

Т.А. РЕДЧУК¹, Н.В. КОРОТКЕВИЧ¹, А.А. КАБЕРНЮК¹,
Е.С. ОЛЕЙНИК¹, А.Ю. ЛАБЫНЦЕВ¹, С.И. РОМАНЮК¹,
Д.В. КОЛИБО¹, В.А. БУСОЛ², С.В. КОМИСАРЕНКО¹

¹ Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев

² Национальный университет биоресурсов
и природопользования Украины, Киев

E-mail: rtakyiv@gmail.com

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ *Mycobacterium* *bovis* ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА



*Определены уровни антител против рекомбинантных аналогов антигенов *Mycobacterium bovis* rMPV63 и rMPV83, а также против деривата туберкулина PPD в 94 образцах сывороток крови крупного рогатого скота. Предложена схема статистического анализа распределений уровня антител к исследованным антигенам с помощью аппроксимации совокупностью кривых Гаусса по алгоритму Левенберга-Маркуардта. Полученные результаты указывают на возможность использования наряду с традиционным антигеном PPD рекомбинантных антигенов MPV63 и MPV83 для создания тест-систем, применимых при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота на уровне стад.*

© Т.А. РЕДЧУК, Н.В. КОРОТКЕВИЧ, А.А. КАБЕРНЮК,
Е.С. ОЛЕЙНИК, А.Ю. ЛАБЫНЦЕВ, С.И. РОМАНЮК,
Д.В. КОЛИБО, В.А. БУСОЛ, С.В. КОМИСАРЕНКО, 2010

Введение. Туберкулез крупного рогатого скота (КРС) является не только проблемой для сельского хозяйства, поскольку наносит значительный экономический ущерб, но и представляет собой угрозу для здоровья людей: в первую очередь для работников агропромышленного комплекса и потребителей продукции животноводства. Факты инфицирования человека возбудителем этого заболевания (*Mycobacterium bovis*) отмечаются как в развивающихся [1], так и в развитых странах [2–5].

На протяжении многих лет в ветеринарной практике применяется кожная проба с использованием туберкулина, или PPD (purified protein derivate), – сложной смеси антигенов возбудителя туберкулеза. Этот метод наиболее распространен при диагностике туберкулеза в ряде стран, однако он не всегда позволяет получить адекватный результат из-за влияния большого количества факторов на иммунный ответ к введенному туберкулину. В частности, на интенсивность реакции может оказывать влияние предшествующий контакт с непатогенными микобактериями, физиологическое состояние организма и т.д. Кроме того, при туберкулезной инфекции зачастую развивается состояние анергии, которое является причиной ложно-отрицательных результатов кожной пробы [6].

Поэтому для диагностики туберкулеза, как правило, применяют комплексную оценку результатов нескольких диагностических методов. Кроме различных модификаций кожной туберкулиновой пробы, используют интерфероновый тест [7] и метод полимеразной цепной реакции для прямой детекции ДНК возбудителя [8]. Эти методы характеризуются достаточно высокой чувствительностью и специфичностью анализа, однако на практике их обычно используют только для подтверждения диагноза, поставленного с помощью более простых и доступных, а также менее дорогостоящих методик. Высокая себестоимость и необходимость использования для анализа сложного и дорогостоящего оборудования делает большинство современных и эффективных методов не пригодными для диагностики туберкулеза КРС на уровне стад. Поэтому задача разработки простых, недорогих и эффективных методов для диагностики туберкулеза остается актуальной, поскольку оздоровление поголовья КРС требует проведения непрерывного мониторинга

га состояний эпизоотологического благополучия стада.

В настоящее время наиболее активно развивается направление, связанное с применением для диагностики туберкулеза современных серологических методов (в первую очередь, иммуноферментного анализа (ИФА) [9] и иммунохроматографии [10]), позволяющих выявлять антитела против антигенов возбудителя. Для успешного применения этих методов важно использование тех антигенов микобактерий, которые являются наиболее иммуногенными и характерными только для патогенных штаммов *Mycobacterium bovis*, что позволяет дифференцировать их от вакцинных и сапрофитных штаммов. Показано, что применение ИФА с использованием высокоиммуногенных пептидов из ряда микобактериальных антигенов позволяет выявлять туберкулезную инфекцию до появления позитивной реакции в кожной пробе [11]. Кроме того, известно, что различные стадии протекания туберкулезной инфекции сопровождаются развитием иммунного ответа на разные антигены микобактерий [12]. Это делает возможным создание иммуноферментных тест-систем, которые позволяют не только диагностировать туберкулез, но и получать дополнительную информацию о стадии заболевания. Поэтому в настоящее время исследования многих лабораторий мира направлены на поиск наиболее перспективных антигенов микобактерий для создания диагностически эффективных антигенных смесей [13, 14].

Одним из новых подходов в диагностике инфекционных заболеваний КРС является анализ статистического распределения в стаде определенных с помощью ИФА уровней антител к антигенам возбудителя. Этот подход был успешно применен для постадной диагностики других инфекционных заболеваний КРС в условиях стада, например, вирусной диареи — болезни слизистых оболочек (ВД-БС). Он позволил детектировать стада с присутствующим в персистентном состоянии возбудителем [15]. В случае туберкулезной инфекции наличие персистирующего возбудителя является одним из основных препятствий на пути оздоровления стада. Поэтому анализ статистического распределения уровней антител к антигенам микобактерий может оказаться достаточно

эффективным методом диагностики туберкулеза КРС в стаде [16]. Кроме того, системный подход в оценке эпизоотологического статуса стада позволяет избежать методологической проблемы выбора контролей в связи с тем, что статус отдельного животного в данном случае не играет определяющей роли.

Ранее нами были получены рекомбинантные аналоги антигенов МРВ63 и МРВ83 *Mycobacterium bovis* (гМРВ63 и гМРВ83) [17], которые являются высокоиммуногенными и могут оказаться перспективными антигенами для новых диагностических тест-систем [18, 19]. В настоящей работе мы проанализировали возможность использования этих рекомбинантных антигенов для разработки метода постадной диагностики туберкулеза КРС, а также предложили схему анализа статистического распределения уровня антител к ним. Применение статистического анализа позволяет оценить эффективность использования для диагностики антигенов гМРВ63 и гМРВ83 в сравнении с традиционным антигеном РРД и сделать иммуноферментный тест более информативным для мониторинга стада.

Материалы и методы. При помощи ИФА исследовали 94 образца сывороток крови КРС, отобранных у животных с отрицательными результатами туберкулиновой кожной пробы, поскольку животные с положительными результатами этого теста постоянно выбраковываются из стада, а возможность выявления туберкулезной инфекции до появления позитивной реакции в кожной пробе является особенно актуальной задачей [11].

Получение антигенов микобактерий. Антигены микобактерий гМРВ63 и гМРВ83 клонировали, экспрессировали в клетках *E. coli* и выделяли согласно методам, описанным ранее [17]. Был также использован коммерческий препарат антигена РРД (аллерген туберкулезный очищенный жидкий, ЗАТ «БИОЛІК», Украина).

Определение уровней антител против антигенов микобактерий. Антитела против антигенов микобактерий выявляли с помощью непрямого ИФА по следующей методике. На каждом этапе все растворы вносили в объеме 100 мкл на лунку и инкубировали на протяжении 1 ч при 37 °С, после чего трижды промывали лунки дистиллированной водой. На пер-

вом этапе в 96-луночные плоскодонные планшеты вносили раствор антигена (5 мкг/мл) в PBS (0,8 % NaCl, 0,25 % KCl, 0,144 % Na₂HPO₄ и 0,024 % KH₂PO₄, pH 7,2). Затем после промывания вносили 1%-ный раствор сухого обезжиренного молока в PBS, далее добавляли сыворотки крови, разведенные 1:50 в ТФБ (PBS, содержащий 0,04 % Tween-20). Антитела к антигенам *M. bovis* проявляли конъюгатом антител козы против иммуноглобулинов коровы с пероксидазой («Sigma», США) в ТФБ. Далее в лунки планшета вносили 0,5 мг/мл раствора ортофенилендиамина, содержащего 0,013 % перекиси водорода.

Реакцию останавливали через 15 мин 2 М раствором серной кислоты в объеме 50 мкл без предварительной промывки. Измерение оптической плотности проводили на приборе MR 580, Microelisa Auto Reader («Bio-Tek», США) при длине волны 490 нм в двухлучевом режиме.

Статистическая обработка. Анализ нормальности распределения полученных данных был проведен согласно критериям Лиллиефорса [20] и Шапиро-Уилка [21]. С целью описания структуры выборки диаграмма статистического распределения была аппроксимирована двумя или более кривыми Гаусса с использованием алгоритма Левенберга-Маркуардта (Levenberg-Marquardt) [22]. Для корреляционного анализа рядов данных использован метод ранговой корреляции по Спирмену [23].

Результаты исследований и их обсуждение. Во всех образцах сывороток крови КРС с помощью непрямого ИФА были определены уровни антител против антигенов микобактерий гМРВ63 и гМРВ83, а также против РРД. Диаграмма статистических распределений, полученных при обработке данных ИФА, представлена на рис. 1.

Статистический анализ полученных нами распределений был проведен по следующей схеме. На первом этапе полученные данные ИФА были проанализированы с помощью стандартных методов описательной статистики [24]. На втором этапе диаграмму статистического распределения уровней антител против каждого антигена аппроксимировали двумя или более кривыми Гаусса для описания структуры

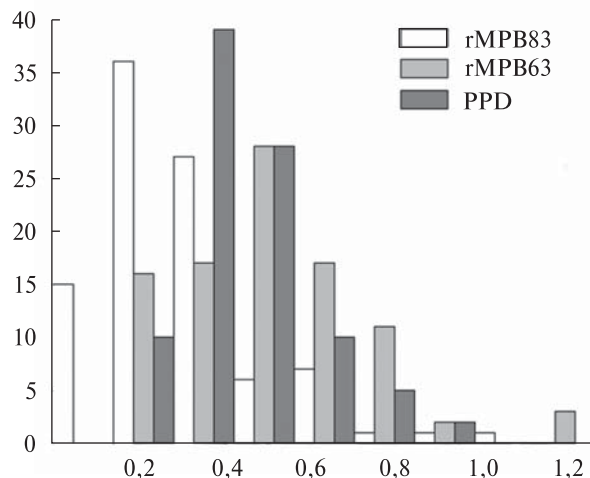


Рис. 1. Диаграмма статистических распределений в стаде уровней выявленных с помощью ИФА антител против антигенов микобактерий гМРВ63, гМРВ83 и РРД: по вертикали — количество образцов; по горизонтали — уровень антител, E₄₉₀

выборки. На третьем этапе был проведен корреляционный анализ полученных данных для антигенов гМРВ63, гМРВ83 и РРД.

Для проверки нормальности распределения полученных данных ИФА были использованы два наиболее распространенных критерия. Согласно критерию Лиллиефорса уровни антител к гМРВ63 распределены по нормальному закону, в то время как распределения уровней антител к гМРВ83 и РРД не являются нормальными. В то же время применение более строгого критерия Шапиро-Уилка показало, что полученные распределения не являются нормальными во всех трех случаях (табл. 1).

Отсутствие нормальности полученных распределений связано, вероятно, с тем, что изучаемые выборки являются комплексными, т.е. состоят из нескольких подвыборок, отличающихся по характеру распределения уровней антител. При визуальном анализе приведенных диаграмм можно заметить наличие положительной асимметрии во всех распределениях (правое «плечо» больше левого). Это свидетельствует о наличии в стаде группы животных с высоким уровнем антител против того или иного антигена микобактерий.

На сегодняшний день вопрос о причинах упомянутого явления остается дискуссионным. Одной из возможных причин может быть гене-

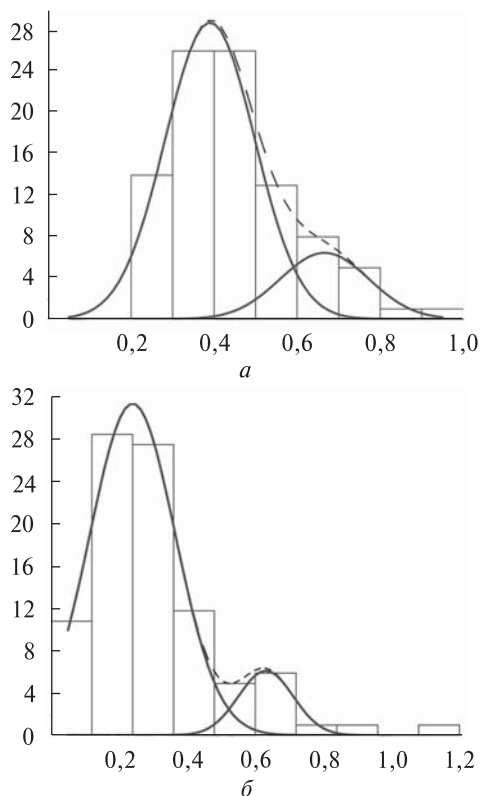


Рис. 2. Результаты аппроксимации диаграмм распределений уровней антител против антигенов PPD (а) и rMPV83 (б): по вертикали – количество образцов; по горизонтали – уровень антител, E₄₉₀

Таблица 1
Основные расчетные параметры проверки нормальности распределений уровней антител против антигенов микобактерий согласно критериям Лиллиефорса и Шапиро-Уилка

Антиген	Медиана	Квартиль		Lilliefors, <i>p</i>	<i>W</i>
		нижний	верхний		
PPD	0,418	0,326	0,524	< 0,05	0,939948
rMPV63	0,496	0,350	0,637	> 0,20	0,948261
rMPV83	0,262	0,176	0,374	< 0,01	0,869335

Примечания: 1. *p* – результаты проверки нормальности распределения согласно критерию Лиллиефорса; при уровне статистической значимости меньше принятой критической величины нулевая гипотеза про соответствие статистического распределения нормальному может быть отклонена; 2. *W* – результаты проверки нормальности распределения согласно критерию Шапиро-Уилка. Для всех указанных значений $W_p \ll 0,01$.

тическая гетерогенность популяции. Однако выявление подвыборок с высоким уровнем антител к антигенам микобактерий может также свидетельствовать о персистенции в стаде возбудителя и наличии сенсibilизированных животных или животных с активно протекающей туберкулезной инфекцией. Это предположение было подтверждено сравнительными исследованиями распределений уровней выявленных с помощью непрямого ИФА антител против PPD в инфицированных *Mycobacterium bovis* и неинфицированных стадах КРС [16].

Для анализа комплексных выборок некоторые исследователи предлагают использовать аппроксимацию диаграммы статистического распределения изучаемого параметра несколькими кривыми Гаусса. Например, распределение уровней интенсивности заболевания при шистозоматозе хорошо аппроксимировалось совокупностью трех кривых Гаусса, каждая из которых соответствовала подвыборке особей с определенным генотипом (гомозиготным доминантным, гомозиготным рецессивным и гетерозиготным), что подтверждало данные о значительном влиянии на восприимчивость к этому заболеванию единственного гена [25].

Для того чтобы описать структуру наших комплексных выборок, диаграммы статистических распределений уровней антител против каждого из антигенов микобактерий аппроксимировали двумя или более кривыми Гаусса, используя алгоритм Левенберга-Маркуардта. Качество приближения оценивали по величине достоверности аппроксимации (R^2). В табл. 2 представлены основные параметры проведенной аппроксимации.

Как видно из табл. 2, диаграммы распределений уровней антител против антигенов PPD, rMPV63 и rMPV83 могут быть представлены в виде нескольких перекрывающихся пиков, которые отображают подвыборки с различным характером распределения уровней антител.

Статистические распределения уровней антител к антигенам PPD и rMPV83 имеют сходную форму (рис. 2, а, б). В обоих случаях мы наблюдаем явление положительной асимметрии, что выражается характерным удлинением правого плеча диаграммы статистического распределения. Поскольку в исследова-

ниях других авторов была показана связь между наличием положительной асимметрии в распределении уровней антител к PPD и наличием туберкулезной инфекции в стаде [16], то можно предположить, что рекомбинантный антиген гМРВ83 также может быть использован для постадной диагностики туберкулеза КРС. Однако эти распределения существенно отличаются расстоянием между пиками: в случае распределения уровней антител к PPD (рис. 2, а) расстояние между центрами пиков приблизительно составляет 0,28, а в случае гМРВ83 (рис. 2, б) – 0,39 (согласно данным, приведенным в табл. 2). Это свидетельствует о том, что гМРВ83 может оказаться более эффективным антигеном диагностики туберкулеза КРС на уровне стад, чем PPD, поскольку в распределении уровней антител против гМРВ83 образуется зона перекрытия пиков гораздо меньшей площади и подвыборки могут быть разделены более четко. Такое отличие между антигенами, очевидно, объясняется их иммунохимическими особенностями: PPD является гетерогенной в антигенном отношении субстанцией, что обеспечивает высокую чувствительность тест-систем с его использованием (антитела против этого антигена не выявляются лишь у небольшого количества животных). Следует ожидать, что тест-системы с гМРВ83 в качестве антигена будут менее чувствительны, но, возможно, более специфичны, чем тест-системы с использованием PPD.

Представленная на рис. 3 диаграмма распределения уровней антител против антигена гМРВ63 является примером неоднозначно трактуемых данных. Результат аппроксимации этой диаграммы не может быть представлен в виде двух перекрывающихся пиков и, вероятно,

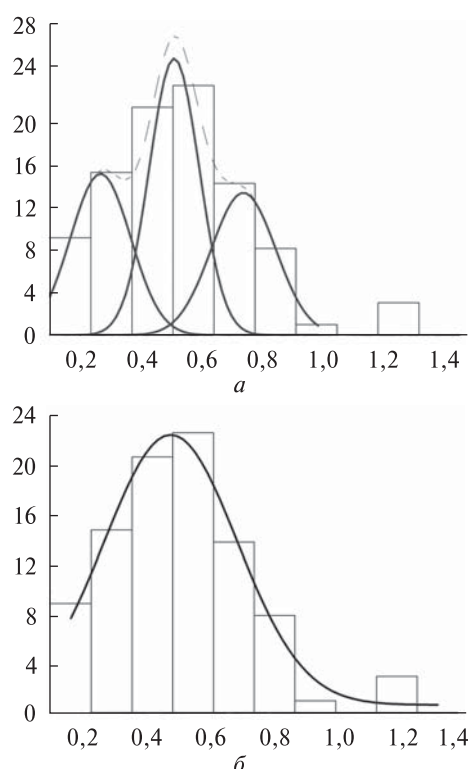


Рис. 3. Результаты двух вариантов аппроксимации диаграммы распределения уровней антител против антигена гМРВ63, состоящего из трех перекрывающихся пиков (а) или одного пика (б): по вертикали – количество образцов; по горизонтали – уровень антител, Е₄₉₀

не имеет смысла в случае представления в виде трех перекрывающихся пиков (рис. 3, а). Поэтому такую выборку целесообразно рассматривать как простую, а распределение уровней антител к антигену гМРВ63 считать нормальным (рис. 3, б).

В любом случае распределение уровней антител против антигена гМРВ63 (рис. 3) прин-

Таблица 2
Основные параметры аппроксимации диаграмм распределений уровней антител против антигенов микобактерий

Параметры пиков	PPD ($R^2=0,989$)		гМРВ63 ($R^2=0,986$)			гМРВ83 ($R^2=0,997$)	
	Пик 1	Пик 2	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 1	Пик 2
Центр	0,39018	0,66600	0,26064	0,49406	0,71343	0,23989	0,63126
Площадь	7,7811	1,7285	3,5555	5,0456	3,3584	10,038	1,2530
Ширина	0,21580	0,21340	0,19075	0,15790	0,20411	0,25052	0,16068
Высота	28,769	6,4625	14,872	25,496	13,128	31,969	6,2220

Таблица 3
Результаты корреляционного анализа уровней антител против изучаемых антигенов микобактерий по данным ИФА

Антигены микобактерий	Коэффициент Спирмена (R)	p
PPD и гМРВ63	0,60	<<0,01
PPD и гМРВ83	0,58	<<0,01
гМРВ63 и гМРВ83	0,57	<<0,01

ципально отличается по форме от распределения уровней антител против антигена гМРВ83 (рис. 2, б). Наблюдаемые отличия в характере этих распределений, очевидно, свидетельствуют о различных иммунобиологических свойствах упомянутых антигенов. Наличие трех животных с весьма высоким титром антител к этому антигену свидетельствует о необходимости ведения дальнейших исследований для определения значимости антигена гМРВ63 для иммунодиагностики туберкулеза КРС.

Для того чтобы выяснить, являются ли эти антигены взаимозаменяемыми в составе антигенных композиций для диагностических тест-систем, был проведен корреляционный анализ данных об уровнях антител против каждого антигена. Результаты анализа представлены в табл. 3.

Проведенные расчеты выявили наличие достоверной положительной корреляции между уровнями антител против всех антигенов (PPD, гМРВ63 гМРВ83), которые сравнивались попарно. Это говорит о том, что у значительной части животных уровень антител к любому из трех антигенов по всей видимости определяется общим уровнем гуморального иммунного ответа против микобактерий. Но поскольку во всех трех случаях коэффициент корреляции Спирмена (R) приблизительно равнялся 0,6 (т.е. выявленная корреляция между уровнями антител к изучаемым антигенам не была абсолютной), то антигены PPD, гМРВ63 и гМРВ83 отличаются в значительной степени по своим антигенным и иммунобиологическим свойствам и, вероятно, не могут заменить друг друга в составе антигенных диагностических композиций.

Секреторный антиген МРВ63 и ассоциированный с клеточной стенкой МРВ83 (гомолог белка МРВ70) являются белками с неизвестной

функцией, которые характерны для *Mycobacterium* spp., относящихся к туберкулезному комплексу [26, 27]. Известно, что белки МРВ63 и МРВ83 в значительной степени обладают иммуногенными и протективными свойствами, что делает их перспективными для создания противотуберкулезных вакцин [28, 29], а также тест-систем для диагностики туберкулеза [30].

Использование в серодиагностике туберкулеза нескольких антигенов с различными иммунобиологическими свойствами является на сегодняшний день одним из наиболее перспективных подходов, поскольку позволяет получить более полную информацию о состоянии организма [31]. Так как предложенные нами рекомбинантные антигены гМРВ63 и гМРВ83 отличаются по своим свойствам, то они, вероятно, могут быть включены в состав антигенных смесей иммуноферментных тест-систем для высокоинформативной индивидуальной диагностики туберкулеза КРС. Антиген МРВ83 экспрессируется *Mycobacterium bovis* БЦЖ лишь в небольших количествах, что делает его перспективным для разработки диагностикомов, позволяющих дифференцировать больных туберкулезом животных от здоровых, вакцинированных БЦЖ [30, 32]. Следует также отметить, что использование рекомбинантных белков микобактерий в качестве антигенов для диагностических тест-систем имеет неоспоримое преимущество, поскольку позволяет значительно уменьшить себестоимость тест-систем и сделать их производство более безопасным.

Применение предложенной схемы статистического анализа распределений уровней антител к антигенам микобактерий может быть полезным не только при подборе антигенов для антигенных коктейлей, но и непосредственно при проведении диагностики туберкулеза КРС на уровне стад. Предложенный подход позволяет рассчитать значение точки разделения подвыборок (так называемый «cut-off», который определяется по точке пересечения аппроксимирующих кривых Гаусса) и точно оценить количество животных, входящих в ту или иную подвыборку. Животные с высокими уровнями антител в дальнейшем могут быть дополнительно протестированы с помощью других методов индивидуальной диагностики.

Такой подход к диагностике туберкулеза должен обеспечивать минимальное количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Таким образом, предложенная схема статистического анализа распределений уровней антител к антигенам микобактерий может быть полезна для постадной диагностики туберкулеза КРС, а также для выбора антигенов микобактерий, перспективных в диагностическом отношении. Кроме того, можно использовать рекомбинантные антигены МРВ63 и МРВ83 наряду с традиционным антигеном PPD при создании тест-систем для диагностики туберкулеза КРС.

*T.A. Redchuk, N.V. Korotkevich, A.A. Kaberniuk,
O.S. Oliinyk, A.J. Labyntsev, S.I. Romaniuk,
D.V. Kolibo, V.O. Busol, S.V. Komisarenko*

STATISTICAL ANALYSIS OF DISTRIBUTION OF ANTIBODY LEVEL AGAINST *MYCOBACTERIUM BOVIS* ANTIGENS FOR BOVINE TUBERCULOSIS DIAGNOSTICS

Antibody responses to purified protein derivate PPD of tuberculin and to antigens МРВ63 and МРВ83 of *Mycobacterium bovis* were determined in bovine herd (94 adult animals). Statistical approach based on approximation by multiple Gaussians with Levenberg-Marquardt algorithm for analysis of antibody level distribution against antigens examined was provided. Our results confirm that indirect ELISA with recombinant МРВ83 and МРВ63 as well as conventional PPD could be used for test-systems development for detection of cow tuberculosis infection at the herd level.

*T.A. Редчук, Н.В. Короткевич, А.А. Кабернюк,
О.С. Олійник, А.Ю. Лабинцев, С.І. Романюк,
Д.В. Колибо, В.О. Бусол, С.В. Комісаренко*

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОЗПОДІЛУ РІВНЯ АНТИТІЛ ПРОТИ АНТИГЕНІВ *MYCOBACTERIUM BOVIS* ПРИ ДІАГНОСТИЦІ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Визначено рівні антитіл проти рекомбінантних аналогів антигенів *Mycobacterium bovis* гМРВ63 та гМРВ83, а також проти деривату туберкуліна PPD в 94 зразках сироваток крові великої рогатої худоби. Запропоновано схему статистичного аналізу розподілу рівня антитіл до досліджених антигенів за допомогою апроксимації сукупністю кривих Гаусса за алгоритмом Левенберга-Маркуардта. Наведені результати вказують на можливість використання поряд з традиційним антигеном PPD рекомбінантних антигенів МРВ63 та МРВ83 для створення тест-систем при діагностиці туберкульозу ВРХ на рівні стад.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F., de Kantor I., Meslin F.X.* Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries // *Emerg Infect Dis.* – 1998. – **4**, № 1. – P. 59–70.
2. *Gibson A.L., Hewinson G., Goodchild T., Watt B., Story A., Inwald J., Drobniewski F.A.* Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – **42**, № 1. – P. 431–434.
3. *Kubica T., Ruüsch-Gerdes S., Niemann S.* *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001 // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – **41**, № 7. – P. 3070–3077.
4. *Szewzyk R., Svenson S.B., Hoffner S.E., Bolske G., Wahlstrom H., Englund L., Engvall A., Kallenius G.* Molecular epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* infections in humans and animals in Sweden // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – **33**, № 12. – P. 3183–3185.
5. *Lari N., Rindi L., Bonanni D., Tortoli E., Garzelli C.* Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – **44**, № 11. – P. 4218–4221.
6. *Lepper A.W., Pearson C.W., Corner L.A.* Allergy to tuberculin in beef cattle // *Aust. Vet. J.* – 1977. – **53**, № 5. – P. 214–216.
7. *Jungersen G., Huda A., Hansen J.J., Lind P.* Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle // *Clin. Diagn. Immunol.* – 2002. – **9**, № 2. – P. 453–460.
8. *Vitale F., Capra G., Maxia L., Reale S., Vesco G., Caracappa S.* Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – **36**, № 4. – P. 1050–1055.
9. *Liu S., Guo S., Wang C., Shao M., Zhang X., Guo Y., Gong Q.* A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis // *Tuberculosis (Edinb.)* – 2007. – **87**, № 3. – P. 212–217.
10. *Chakraborty N., Bhattacharyya S., De C., Mukherjee A., Sarkar R.N., Banerjee D., Chakraborti S., Bhattacharyya S.K.* A rapid immunochromatographic assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in pulmonary samples from HIV seropositive patients and its comparison with conventional methods // *J. Microbiol. Meth.* – 2009. – **76**, № 1. – P. 12–17.
11. *Cockle P.J., Gordon S.V., Hewinson R.G., Vordermeier H.M.* Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle clinical and vaccine // *Immunology.* – 2006. – **13**, № 10. – P. 1119–1124.
12. *Davidow A., Kanaujia G.V., Shi L., Kaviar J., Guo X.D.,*

- Sung N., Kaplan G., Menzies D., Gennaro M.L. Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state // Infect. and Immun. – 2005. – 73, № 10. – P. 6846–6851.
13. Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Vallecillo A.J., Gutierrez-Pabello J.A., Suarez-Güemes F., McNair J., Cataldi A., Espitia C., Andersen P., Pollock J.M. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity // J. Clin. Microbiol. – 2006. – 44, № 12. – P. 4326–4335.
 14. Shin A.R., Shin S.J., Lee K.S., Eom S.H., Lee S.S., Lee B.S., Lee J.S., Cho S.N., Kim H.J. Improved sensitivity of diagnosis of tuberculosis in patients in Korea via a cocktail enzyme-linked immunosorbent assay containing the abundantly expressed antigens of the K strain of *Mycobacterium tuberculosis* // Clin. Vaccine Immunol. – 2008. – 15, № 12. – P. 1788–1795.
 15. Houe H., Baker J.C., Maes R.K., Ruegg P.L., Lloyd J.W. Application of antibody titres against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV // J. Vet. Diagn. Invest. – 1995. – 7, № 3. – P. 327–332.
 16. Amadori M., Tameni S., Scaccaglia P., Cavirani S., Archetti I.L., Quondam R. Giandomenico Antibody tests for identification of *Mycobacterium bovis*-infected bovine herds // J. Clin. Microbiol. – 1998. – 36, № 2. – P. 566–568.
 17. Редчук Т.А., Олійник О.С., Кабернюк А.А., Буркальова Д.О., Романюк С.І., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Клонування та експресія білків *Mycobacterium bovis* MPB63 і MPB83 в клітинах *Escherichia coli* // Доп. НАН України. – 2007. – № 9. – С. 161–166.
 18. Manca C., Lyashchenko K., Wiker H.G., Usai D., Colangeli R., Gennaro M.L. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* // Infect. and Immun. – 1997. – 65, № 1. – P. 16–23.
 19. Wiker H.G., Lyashchenko K.P., Aksoy A.M., Lightbody K.A., Pollock J.M., Komissarenko S.V., Bobrovnik S.O., Kolesnikova I.N., Mykhalsky L.O., Gennaro M.L., Harboe M. Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis* // Infect. and Immun. – 1998. – 66, № 4. – P. 1445–1452.
 20. Lilliefors H. On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown // J. Amer. Statist. Ass. – 1967. – 62. – P. 399–402.
 21. Shapiro S.S., Wilk M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples) // Biometrika. – 1965. – 52, № 3. – P. 591–611.
 22. Gill P.E., Murray W. Algorithms for the solution of the nonlinear least-squares problem // SIAM J. Numer. Anal. – 1978. – 15, № 5. – P. 977–992.
 23. Spearman C. The proof and measurement of association between two things // Amer. J. Psychol. – 1904. – 15. – P. 72–101.
 24. Lang T.A., Secic M. How to report statistics in medicine; annotated guidelines for authors, editors, and reviewers. – Amer. College Physicians, 1997. – 355 p.
 25. Abel L., Dessein A.J. Genetic epidemiology of infectious diseases in humans: design of population-based studies // Emerging Infect. Dis. – 1998. – 4, № 4. – P. 593–603.
 26. Kobayashi K., Kamiie K., Kobayashi A., Matsuda S. Nucleotide sequence of MPB63 gene in *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo // J. Basic Microbiol. – 2003. – 43, № 3. – P. 249–254.
 27. Vosloo W., Tippoo P., Hughes J.E., Harriman N., Emms M., Beatty D.W., Zappe H., Steyn L.M. Characterization of a lipoprotein in *Mycobacterium bovis* (BCG) with sequence similarity to the secreted protein MPB70 // Gene. – 1997. – 188, № 1. – P. 123–128.
 28. Mustafa A.S. Th1 cell reactivity and HLA-DR binding prediction for promiscuous recognition of MPT63 (Rv1926c), a major secreted protein of *Mycobacterium tuberculosis* // Scand. J. Immunol. – 2009. – 69, № 3. – P. 213–222.
 29. Chambers M.A., Vordermeier H., Whelan A., Commander N., Tascon R., Lowrie D., Hewinson R.G. Vaccination of mice and cattle with plasmid DNA encoding the *Mycobacterium bovis* antigen MPB83 // Clin. Infect. Dis. – 2000. – 30. – P. S283–S287
 30. Vordermeier H.M., Cockle P.C., Whelan A., Rhodes S., Palmer N., Bakker D., Hewinson R.G. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle // Clin. and Diagn. Lab. Immunol. – 1999. – 6, № 5. – P. 675–682.
 31. Olsen I., Tryland M., Wiker H.G., Reitan L.J. AhpC, AhpD, and a secreted 14-kilodalton antigen from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinguish between paratuberculosis and bovine tuberculosis in an enzyme-linked immunosorbent assay // Clin. and Diagn. Lab. Immunol. – 2001. – 8, № 4. – P. 797–801.
 32. Wiker H.G., Nagai S., Hewinson R.G., Russell W.P., Harboe M. Heterogenous expression of the related MPB70 and MPB83 proteins distinguish various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv // Scand. J. Immunol. – 1996. – 43, № 4. – P. 374–380.

Поступила 11.06.09