

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА КОЗ И ЕЕ ПРЕИМУЩЕСТВА

Шуралев Эдуард Аркадьевич

доцент кафедры прикладной экологии,

*ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук

Институт экологии и природопользования Казанского (Приволжского) федерального университета, Россия, г. Казань;

*Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Россия, г. Казань

Аннотация. Целью данной работы явилось определение эффективности мультиплексного иммуноанализа для диагностики туберкулеза коз. Использовали сыворотки крови 594 коз из благополучных и неблагополучных территорий. Специфичность определена на уровне 100,0%. Суммарная чувствительность мультиплексного иммуноанализа составила 96,6%. Серологическая диагностика туберкулеза коз с мультантигенным подходом вполне может стать альтернативным, дополняющим средством борьбы с этим заболеванием наряду со стандартным методом кожной туберкулиновой пробы.

Ключевые слова: мультиплексный ИФА, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, антигены, антитела

Несмотря на относительное благополучие Российской Федерации по заболеваемости коз туберкулезом, остаются нерешенными некоторые вопросы эффективности диагностических мероприятий при этом заболевании. На возникновение и распространение туберкулеза оказывают влияние экологические, как биогенные, так и антропогенные, факторы [3]. В естественно обсемененных почвах на территориях, где регистрируется туберкулез животных, микобактерии сохраняют жизнеспособность и вирулентность более года [2], и как следствие формируются природные очаги, где возбудитель *Mycobacterium bovis* может сохраняться и циркулировать в резервуарах, включая диких животных. В эпизоотический процесс могут быть вовлечены и козы, что приводит к возникновению неблагополучных по туберкулезу козоводческих хозяйств. Так, в структуре заболеваемости локальных пород коз в суровых природно-климатических условиях Республики Тыва преобладают болезни инфекционной этиологии, в особенности бруцеллез и туберкулез [6]. Надо отметить, что туберкулез коз могут вызывать микобактерии как *M.bovis*, так и *M.caprae*. Требования технических регламентов Таможенного союза (ТР ТС 021/2011, ТР ТС 034/2013, ТР ТС 033/2013) делают особый акцент на качестве продуктов животноводства, в особенности полученных с территорий, неблагополучных по туберкулезу животных, в том числе и коз [1]. В отличие от строгих правил,

касающихся обращения с коровьим молоком, непастеризованное козье молоко может попадать на реализацию и использоваться для производства других молочных продуктов.

Использование туберкулинизации как стандартного метода диагностики туберкулеза крупного рогатого скота регламентировано и широко применяется. Однако адаптация кожной туберкулиновой реакции к диагностике инфекции у коз столкнулась с трудностями, особенно в отношении молодняка молочных коз с тонкой кожей. Сложность в исполнении процедуры приводит к сохранению в популяции невыявленных инфицированных животных и сохранению источника возбудителя. Проведенные исследования на испанских популяциях коз, инфицированных *M.caprae*, показали низкую чувствительность (42,7%) кожной туберкулиновой реакции [14]. Наряду с применением туберкулинизации при комплексной диагностике туберкулеза коз необходимо включение и других альтернативных методов [5], в том числе и серологических. Проведенными ранее исследованиями на разных видах животных показана эффективность серологической диагностики туберкулеза [7,10,11,12]. При этом особое внимание необходимо уделять выбору микобактериальных антигенов [8], динамика выработки антител к которым в организме инфицированных животных зависит от стадии развития инфекционного процесса при туберкулезе [7,11]. В связи с этим одним из требований к создаваемым серологическим тест системам добавляется мультиантигенный подход, позволяющий выявить инфицированное животное на любой стадии развития заболевания. При использовании мультиантигенного подхода наиболее оптимальным представляется метод мультиплексного иммуноанализа [9,10], позволяющий проводить одновременный анализ сразу к нескольким антигенам.

Целью данной работы явилось определение эффективности мультиплексного иммуноанализа, основанного на мультиантигенном подходе выявления специфических антител, для диагностики туберкулеза коз.

Материалы и методы. В работе использовали сыворотки крови коз, полученных из разных территорий. Для группировки животных использовали анамнестические данные, согласно которым часть животных (n=120) была из благополучных по туберкулезу в течение как минимум последних 5 лет территорий. Вторую группу составляли козы (n=208), реагирующие положительно в кожной аллергической реакции на туберкулин и/или гамма-интерферон тесте на туберкулез, а также те, у которых диагноз на туберкулез был подтвержден постмортальными патоморфологическими, гистологическими и/или бактериологическими методами (с выделением возбудителя *M.bovis* или *M.caprae*). Третью группу составляли животные (n=286), реагирующие отрицательно в кожной аллергической реакции на туберкулин, но происходящие из хозяйств, где туберкулез выявлен у других коз.

Для выявления специфических антител сыворотки крови коз к серии микобактериальных антигенов использовали хемилюминесцентный иммуноферментный анализ (ИФА) в мультиплексном формате, как описано ранее [7,9,10,11,12], в модификации, применительно к

исследованию коз. Вкратце суть постановки реакции сводилась к следующему. В лунки микропланшет иммобилизовали в точечном формате ранние секретлируемые белки микобактерий (ESAT-6, CFP-10, Rv3616c и другие), а также антигены их жизненного цикла и белки клеточной стенки (MPB70, MPB83, PPDb и другие), которые были использованы в виде рекомбинантных белков или синтетических пептидов [8]. Пробы сывороток крови в разведении 1:1000 вносили в лунки планшет в объеме 50 мкл, инкубировали в течение 90 мин, с последующей промывкой и внесением 50 мкл детектирующих антител, меченных пероксидазой хрена. После инкубации в течение 30 мин лунки планшет промывали, вносили 50 мкл хемилюминесцентного субстрата и проводили считку реакции в ридере для мультиплексного иммуноанализа. Результаты выражали в относительных единицах света (RLU).

Дополнительно использовали набор «LIONEX ANIMAL TB Rapid test», который является скрининг-тестом на мембранной основе для ускоренного обнаружения антител к *M.bovis* в сыворотке крови животных. Одну каплю образца вносили в лунку для проб тест-кассеты, затем добавляли три капли буферного раствора. Через 20 мин проводили учет реакции.

Для статистической обработки использовали программное обеспечение «Minitab version 15», где рассчитывали каппа-коэффициент согласованности для сравниваемых тестов.

Результаты исследований. Выявление специфических антител мультиплексным иммуноанализом. Антитела к микобактериальным антигенам, указанным выше, обнаруживались у животных с подтвержденным диагнозом на туберкулез, причем у 50% исследованных животных высокий уровень антител выявлялся и при разведении сыворотки крови 1:128000. Наибольший уровень антител обнаружен к антигенам MPB70 и MPB83.

У 120 коз из благополучных хозяйств антитела к исследуемым антигенам не выявлялись, что указывает на отсутствие кросс-реакций при использовании мультиплексного иммуноанализа (специфичность теста составляет 100,0%). Согласно анамнестическим данным все эти животные реагировали отрицательно в кожной туберкулиновой реакции. Пробы сыворотки крови этой группы исследовали также латеральной поточной иммунохроматографией «LIONEX ANIMAL TB Rapid test», причем антитела к иммобилизованным на мембране в зоне «Т» двум специфическим рекомбинантным антигенам *M.bovis* (тест линии 1 и 2) и высокоочищенному антигену клеточной стенки (тест линия 3) не выявлялись. 31 животное из этой группы было исследовано гамма-интерферон тестом на туберкулез, отрицательные результаты получены во всех случаях.

Результаты показали, что 24 из 28 инфицированных коз (85,7%), у которых была выделена *M.caprae*, реагировали положительно в мультиплексном ИФА. Диагностически значимые специфические антитела были выявлены у 177 из 180 положительно реагировавших на туберкулин коз (98,3%). 61 животное этой группы было исследовано гамма-интерферон тестом, все с положительным результатом. Суммарная чувствительность мультиплексного ИФА для группы животных с подтвержденным диагнозом на туберкулез составила 96,6%.

Исследованию подлежали дополнительно 286 коз из неблагополучных хозяйств, но реагирующих отрицательно на туберкулин. Специфические антитела к микобактериальным антигенам были выявлены у 9 животных. К тому же 7 из них реагировали положительно и при постановке гамма-интерферон теста. Вероятнее всего, что эти 9 коз были ложноотрицательными в кожной аллергической реакции на туберкулин.

Статистическая согласованность тестов. Каппа-коэффициент согласованности рассчитывали для трех сравниваемых тестов (кожная туберкулиновая реакция, гамма-интерферон тест и мультиплексный ИФА). Данные ко всем трем тестам получены на 299 животных. Коэффициент согласованности для кожной реакции и гамма-интерферон теста составил 0,957, кожной реакции и мультиплексного ИФА – 0,963, а гамма-интерферон теста и мультиплексного ИФА – 0,973. Высокие показатели каппа-коэффициента указывают, что все три теста имеют высокую степень согласованности.

Обобщение результатов исследований. При туберкулезной инфекции основным иммунным ответом является клеточный. На этом принципе разработано несколько тестов *in vitro*, в том числе и гамма-интерферон тест. Широко используется вариант *in vivo* – регламентированная для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота и коз кожная аллергическая реакция на туберкулин. Несмотря на высокую специфичность, чувствительность этого метода колеблется от 38,3% до 95,0% [15]. Применение данного теста на козах сталкивается с проблемами точности исполнения внутрикожной инъекции туберкулина, особенно, когда речь идет о молодняке с тонкой кожей (толщина составляет менее 2мм).

Серологические тесты также могут быть использованы как альтернативный подход в диагностике туберкулеза наряду с внутрикожными пробами или *in vitro* тестами оценки специфического клеточного иммунного ответа. Имеются сообщения о высокой эффективности использования диагностических тестов, основанных на выявлении антител в сыворотке крови коз к антигену MPV70, в том числе и для дифференциации от паратуберкулеза [13]. К тому же, вирулентные штаммы *M.bovis* продуцируют секретлируемые антигены ESAT-6 и CFP-10, чего не наблюдается у вакцинных штаммов БЦЖ [4], что является положительным моментом применения этих антигенов для дифференциальной диагностики. Тем не менее, комплексный характер иммунного ответа при туберкулезе требует разработки тест-систем с использованием нескольких антигенов, выявляемые антитела к которым позволят обнаруживать полный спектр заболевания – от ранних стадий до манифестных. Использование мультиантигенного подхода позволит выявлять туберкулез, этиологическим фактором которого могут быть различные штаммы возбудителей, профили распознавания антигенов которых могут различаться.

Рассматриваемый в данной статье мультиплексный ИФА, который прошел испытания на разных видах животных [7,10,11,12], вполне может быть адаптирован для диагностики туберкулеза коз, или же для поиска пула диагностически эффективных антигенов. Дополнительная чувствительность достигается благодаря конструкции и динамическому

диапазону мультиплексной тест-системы, позволяющей точно обнаруживать самого различного характера циркулирующие антитела в сыворотке крови инфицированных животных. Нашими исследованиями показана высокая специфичность (100,0%) и чувствительность (96,6%) данного метода при применении на козах, что доказывает высокую эффективность серологической диагностики туберкулеза у этого вида. Преимуществом является и тот факт, что антитела выявляются и у животных, реагировавших ложноотрицательно в кожной аллергической реакции на туберкулин, что показано в нашем эксперименте.

Другой серологический метод, латеральной поточной иммунохроматографии, также представляет интерес, как экспресс-метод диагностики туберкулеза. Иммунизация серии высокоочищенных антигенов на мембрану тест-кассеты позиционирует этот тест как высокочувствительный. В наших опытах на козах мы проверили только специфичность данной тест-системы, которая составила 100%. Для установления уровня чувствительности необходимы дополнительные исследования.

Выводы:

1. Серологическая диагностика туберкулеза коз вполне может стать альтернативным, дополняющим средством борьбы с этим заболеванием наряду со стандартным методом кожной туберкулиновой пробы;

2. Возможность применения серодиагностики на молодых козлятах с тонкой кожей является преимуществом над туберкулинизацией.

3. Использование мультиантигенного подхода позволяет выявлять инфицированных животных на разных стадиях заболевания, в том числе ложноотрицательных по кожной аллергической реакции на туберкулин, повысить эффективность дифференциальной диагностики.

Литература:

1. Воронин, Б.А. Правовое регулирование ветеринарной деятельности: состояние, актуальные задачи / Б.А. Воронин, И.М. Донник // Аграрный вестник Урала. – 2015. – №1(131). – С. 91-94.

2. Кисленко, В.Н. Распространение микобактерий туберкулеза на пастбищах неблагополучных по туберкулезу крупного рогатого скота ферм / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев // РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2016. – №1. – С. 65-71.

3. Колычев, Н.М. Экологические аспекты туберкулеза / Н.М. Колычев, В.Н. Кисленко // Ветеринария. – 2014. – №12. – С.3-7.

4. Леви, Д.Т. Использование аллергенов туберкулезных для исследования антигенов вирулентности у штаммов *Mycobacterium bovis* / Д.Т. Леви, Ю.И. Обухов, М.Л. Рухамина, Н.В. Александрова, А.В. Наконечная // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2013. – №1(45). – С. 23-27.

5. Сошникова, Е.М. Динамика биохимических показателей крови при экспериментальном заражении коз *M.bovis* / Е.М. Сошникова, Г.И. Устинова, А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, В.И. Строгонов // Ветеринария и кормление. – 2014. – №5. – С. 75-77.
6. Чысыма, Р.Б. Проблемы ветеринарного благополучия местных локальных пород в Республике Тыва / Р.Б. Чысыма, Е.Ю. Макарова // Инновационная наука. – 2015. – №12-3. – С. 71-74.
7. Шуралев, Э.А. Выявление специфических антител у вапиту при туберкулезе / Э.А. Шуралев, М.Н. Мукминов, К. Велан, Дж. Кларк // Ветеринария. – 2013. – №8. – С. 54-57.
8. 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.
9. Шуралев, Э.А. Мультиплексная иммуноферментная хемилюминесцентная тест-платформа для индикации биопатогенов в организмах / Э.А. Шуралев // Ж. Народное хозяйство. Вопросы инновационного развития. – 2012. – № 1. – С. 258-261.
10. Шуралев, Э.А. 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.
11. Шуралев, Э.А. Предварительные результаты изучения антителогенеза у барсуков при экспериментальном туберкулезе / Э.А. Шуралев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – Т.221. – С.261-266.
12. Шуралев, Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у альпак / Э.А. Шуралев // Ветеринарный врач. – 2012. – №5. – С. 30-33.
13. Acosta, B. ELISA for anti-MPB70: an option for diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* / B. Acosta, F. Real, L. León, et al. // Aust Vet J. – 2000. – V.78(6). – P. 423-424.
14. Álvarez, J. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection / J. Álvarez, L. de Juan, J. Bezos, et al. // Vet. Microbiol. – 2008. – V.128(1-2). – P. 72–80.
15. Cousins, D.V. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species / D.V. Cousins, N. Florisson // Rev Sci Tech. – 2005. – V.24 (3). – P. 1039-1059.