

УДК 619:599.735.51:616-002.5:616-097

Влияние антикоагулянтов и активаторов свертывания крови на результаты серологических реакций

Шуралев Эдуард Аркадьевич^{1,2,3}, Александрова Наталья Михайловна^{1,2}, Мукминов Малик Нилович^{1,3}, Фаизов Тагир Хадиевич², Хаммадов Наиль Ильдарович², Осянин Константин Анатольевич², Валеева Анна Рафкатовна³, Казарян Геворг Гарикович⁴

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,

²ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,

³Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,

⁴ООО «Биоконтроль ГР» (г. Казань)

Образцы сыворотки и плазмы крови крупного рогатого скота исследовали иммуноферментным и иммунохроматографическим методами. Установлено, что цитрат и гепарин ингибируют специфическую реакцию антиген-антитело. Для серологических исследований при туберкулезе рекомендуется проводить отбор проб крови в пробирки с активатором свертывания (кремнеземом) или антикоагулянтом ЭДТА. **Ключевые слова:** вакутейнер, антигены, антитела, *Mycobacterium bovis*, ИФА, иммунохроматография, туберкулез.

Effect of anticoagulants and blood clotting activators on serological test results

E.A. Shuralev^{1,2,3}, N.M. Aleksandrova^{1,2}, M.N. Mukminov^{1,3}, T.Kh. Faizov², N.I. Khammadvov², K.A. Osyenin², A.R. Valeeva³, G.G. Kazarian⁴

¹Kazan Federal University,

²Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety,

³Kazan State Medical Academy,

⁴Biocontrol GR Ltd. (Kazan)

Cattle blood serum and plasma samples were tested by enzyme-linked and immunochromatographic methods. It was found that citrate and heparin inhibit the specific antigen-antibody reaction. It is recommended that for serological tests of tuberculosis, the blood samples should be taken into the tubes with silica coagulation activator or EDTA anticoagulant. **Key words:** vacutainer, antigens, antibodies, *Mycobacterium bovis*, ELISA, immunochromatography, tuberculosis.

Несмотря на успехи в совершенствовании кожной туберкулиновой пробы [4, 7, 8] и ПЦР-индикации *Mycobacterium bovis* [6, 22], актуальной проблемой в борьбе с туберкулезом остается прижизненная лабораторная диагностика данного заболевания у крупного рогатого скота (КРС) [14], а также вовлеченных в эпизоотический процесс других видов животных, таких как козы [3, 21, 23], собаки и кошки [2], кабаны [17], альпаки [15], северный олень [19], вапити [18], барсуки [20] и другие.

В настоящее время успешно ведутся научные исследования в области разработки серологических тестов для дифференциальной диагностики туберкулеза [9]. Выявлены диагностически значимые микобактериальные антигены, такие как MPB70, MPB83, ESAT-6, CFP-10 и другие [16, 25]. Определено, что фракции низкомолекулярных нативных антигенов *M.tuberculosis* молекулярной массой 6,5-30 кДа имеют высокую

диагностическую значимость [12]. Показана эффективность химерного рекомбинантного антигена МРТ83(115220)-МРТ63 для ИФА-диагностики КРС при исследовании сывороток крови [10]. Оптимально подобранная панель антигенов позволяет выявлять ложноотрицательных в туберкулиновой пробе КРС [24], дифференцировать вакцинированных и инфицированных животных [26].

Особое место в диагностике занимают экспресс-тесты. Чувствительность 46,15% и специфичность 67,65% теста для выявления специфических антител при туберкулезе была установлена для иммунохроматографического анализа (ИХА) с применением наночастиц (гексацианферрата (II) и железа (III)) [11]. Основанный на методе ИХА «Rapid Bovine TB Ab» тест показал высокую эффективность как экспресс-тест для скрининговых исследований КРС [5].

Однако на результаты реакций антиген-антитело влияют многие внешние факторы, а также клиническая форма и вариант течения инфекционного процесса [13]. Установлено подавление В-звена иммунной системы, с последующим угнетением антителогенеза, при интоксикации кадмием [1]. Но особое внимание необходимо уделять способу отбора проб, их хранению и транспортировке. Для отбора проб крови в настоящее время широко используются вакутейнеры разных производителей, в которых уже присутствуют в необходимых концентрациях реагенты-ускорители свертывания крови (например, кремнезем) или же антикоагулянты, такие как гепарин лития, цитрат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и другие. В статьях медицинской тематики авторы указывают, как проводился отбор проб и какие пробирки для взятия крови при этом использовались. В большинстве же статей ветеринарной тематики эта информация зачастую упускается.

Цель данной работы – оценить влияние антикоагулянтов и активаторов свертывания, используемых в вакуумных пробирках для отбора проб крови, на результаты серологических исследований КРС при туберкулезе.

Материалы и методы. Отбор проб крови КРС проводили из неблагополучного (n=20) и благополучного (n=13) по туберкулезу хозяйств. Для получения сыворотки и плазмы образцы проб крови отбирали в пробирки BD Vacutainer (таблица 1). Сыворотку и плазму крови выделяли общепринятыми методами.

Таблица 1. Типы пробирок, использованных для взятия образцов проб крови крупного рогатого скота в данном исследовании

| Название | Объем крови, мл | Реагент | Цвет крышки |
|---|-----------------|---|-------------|
| Пробирка для сыворотки | 4,0 | Активатор свертывания (кремнезем) распылен на стенки пробирки | Красный |
| Пробирка с разделительным гелем для сыворотки | 5,0 | Разделительный гель на основе акрила, активатор свертывания (кремнезем) распылен на стенки пробирки | Желтый |
| Пробирка гепарином | 4,0 | Гепарин лития (17 МЕ/мл) распылен на стенки пробирки | Зеленый |
| Пробирка цитратом | 4,5 | Буферный раствор цитрата натрия 0,129М, 3,8% (соотношение кровь:цитрат 9:1) | Голубой |
| Пробирка с ЭДТА | 4,0 | К3 ЭДТА распылен на стенки пробирки | Сиреневый |

Образцы сыворотки и плазмы крови, полученные в пробирки с выше указанными реагентами, исследовали иммуноферментным (ИФА) и иммунохроматографическим

(ИХА) методами. Антигеном для ИФА (тест, разрабатываемый ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») служил синтетический пептид иммуногенного эпитопа белка МРВ70 [16], который был иммобилизован на поверхности лунок полистироловой планшеты (Corning). Образцы в разведении 1:100 инкубировали в течение 60 мин, с последующим внесением кроличьих антител против IgG КРС, меченных пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich), и визуализацией субстратом ТМБ. При чтке реакции оценивался уровень антител в ОД. При постановке ИХА использовали двухступенчатый тест для выявления антител против антигенов *M. bovis* (экспресс-тест, разрабатываемый ООО «Биоконтроль ГР», Казань), основанный на латеральной поточной иммунохроматографии, где два специфических рекомбинантных антигена и один высокоочищенный антиген клеточной стенки иммобилизованы на мембране. Визуализация реакции происходит за счет меченных коллоидным золотом антивидовых антител. Результаты оценивали по образованию характерных пурпурных полос в зоне антигенов.

При сравнительном анализе оценивался уровень антител, выявляемых в ИФА, и интенсивность окрашивания полосы при постановке ИХА.

Результаты исследований и обсуждение. Показания четки реакции ИФА с образцами проб сыворотки крови 13 животных из благополучных хозяйств, выделенных из пробирок с активатором свертывания (кремнезем), улавливались в диапазоне 0,059-0,307 ОД, что интерпретируется как отрицательный результат. При исследовании образцов проб сыворотки и плазмы, выделенных из других типов пробирок, выраженного эффекта на результаты и их интерпретацию не установлено. Диапазон показаний в этой группе слегка расширился до 0,020-0,354 ОД, что статистически значимым различием не является.

Аналогичные результаты получены и при использовании ИХА. Во всех 13 случаях отмечалось отсутствие полосы, указывающей на наличие специфических антител к микобактериальным антигенам в исследуемых образцах проб.

При исследовании 20 образцов сыворотки крови КРС из неблагополучных по туберкулезу хозяйств методом ИФА, антитела к синтетическому пептиду МРВ70 выявлялись на высоком уровне (0,500-3,500 ОД) у 8 животных, у остальных – они были на низком уровне (0,360-0,500 ОД), но интерпретировались как положительные, так как были выше таковых, полученных при исследовании скота из благополучных хозяйств. Сравнительным анализом результатов ИФА установлено, что у 16 из 20 животных уровень антител был выше на 8-202% (в среднем на 48%), когда исследованию подвергалась плазма крови из пробирки с ЭДТА ($p < 0,05$). Вероятно, это связано блокировкой ингибирующих реакции антиген-антитело компонентов крови, что в данном случае является положительным моментом.

Негативный эффект наблюдался при использовании других типов реагентов при взятии образцов крови. Менее всего он был выражен при использовании пробирок с разделительным гелем для сыворотки – уровень антител в ИФА у 9 животных из 20 был на 8-17% ниже, чем при исследовании сыворотки, выделенной из пробирок без геля. Показания четки реакции ИФА с плазмой крови, выделенной из пробирок с цитратом натрия и гепарином лития, были ниже, чем с сывороткой, в среднем на 27% и 39% ($p < 0,05$), соответственно, достигая максимальных значений снижения показателей на 86-97%. Это привело к ошибочной интерпретации положительных результатов, как отрицательных или сомнительных у 8 животных из 20, что влечет за собой снижение чувствительности теста на 40%.

Чувствительность экспресс-теста на основе ИХА также показала зависимость от способа получения исследуемого образца (рис.1). Наиболее выраженные полосы, указывающие на наличие специфических антител к антигенам *M. bovis*, отмечались при исследовании образцов плазмы крови КРС из неблагополучного по туберкулезу хозяйства, выделенной из пробирок с ЭДТА. Ингибирование визуализации результата тестирования

отмечалось при исследовании образцов проб плазмы, выделенной из пробирок с гепарином лития, у 30%, а из пробирок с цитратом натрия – у 45% животных.

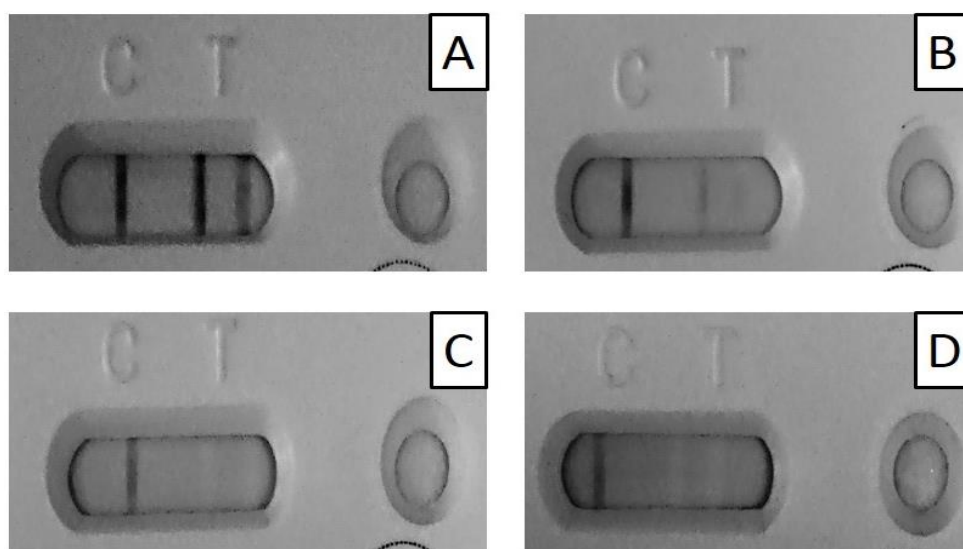


Рис. 1. Результаты иммунохроматографического анализа на выявление специфических антител к антигенам *M.bovis*: А – плазма (пробирка с ЭДТА), В – сыворотка (пробирка с кремнеземом), С – плазма (пробирка с цитратом), D – плазма (пробирка с гепарином).

Заключение. Проведенные экспериментальные исследования показали, что в зависимости от реагентов, используемых в качестве антикоагулянтов или активаторов свертывания при отборе проб крови, результаты серологических реакций достоверно различаются. В качестве образца пробы для иммуноферментного и иммунохроматографического анализов при туберкулезе рекомендуется использовать сыворотку и/или плазму, выделенную из пробирок для взятия крови с активатором свертывания (кремнеземом) или антикоагулянтом ЭДТА. Плазма крови, выделенная из пробирок, содержащих цитрат или гепарин, оказались не пригодными для указанных тестов, в виду того, что эти реагенты ингибируют специфическую реакцию антиген-антитело.

Статья подготовлена в рамках выполнения Государственного задания № 11.Д58.0 Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

Литература

1. Валеева А.Р. Влияние интоксикации кадмием на антителогенез кроликов при экспериментальном инфицировании *Mycobacterium bovis*. Ветеринарный врач. 2016; 3: 48 – 55.
2. Калмыков В.М., Найманов А.Х., Калмыкова М.С. Проблемы диагностики туберкулеза собак и кошек. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016; 12: 67 – 75.
3. Калмыков В.М., Найманов А.Х., Калмыкова М.С. Туберкулез коз и особенности его диагностики. Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017; 3: 30 – 38.
4. Макаров Ю.А., Горковенко Н.Е. Выявление крупного рогатого скота со скрытым течением туберкулезной инфекции. Ветеринария Кубани. 2015; 6: 4 – 5.
5. Мингалеев Д.Н., Равилов Р.Х., Садыков Н.И., Дсани Естер. Использование экспресс-теста Bovine TB для проведения скрининговых исследований на туберкулез крупного рогатого скота. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2016; 225(1): 50 – 52.
6. Найманов А.Х., Вангели Е.П., Толстенко Н.Г., Калмыкова М.С. ПЦР на современном этапе борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота. Ветеринария. 2016; 2: 20 – 23.
7. Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Вангели Е.П. и др. Основные проблемы и пути совершенствования

- диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Ветеринария и кормление. 2014; 2: 6 – 9.
8. Найманов А.Х., Устинова Г.И., Толстенко Н.Г. и др. Совершенствование симультанной туберкулиновой пробы для дифференциации неспецифических реакций у КРС. Ветеринария и кормление. 2016; 1: 11 – 13.
 9. Нургазиев Р.З., Елекеев Т.А., Сырым Н.С. и др. Сравнительная оценка лабораторных методов диагностики туберкулеза животных. Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. 2016; 1(37): 110 – 117.
 10. Сиромолот А.А., Редчук Т.А., Солодянкин А.С. и др. Испытание экспериментальной тест-системы для специфической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. *Biotechnologia Acta*. 2016; 9(4): 14 – 18.
 11. Скопинская С.Н., Ярков С.П., Храмов Е.Н. Создание диагностических тест-систем на основе иммунохроматографии и наночастиц гексацианферрата (II) железа (III). Медицина экстремальных ситуаций. 2013; 2(44): 76 – 85.
 12. Цибулькин А.П., Хаертынова И.М., Уразов Н.Г., Хаертынов К.С. Скрининг диагностического потенциала нативных белковых фракций *Mycobacterium tuberculosis* методом иммуноблоттинга. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61(2): 90 – 102.
 13. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Новицкий В.В. и др. Факторы дисрегуляции иммунного ответа (на различных этапах его реализации) при туберкулезе легких. Бюллетень сибирской медицины. 2016; 15(5): 166 – 177.
 14. Шуралев Э.А., Ндаишимийе Э.В., Мукминов М.Н. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2012; 211:202 – 206.
 15. Шуралев Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у альпак. Ветеринарный врач. 2012; 5:30 – 33.
 16. Шуралев Э.А. Микобактериальные антигены: синтетические пептиды и рекомбинантные белки. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2013; 216; 403 – 407.
 17. Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Валеева А.Р. и др. Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов. Ветеринария. 2013; 2: 25 – 28.
 18. Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Велан К., Кларк Дж. Выявление специфических антител у вапиту при туберкулезе. Ветеринария. 2013; 8: 54 – 57.
 19. Шуралев Э.А. Образование антител у северного оленя, инфицированного *Mycobacterium bovis*. Ветеринария. 2016; 9: 18 – 20.
 20. Шуралев Э.А. Предварительные результаты изучения антителигенеза у барсуков при экспериментальном туберкулезе. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2015; 221:261 – 266.
 21. Шуралев Э.А. Серологическая диагностика туберкулеза коз и ее преимущества. В сборнике: Современные тенденции научного обеспечения в развитии АПК: фундаментальные и прикладные исследования: Мат. науч.-практ. конф. 2016: 311 – 316.
 22. Янченко Т.А., Галлер Л.А. Комбинированный метод ранней диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Вестник ветеринарии. 2014; 3(70): 23 – 26.
 23. Shuralev E., Quinn P., Doyle M. et al. Application of the Enfer chemiluminescent multiplex ELISA system for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in goats. *Veterinary Microbiology*. 2012; 154 (3-4): 292 – 297.
 24. Whelan C., Shuralev E., Kwok H.F. et al. 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. *J. of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011; 23(3): 499 – 503.
 25. Whelan C., Shuralev E., O’Keeffe G. et al. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2008; 15(2): 1834 – 1838.
 26. Whelan C., Whelan A.O., Shuralev E. et al. 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. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2010; 17(5): 813 – 817.