika tuberkuleza u cheloveka i zhivotnikh s primeneniem multipleksnoi test-sistemi [Differential diagnosis of tuberculosis in humans and animals using a multiplex test system] / N.M. Aleksandrova, N.I. Khammadov, E.A. Shuralev et al. // Molekularnaya diagnostika 2017: Proceeding of IX Russian research conference with international participation. Moscow: «Yulis», 2017. P. 493.
8. Valeeva, A.R. Vliyaniye intoksikatsii kadmiyem na antitelogenez krolikov pri eksperimentalnom infitsirovanii Mycobacterium bovis [Cadmium-intoxication impact on antibody response of experimentally Mycobacterium bovis infected rabbits] // Veterinarnii vrach. 2016. 3:48–55.
9. Funktsionirovaniye i serologicheskaya aktivnost ekstrakta kletok i produktov ekspressii Mycobacterium bovis [Fractionation and serological activity of Mycobacterium bovis cell extract and secondary metabolites] / E.A. Shuralev, K.S. Khaertynov, A.R. Valeeva et al. // Veterinariya i kormleniye. 2017. 3: 103–105.
10. Iziskaniye ekspress metoda diagnostiki tuberkuleza krupnogo rogatogo skota [Finding a rapid method of tuberculosis diagnostic in cattle] / R.G. Ilyazov, T.A. Yakhno, R.A. Khamzin et al. // Ucheniye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsini im. N.E. Baumana. 2014. 220(4): 115–118.
11. Ispolzovaniye ekspress-testa Bovine TB dlya provedeniya skriningovikh issledovaniy na tuberkulez krupnogo rogatogo skota [Use express-test Bovine TB for undertaking screening studies on bovine tuberculosis] / D.N. Mingaleev, R.Ch. Ravilov, N.I. Sadykov et al. // Ucheniye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsini im. N.E. Baumana. 2016. 225(1): 50–52.
12. Shuralev, E.A. Otsenka immunokhromatograficheskogo testa na osnove multiantigenov Mycobacterium bovis [Evaluation of the immunochromatographic test based on Mycobacterium bovis multiantigens] // Ucheniye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsini im. N.E. Baumana. 2017. 230(2): 190–193.
13. Jakait, J.A. Dot-blot IFA test-sistema dlya viyavleniya antitel k mikobakteriyam tuberkuleza krupnogo rogatogo skota [Dot-blot immunoanalysis test-system for the detection of antibodies to Mycobacteria of bovine tuberculosis] // Ucheniye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsini im. N.E. Baumana. 2017. 231: 37–40.
14. Viyavleniye spetsificheskikh antitel u vapiti pri tuberkuleze [Detection of specific antibodies in elk infected by tuberculosis] / E.A. Shuralev, M.N. Mukminov, C. Whelan et al. // Veterinariya. 2013. 8: 54–57.
15. Shuralev, E.A. Obrazovaniye antitel u severnogo olenya, infitsirovannogo Mycobacterium bovis [Antibody response of Mycobacterium bovis infected reindeer] // Veterinariya. 2016. 9: 18–20.
16. Shuralev, E.A. Mikobakterialniye antigeni: sinteticheskiye peptidi i rekombinantniye belki [Mycobacterial antigens: synthetic peptides and recombinant proteins] // Ucheniye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsini im. N.E. Baumana. 2013. 216: 403–407.
17. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle / C. Whelan, E. Shuralev, G. O'Keeffe et al. // Clinical and Vaccine Immunology. 2008. 15(12): 1834–1838. doi: 10.1128/CVI.00238-08.
18. Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals / C. Whelan, A.O. Whelan, E. Shuralev et al. // Clinical and Vaccine Immunology. 2010. 17(5): 813–817. doi: 10.1128/CVI.00489-09.
19. Use of a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay to detect a subpopulation of Mycobacterium bovis-infected animals deemed negative or inconclusive by the single intradermal comparative tuberculin skin test / C. Whelan, E. Shuralev, H.F. Kwok et al. // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2011. 23(3): 499–503.
20. Multipleksniy IFA s khemilyuminestsentoy metkoy dlya diagnostiki tuberkuleza u kabanov [Assessment of antigen specificity for diagnostics of tuberculosis in wild boars] / E.A. Shuralev, M.N. Mukminov, A.R. Valeeva et al. // Veterinariya. 2013. 2: 25–28.