

Мультиплексный ИФА с хемилюминесцентной меткой для диагностики туберкулеза у кабанов

Эдуард Аркадьевич Шуралев, кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель¹,

Малик Нилович Мукминов, доктор биологических наук, профессор¹,

Анна Рафкатовна Валева, аспирант¹,

Алексей Александрович Васин, студент¹,

Аркадий Васильевич Иванов, доктор биологических наук, член-корреспондент РАСХН, директор²,

Clare Whelan, PhD биологических наук, заведующий лабораторией³

¹ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.,

²ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», 420075, Казань, Научный городок-2,

³Enfer Scientific, Unit T, M7 Business Park, Newhall, Naas, Co. Kildare, Ireland.

Резюме. Используя Enfer мультиплексную тест-систему, была проведена оценка специфичности микобактериальных антигенов. Статистически значимые различия между результатами групп инфицированных и интактных кабанов были получены с большинством исследованных антигенов.

Ключевые слова: *Mycobacterium bovis*, кабан, микобактериальные антигены, мультиплексная тест-система, специфичность.

Assessment of antigen specificity for diagnostics of tuberculosis in wild boars

Eduard A. Shuralev, Malik N. Mukminov, Anna R. Valeeva, Aleksey A. Vasin, Arkadiy V. Ivanov, Clare Whelan

Summary. The specificity of mycobacterial antigens were tested using Enfer multiplex test system. The statistically significant differences between results of infected and non-infected groups of wild boars were obtained with a most of antigens being tested.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, wild boar, mycobacterial antigens, multiplex test system, specificity.

Проблема туберкулеза, вызываемого микобактериями *Mycobacterium bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, остается серьезной проблемой для многих стран мира. В современных экологических условиях в распространении и носительстве возбудителей этого заболевания участвуют многие виды сельскохозяйственных и диких животных, а проблема имеет глобальный медико-ветеринарный характер (Ощепков и соавт., 2012; Овдиенко и соавт., 2009; Nugent G., 2011).

Дикий кабан является природным носителем микобактерий туберкулеза и источником заражения как диких, так и сельскохозяйственных животных. Своевременное выявление резервуаров возбудителя с применением противоэпизоотических мер является основополагающим мероприятием в борьбе с этим заболеванием. Научные исследования в области прижизненной диагностики и вакцинопрофилактики туберкулеза у кабанов ведутся учеными разных стран (Aurtenetxe *et al.*, 2008; Boadella *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 2011; Lyashchenko *et al.*, 2008; Gortazar *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2010).

В нашей работе мы представляем данные специфичности ряда микобактериальных антигенов, полученные в результате исследования инфицированных и интактных популяций кабанов, обитающих в Испании и Республике Татарстан.

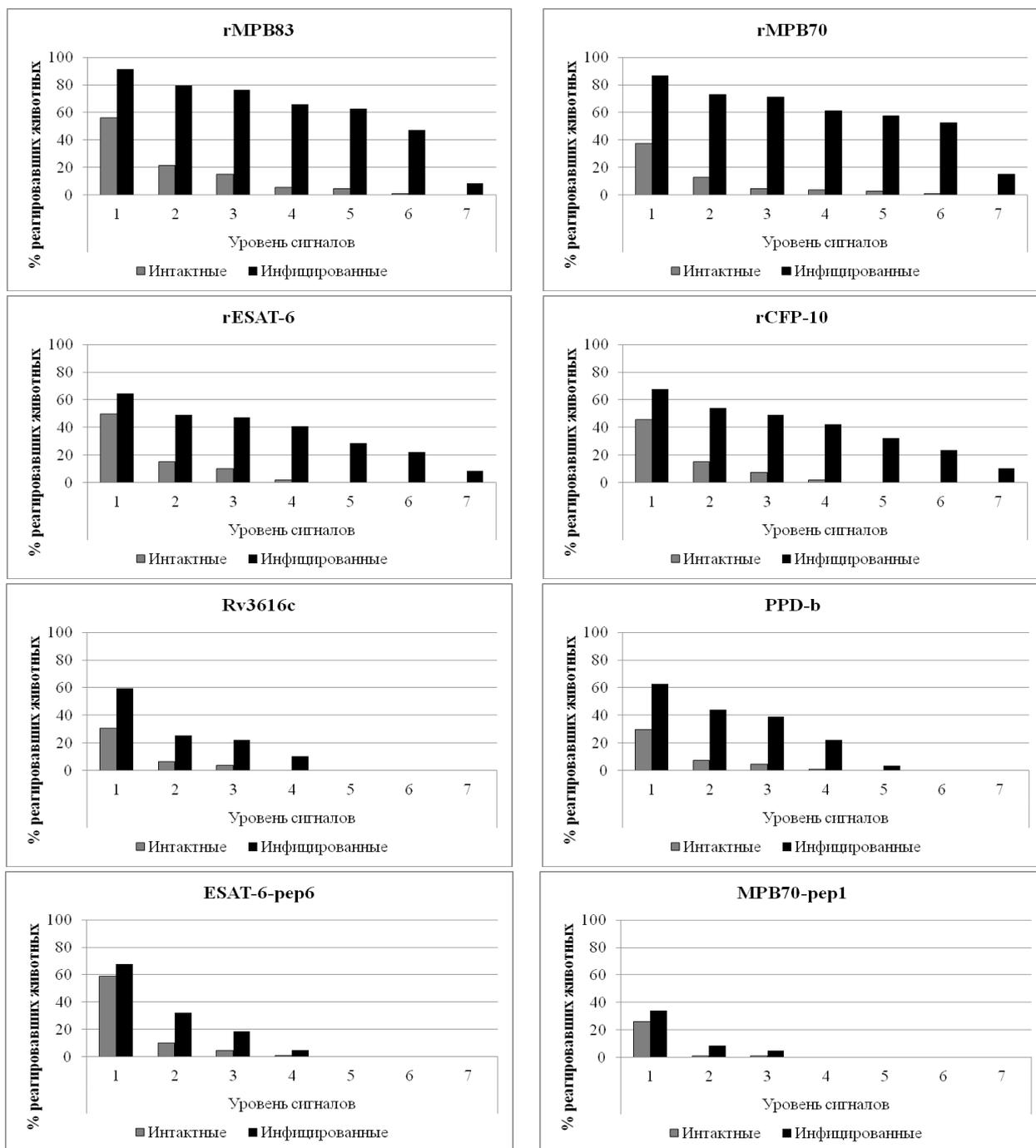
Материалы и методы. Были исследованы рекомбинантные антигены: rMPB83, rMPB70, rESAT-6, rCFP-10 и rRv3616c; комбинированный антиген PPD-b и синтетические пептиды MPB70-pep1 и ESAT-6-pep6. Рекомбинантные антигены были получены из биотехнологической компании «Fusion Antibodies», г. Белфаст, Северная Ирландия. PPD-b для иммуоферментного анализа был синтезирован и предоставлен учеными из группы исследования туберкулеза Агентства ветеринарных лабораторий, г. Уэйбридж, Соединенное Королевство. Пептиды были синтезированы в компании Genosphere Biotech, Франция.

В работе использовали сыворотки крови кабанов двух популяций – из Южных районов Испании и Буинского, Верхне-Услонского и Камско-Устьинского районов Республики Татарстан. Исследовали кабанов с охотничьих хозяйств испанской популяции – 107 интактных и 59 животных, с подтвержденным диагнозом туберкулеза путем выделения культуры *M. bovis*, и 49 животных с благополучных по туберкулезу территорий Республики Татарстан. Кровь у животных отбирали в течение 4 часов после отстрела, с последующим отделением сыворотки для серологических исследований. Методом ПЦР проводили идентификацию *M. bovis* в лимфатических узлах убитых животных для установления статуса заболевания.

Уровень антител к исследуемым антигенам определяли методом мультиплексного хемилюминесцентного иммуноанализа по описанной ранее методике (Whelan *et al.*, 2008) в модификации в научной лаборатории компании «Enfer Scientific», г. Нэйс, Ирландия. Сыворотки крови разводили в буферном растворе 1:250. 50 мкл разведенной пробы вносили в лунку микропланшета для мультиплекс-анализа, с последующей инкубацией в течение 90 мин. Планшеты промывали и в лунки вносили антивидовые антитела (Rabbit anti-pig IgG Peroxidase conjugate, Sigma), разведенные 1:40000 в объеме 50 мкл, с последующей инкубацией в течение 30 мин и промывкой. Затем добавляли субстрат и проводили считку реакции, как описано ранее (Whelan *et al.*, 2008). Сигналы учитывали в относительных световых единицах (RLU).

Статистический анализ результатов производили используя онлайн калькулятор GraphPad (<http://graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>). При этом учитывали 95%-ный доверительный интервал для разницы средних значений RLU в интактной и инфицированной группах животных и достоверность различия по значениям вероятности *p*.

Результаты исследований. У животных испанской популяции интактной и инфицированной групп антитела к исследованным антигенам микобактерий туберкулеза выявлялись на разных уровнях. При этом реакция с более низким уровнем сигналов улавливалась и в группе неинфицированных кабанов (рис.1).



* - Соответствие уровней сигналов см. в тексте публикации.

Рис. 1. Положительные реакции интактных и инфицированных кабанов к микобактериальным антигенам по уровню антител.

Уровни сигналов условно были разделены на 7: 1 – более 100 RLU, 2 – более 500 RLU, 3 – более 1000 RLU, 4 – более 5000 RLU, 5 – более 15000 RLU, 6 – более 30000 RLU, 7 – более 50000 RLU. Наибольшая активность установлена у антигенов rMPB83 и rMPB70, когда в группе инфицированных животных положительно реагировало > 50% кабанов с уровнем антител более 15000 и 30000 RLU, соответственно, в то время как в группе интактных животных сигналы на таких уровнях улавливались у < 5%. Достоверная разница между средними значениями двух групп указывает на высокую специфичность

этих и других рекомбинантных (rESAT-6, rCFP-10 и rRv3616c) и комбинированного (PPD-b) антигенов (табл. 1). Синтетические пептиды MPB70-pep1 и ESAT-6-pep6 показали низкую активность с максимальным уровнем антител, не превышающим 6000 RLU, а разница между группами была недостоверна.

Таблица 1. Различия уровня антител в инфицированной и интактной группах кабанов к микобактериальным антигенам.

	Антигены							
	rMPB83	rMPB70	rESAT-6	rCFP-10	rRv3616c	PPD-b	ESAT-6-pep6	MPB70-pep1
Разница средних значений RLU между группами	22360	24978	12705	13541	1062	2306	392	84
95% доверительный интервал разницы средних значений RLU	18466 – 26253	20572 – 29384	9102 – 16310	9765 – 17318	608 – 1516	1453 – 3159	-140 – 923	-29 – 196
Значение <i>p</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	> 0,1	> 0,1
Значение <i>t</i>	11,3	11,2	7,0	7,1	4,6	5,3	1,5	1,5
Результаты достоверны	да	да	да	да	да	да	нет	нет

Среди популяции кабанов Республики Татарстан ни одно животное не реагировало ни с одним антигеном с сигналами более 1000 RLU. У одного кабана антитела к rMPB83 выявлялись на уровне 545 RLU. С остальными антигенами реагировали на уровне 100 – 500 RLU, также как и в испанской популяции, 18 – 32% исследованных животных.

Обсуждение результатов. Проведенными исследованиями установлена диагностическая значимость рекомбинантных антигенов rMPB83, rMPB70, rESAT-6, rCFP-10 и rRv3616c и комбинированного антигена PPD-b для серологической индикации туберкулеза у кабанов. Достоверная разница средних значений уровня антител в инфицированной и интактной группах животных подтверждает их высокую специфичность. Результаты сопоставимы с полученными ранее данными на крупном рогатом скоте и козах (Whelan *et al.*, 2008; Shuralev *et al.*, 2012), при этом диагностическая значимость синтетических пептидов MPB70-pep1 и ESAT-6-pep6, показавших высокую активность на других видах животных, не подтвердилась исследованиями на кабанах.

Метод мультиплексного хемилюминесцентного иммуноанализа с использованием нескольких антигенов может быть адаптирован для диагностики туберкулеза у кабана. Дальнейшие исследования необходимы для установления чувствительности данной тест-системы и разработки диагностикума, который может быть применен для контроля распространения туберкулеза среди диких животных, являющихся резервуаром возбудителя *M. bovis* и источником заражения сельскохозяйственных видов.

Авторы выражают благодарность J. Clarke («Enfer Scientific», Ирландия), R. Juste, O. Aurtenetxe, M. Barral и J.M. Garrido (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-TECNALIA), Испания) за предоставленные пробы и помощь в проведении исследований.

Литература

- Овдиенко Н.П., Найманов А.Х., Толстенко Н.Г., Хруленко В.Н., Яременко Н.А., Рахманин П.П., Мельник Н.В., Крюков С.В., Боровой В.Н. Туберкулез как международная и национальная медико-ветеринарная проблема в современных условиях. // Ветеринарный врач. 2009. № 2. С. 14-17.
- Ощепков В.Г., Бордюг В.Ф., Кошечев Н.Н., Панкратова А.Д., Гардер А.Г. О роли диких, синантропных и мелких домашних животных в резервации и распространении микобактерий туберкулеза. // Достижения науки и техники АПК. 2012. № 2. С. 74-76.
- Aurtenetxe O., Barral M., Vicente J., de la Fuente J., Gortázar C., Juste R.A. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against *Mycobacterium bovis* in European wild boar. // BMC Vet Res. 2008. № 4. P. 43.
- Boadella M., Lyashchenko K., Greenwald R., Esfandiari J., Jaroso R., Carta T., Garrido J.M., Vicente J., de la Fuente J., Gortázar C. Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). // J Vet Diagn Invest. 2011. V. 23, № 1. P. 77-83.

Garrido J.M., Sevilla I.A., Beltrán-Beck B., Minguijón E., Ballesteros C., Galindo R.C., Boadella M., Lyashchenko K.P., Romero B., Geijo M.V., Ruiz-Fons F., Aranaz A., Juste R.A., Vicente J., de la Fuente J., Gortázar C. Protection against tuberculosis in Eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. // PLoS One. 2011. V. 6, № 9. e24905.

Gortazar C., Vicente J., Boadella M., Ballesteros C., Galindo R.C., Garrido J., Aranaz A., de la Fuente J. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. // Vet Microbiol. 2011. V. 151, № 1-2. P. 170-178.

Lyashchenko K.P., Greenwald R., Esfandiari J., Chambers M.A., Vicente J., Gortazar C., Santos N., Correia-Neves M., Buddle B.M., Jackson R., O'Brien D.J., Schmitt S., Palmer M.V., Delahay R.J., Waters W.R. Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. // Vet Microbiol. 2008. V. 132, № 3-4. P. 283-292.

Nugent G. Maintenance, spillover and spillback transmission of bovine tuberculosis in multi-host wildlife complexes: a New Zealand case study. // Vet Microbiol. 2011. V. 151, № 1-2. P. 34-42.

Santos N., Geraldes M., Afonso A., Almeida V., Correia-Neves M. Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. // PLoS One. 2010. V. 5, № 9. e12663.

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.

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.