



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК: 619:616.097:579.873.21

DOI:10.52419/issn2072-2419.2023.4.14

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ТЕСТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНЫХ АНТИТЕЛ

Хаммадов Н.И.^{1*} – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5669-1486); Хаертынов К.С.¹ – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-4764-560X); Ахмадеев Р.М.¹ – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-1732-6977); Шангараев Р.И.¹ – канд. ветеринар. наук, науч. сотр. (ORCID 0000-0003-3689-1442); Усольцев К.В.¹ – канд. ветеринар. наук, вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0001-5279-9836); Хамидуллина А.И.² – студент 4 курса факультета ветеринарной медицины (ORCID 0000-0001-5593-2399); Галеева А.Г.¹ – канд. ветеринар. наук, ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0003-2650-6459).

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

² ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

*nikhammadov@mail.ru

Ключевые слова: иммунохроматография, туберкулёз, антитела, антиген, диагностика.

Key words: immunochromatography, tuberculosis, antibodies, antigen, diagnostics.

Поступила: 02.10.2023

Принята к публикации: 17.11.2023

Опубликована онлайн: 08.12.2023



РЕФЕРАТ

Туберкулёз – опасное социально значимое заболевание разных видов животных. По данным Россельхознадзора за 2022 год, ситуация по туберкулёзу крупного рогатого скота является эндемичной, стабильной, многолетние тренды убывающие, эпидемические пороги по неблагополучию и заболеваемости не преодолены. Следует отметить, что в 2022 году официально заболевание туберкулёзом крупного рогатого скота не обнаружено, но было отмечено наличие данной инфекции у нескольких свиней и кабанов. Судя по снижению количества заболевшего туберкулёзом крупного рогатого скота, общая стратегия борьбы с данным заболеванием успешна, но это не означает, что полностью не исключает потребности в разработке новых тестов. Безопасность обслуживающего персонала напрямую зависит от минимизации риска инфицирования возбудителями заболеваний, общих для человека и животных, одним из которых является туберкулёз. Самым быстрым способом индикации инфекционных агентов является иммунохроматографический анализ. Данная публикация посвящена деталям, на которых желательно акцентировать внимание при разработке диагностического теста, основанного на иммунохроматографическом анализе, на примере туберкулёза крупного рогатого скота. В качестве сенсibilизирующей основы тестовой зоны в представленном исследовании использованы нативные

антигены *Mycobacterium bovis*, выращенные на питательной среде Левенштейна-Йенсена, обладающие доказанной антигенной активностью. Конъюгацию антивидовых антител осуществляли с коллоидным раствором золота, диаметр частиц которого составил $(25,0 \pm 0,9)$ нм. В ходе работы показаны оптимальные условия изготовления диагностического теста для выявления противотуберкулёзных антител методом иммунохроматографического анализа.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Туберкулёз – опасное, социально значимое инфекционное заболевание, заражению которым подвержены животные и человек. Наибольшая опасность данной инфекции заключается в совокупности негативных обстоятельств, среди которых – хроническое течение заболевания, что затрудняет быстрое определение начала инфекционного процесса, частое наличие штаммов с лекарственной устойчивостью, в том числе с множественной устойчивостью к терапевтическим средствам (больше относится к *Mycobacterium tuberculosis*), длительность роста на питательных средах (особо актуально при определении лекарственной устойчивости путём посева на питательные среды с тестируемыми антибиотиками при лечении человека), способность возбудителей туберкулёза (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) инфицировать различные биологические виды. Касательно туберкулёза крупного рогатого скота ситуацию может усугублять затруднённая диагностика, серологические и аллергические тесты могут давать ложные результаты, что связано с ослаблением иммунной системы животного, возникающего вследствие тяжелого протекания иных инфекционных заболеваний, либо проблемами неинфекционного характера [1, 2]. Стратегия борьбы с туберкулёзом крупного рогатого скота, применяемая в нашей стране, оказалась достаточно успешной. Так, по данным Россельхознадзора, в 2022 году новых случаев заболевания среди коров не выявлено. Однако в 2021 и в предшествующих годах заболевание регистрировалось регулярно [3]. Аллергические, серологические и генетические методы диагностики показали свою эффективность в рамках общей стратегии борьбы с туберкулёзом крупного и мелкого рогатого скота. Одна-

ко от начала исследования (инъекция туберкулина или взятие материала для серологической или генетической диагностики) до получения результата исследования может пройти не один день. В ходе ведения животноводства существуют ситуации (проведение срочных хирургических операций, родовспоможение и другие процедуры, связанные с контактом с животными), когда нужно в максимально короткий срок определить вероятность инфицирования животного опасными для человека заболеваниями (в первую очередь туберкулёзом и бруцеллёзом). В данном случае одной из самых быстрых реакций является иммунохроматографический анализ (ИХА). Указание наиболее значимых аспектов разработки ИХА тестов на примере возбудителя туберкулёза крупного рогатого скота стало целью представленной публикации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Для выделения антигенов микобактерий туберкулёза (*M. bovis*, штамм *bovinus 8 – 700201*), культивировали на питательной среде Левенштейна-Йенсена в течение 1-2 месяцев – до появления видимого роста бактерий, не допуская их перерастания, после чего выделяли антигены [4].

Иммунизацию кроликов (порода шинилла, вес 2 кг) и овец (романовская порода, вес 30 кг) проводили по методу Балли [5]. Кроликов иммунизировали антигенами микобактерий, получаемыми в рамках данного исследования в дозе 100 мг на голову. Овец иммунизировали иммуноглобулинами кроликов и крупного рогатого скота в дозе 0,1 мг на килограмм массы овцы. Указанные дозы при иммунизации кроликов и овец сохранялись при каждом введении. Антителогенез контролировали в реакции иммунодиффузии. Из гипериммунных и антивидовых

сывороток выделяли иммуноглобулины класса G методами последовательного осаждения сульфатом аммония, анионо-обменной хроматографии.

Контроль чистоты IgG осуществляли методом нативного электрофореза на ацетатцеллюлозных мембранах, концентрацию иммуноглобулинов определяли на спектрофотометре «Nanodrop 2000» («Thermo Scientific», США).

Наночастицы коллоидного золота со средним диаметром 25 нм получали из золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) (ООО «Аурат», Россия) модифицированным методом Туркевича-Френса [6, 7], при этом объемы 1 % раствора ЗХВК и 1 % раствора цитрата натрия на 50 мл реакционной смеси составляли 0,58 и 0,72 мл соответственно. О формировании наночастиц судили по изменению окраски раствора с бледно-голубого на фиолетовый и впоследствии – рубиновый, что свидетельствует о завершении процесса коалесценции зародышей наночастиц. После появления стабильной окраски при отсутствии признаков флоккуляции полученный золь охлаждали до комнатной температуры и доводили pH до 9,0 при помощи 0,2 М K_2CO_3 .

Иммобилизацию очищенных IgG (антитела овцы против кроликов и против коровы), предварительно диализованных против 2 мМ боратно-HCl-буфера (pH 9,0) и коммерческих конъюгатов с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США), на наночастицах коллоидного золота выполняли по модифицированной методике Сотникова Д.В. [8], в различных модификациях. Для формирования мультимембранных композитов – основы ИХА тестов – использовали комплект нитроцеллюлозных мембран и подложек «MDI Easypack» («MDI», Индия).

Предлагаемая модель теста представляет собой композит с аналитической мембраной [9], где тестовая зона – антиген *M. bovis* молекулярной массой 28 кДа, контрольная зона – иммуноглобулины целевого вида животного (в одном случае кролик, в другом крупный рогатый скот). Принцип таков, что антитела в

аналите связываются сначала с конъюгатом, образуя комплекс, потом данный комплекс связывается с антигеном тестовой зоны (в случае если в анализе были специфические антитела), далее по ходу движения жидкости конъюгат связывается с иммуноглобулинами контрольной зоны, в результате чего в соответствующих зонах теста образуются окрашенные полосы/доты.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Ключевым компонентом диагностического теста для выявления в исследуемых образцах антител является специфичный иммуногенный антиген. В данном исследовании мы использовали антиген, полученный из клеточных стенок *M. bovis* во фракциях после хроматографической очистки, в которых присутствовал отдельно антиген молекулярной массой 28 кДа (по результатам электрофореза в ПА-АГ) специфичный в вестерн-блоте с гипериммунной сывороткой крови кролика против цельного возбудителя туберкулеза. Модель антигена с молекулярной массой 28 кДа была взята за основу ввиду стандартизации получения данного антигена и его выраженных иммуногенных свойств, однако в полевых условиях необходимо применение мультиантигенного подхода [1, 10, 11]. Для нанесения на нитроцеллюлозную мембрану в нашем случае рабочая концентрация составила от 10 мг/мл, что существенно превышает расход антигена в ИФА даже несмотря на то, что объем наносимого антигена на одну мембрану (для сенсibilизации аналитической зоны нитроцеллюлозной мембраны шириной 5 мм, что соответствует одному готовому тесту для ИХА) составляет около 0,2-0,3 мкл. При инструментальном производстве тестов нанесение антигена на мембрану осуществляется диспенсером, но на этапе первичной разработки покупка такого прибора будет весьма затратной. В данном случае эффективным представляется нанесение антигена не в виде полосы, что зачастую невозможно сделать равномерно при мануальном нанесении, а в виде точки (дота). Контрольный антиген – сыворотка крови це-

левого животного (предпочтительнее применять очищенные иммуноглобулины) эффективно работает при разведении 1:100 на карбонат-бикарбонатном буфере, нанесение аналогично целевому антигену, в область мембраны для контроля реакции.

Относительно применяемых для конъюгации антивидовых антител в лабораториях, профиль деятельности которых заключается в разработке тестов для серологической диагностики различных возбудителей инфекционных заболеваний, всегда имеются различные антивидовые конъюгаты – антитела, меченные щелочной фосфатазой, пероксидазой хрена либо иной меткой, либо вовсе немеченные антивидовые антитела. В данном исследовании мы применяли и самостоятельно полученные антитела овцы против крупного рогатого скота и против кролика, и аналогичные антитела, меченные пероксидазой хрена. Применение антител как против коровы, так и против кролика обусловлено тем, что крупный рогатый скот является основной моделью для разработки теста, а кролик является контрольной моделью для проверки специфичности проявления реакции, так как гипериммунная сыворотка крови против туберкулёза получена именно от кроликов. В конечном итоге для конъюгирования коллоидного золота (в нашем исследовании оптимальный средний размер частиц коллоидного золота составил 25 нм, расчётный размер по данным электронной микроскопии соответствовал фактическому) подходят и немеченные антитела, и в виде конъюгатов (при наличии антител без метки предпочтительны последние). В случае применения конъюгированных антител рекомендуется предварительно инкубировать их в кислых растворах (рН 4,0) в течение 2-5 минут, далее незамедлительно перенести антитела в раствор коллоидного золота (рН 9,0), после чего осуществить конъюгацию согласно протоколу. В настоящем исследовании мы применяли различные конъюгаты: по стандартному протоколу с последующей фильтрацией через шприцевые фильтры (диаметр пор 0,45

мкм), с полной заменой среды высушивания на смесь, содержащую 40% сорбита с трегалозой, БСА, фенилметилсульфилфосфат, ПЭГ (либо тритон X-100), трис-HCl (0,025M), в том числе с последующей фильтрацией через шприцевой фильтр. После получения конъюгаты были нанесены на стекловолоконную мембрану (расход конъюгата 50-60 мкл на см² мембраны) и высушены под вакуумом. Все варианты конъюгата были работоспособны (проявление положительной контрольной реакции, в виде изменения цвета контрольной зоны с белого на розово-фиолетовый); следует отметить, что наиболее эффективная миграция конъюгата происходит со стекловолоконных мембран, предварительно обработанных фосфатным буфером, содержащим 0,1 % твин-20 и 10% глицерина (расход буфера 10-20 мкл на см² мембраны).

Анализируемую сыворотку наносили в разведении 1:4, однако в ряде случаев наблюдалось ингибирование реакции сывороткой крови в концентрации до 1:200. Нарезание индивидуальных полос для анализа необходимо выполнять гильотинным резчиком, так как при отрезании ножницами в ряде случаев образуются зазубрины на краях нитроцеллюлозы, и анализируемый образец может мигрировать за пределы мембраны.

На начальной стадии разработки ИХА теста допускается проводить пробные анализы не посредством точечного нанесения образца на мембрану, а в формате дипстика, подразумевающим погружение тест-полоски в пробирку с анализируемым раствором».

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

В связи со сложным инфекционным процессом при туберкулёзе, а именно – нестерильным иммунитетом и вариабельностью антигенного профиля в различные стадии развития инфекции – при индикации антител против туберкулёза необходимо применять мультиантигенный подход.

Исходя из полученных результатов, можно резюмировать следующее: подбор концентрации необходимо проводить для

каждого тестируемого антигена, для конъюгирования можно использовать как чистые (без меток) антитела, так и другие конъюгаты (оптимальный средний размер частиц коллоидного золота в нашем случае составил 25 нм), мембраны для нанесения конъюгата желателно предварительно обработать буфером, содержащим твин-20 и глицерин, нарезать мембраны для последующего применения предпочтительно гильотинным резчиком.

IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR THE DETECTION OF ANTI-TUBERCULOSIS ANTIBODIES

Khammadov N. I.¹ – Ph.D of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5669-1486), **Khaertynov K. S.**¹ – Ph.D of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0003-4764-560X), **Akhmadeev R. M.**¹ – Ph.D of Veterinary Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0002-1732-6977), **Shangaraev R. I.**¹ – Ph.D of Veterinary Sciences, Researcher (ORCID 0000-0003-3689-1442), **Usoltcev K. V.**¹ – Ph.D of Veterinary Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0001-5279-9836), **Khamidullina A. I.**² – 4th year student of the Faculty of Veterinary Medicine (ORCID 0000-0001-5593-2399), **Galeeva A. G.**¹ – Ph.D of Veterinary Sciences, Senior Researcher (ORCID 0000-0003-2650-6459).

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety

² Kazan State Academy of Veterinary Medicine

*nikhammadov@mail.ru

ABSTRACT

Tuberculosis is a dangerous socially significant disease of various animal species. According to Rosselkhoz nadzor data for 2022, the situation with bovine tuberculosis is endemic, stable, long-term trends are decreasing, epidemic thresholds for ill health and incidence have not been overcome. It should be noted that in 2022, bovine tuberculosis was not officially detected, but this infection was registered in several pigs and wild boars. Take a point that the reduction in

the number of cases of tuberculosis in cattle is decreased (to zero), the overall strategy for combating this disease is successful, but this does not mean that the need to develop new tests for the accelerated diagnosis of this infection has completely disappeared. The safety of service personnel directly depends on minimizing the risk of infection with pathogens common to humans and animals, one of which is tuberculosis. The fastest way to indicate infectious agents is by immunochromatographic analysis. This publication is devoted to the details that it is desirable to focus on when developing a diagnostic test based on immunochromatographic analysis, using the example of bovine tuberculosis. As an antigen in the presented study, native antigens of *Mycobacterium bovis* grown on a nutrient medium Levenshtein-Jensen with proven antigenic activity were used. Conjugation of antispecies antibodies was carried out with a colloidal solution of gold, (diameter of particle is 25±0,9 nm). In the course of the work, the optimal conditions for the manufacture of a diagnostic test for the detection of anti-tuberculosis antibodies by immunochromatographic analysis were shown.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Оценка иммунохроматографического теста на основе мультиантигенов *Mycobacterium bovis* / Э. А. Шуралев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2017. – Т. 230, № 2. – С. 190-193.
2. Иммунодефицитные состояния и их коррекция у крупного рогатого скота в условиях экологического неблагополучия: специальность 16.00.02: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Топурия Гоча Мирианович. – Оренбург, 2003. – 403 с.
3. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации 2022 год https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/iac/iac_epizooticheskaya_situaciya_v_rf_2022_god.pdf (дата обращения 17.07.2023).
4. Патент № 2691586 С1 Российская Федерация, МПК C12N 1/00. Способ получе-

ния антигена из "Mycobacterium bovis Bovinus-8 штамм 700201" молекулярной массой 28 кДа для изучения гуморального иммунного ответа: № 2018127036: заявл. 23.07.2018; опубл. 14.06.2019 / К. С. Хаертынов, А. П. Цибульский, Э. А. Шуралев [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России).

5. Оптимизация схем гипериммунизации лабораторных животных высокоочищенным антигеном вируса бешенства / А. Г. Мухамеджанова, Р. М. Ахмадеев, Н. Р. Мифтахов [и др.] // Ветеринария. – 2020. – № 10. – С. 25-29. – DOI 10.30896/0042-4846.2020.23.10.25-29.

6. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold / J. Turkevich, P.C. Stevenson, J. Hillier // Discussions of the Faraday Society. – 1951. Vol. 11. – P. 55-75. DOI: 10.1039/DF9511100055.

7. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions / G. Frens // Nature Physical Science. – 1973. – Vol. 241, No. 105. P. – 20–22. DOI:10.1038/physci241020a0.

8. Определение специфических антител методом иммунохроматографии (количественные закономерности и практические приложения): специальность 03.01.04 "Биохимия": автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук / Сотников Дмитрий Васильевич. – Москва, 2016. – 22 с.

9. Иммунохроматографический анализ. Материал из Википедии. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BC%D0%BC%D1%83%D0%BD%D0%BE%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7 (дата обращения 20.07.2023).

10. 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. – EDN YULKEF.

11. Extraction and Serological Properties of Mycobacterium Cell Surface and Excreted Proteins / K. S. Khaertynov, A. R. Valeeva, M. N. Mukminov [et al.] // BioNanoScience. – 2018. – Vol. 8, No. 1. – P. 459-466. – DOI 10.1007/s12668-017-0492-1. – EDN XY-ADBJ.

REFERENCES

1. Shuralev EA. Ocenka immunohromatograficheskogo testa na osnove mul'tiantigenov Mycobacterium bovis: Uchenye zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoj medicinyim. N.E. Baumana. 2017; 230(2): 190-193 [in Russ.].

2. Topuriya GM. Immunodeficitnye sostoyaniya i ih korrekciya u krupnogo rogatogo skota v usloviyah ekologicheskogo neblagopoluchiya: special'nost' 16.00.02: dissertaciya na soiskanie uchenoj stepeni doktora biologicheskikh nauk. – Orenburg. 2003: 403 [in Russ.].

3. Epizooticheskaya situaciya v Rossijskoj Federacii 2022 god https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/iac/iac_epizooticheskaya_situaciya_v_rf_2022_god.pdf (data obrashcheniya 17.07.2023) [in Russ.].

4. Khaertynov KS, Cibul'kin AP, Shuralev EA, Efimova MA, Valeeva AR, Mukminov MN, Ahmadeev RM, Khaertynova IM, Valiev RSH, Gabdulhakova AG, Moskvicheva AV. Patent № 2691586 C1 Rossijskaya Federaciya, MPK C12N 1/00. Sposob polucheniya antigena iz "Mycobacterium bovis Bovinus-8 shtamm 700201" molekulyarnoj massoj 28 kDa dlya izucheniya gumoral'nogo immunnogo otveta: № 2018127036: zayavl. 23.07.2018; opubl. 14.06.2019; zayavitel' Federal'noe gosudarstvennoe byudzhethoe obrazovatel'noe uchrezhdenie dopolnitel'nogo professional'nogo obra-

- zovaniya "Rossijskaya medicinskaya akademiya nepreryvnogo professional'nogo obrazovaniya" Ministerstva zdravoohraneniya Rossijskoj Federacii (FGBOU DPO RMANPO Minzdrava Rossii) [in Russ.].
5. Muhamedzhanova AG, Ahmadeev RM, Miftahov NR, Nasyrov ShM, Aleeva ZZ, Yarullina GM, Arutyunyan GS. Optimizatsiya skhem giperimmunizatsii laboratornyh zhivotnyh vysokoochishchennym antigenom virusa beshenstva: Veterinariya. 2020; 10: 25-29. – DOI 10.30896/0042-4846.2020.23.10.25-29 [in Russ.].
6. Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold: Discussions of the Faraday Society. 1951; 11: 55-75. DOI: 10.1039/DF9511100055.
7. FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions: Nature Physical Science. 1973; 241(105): 20–22. DOI:10.1038/physci241020a0.
8. Sotnikov DV. Opredelenie specificheskikh antitel metodom immunohromatografii (kolichestvennye zakonomernosti I prakticheskie prilozheniya): special'nost' 03.01.04: dissertatsiya na soiskanie uchenoj stepeni kandidata himicheskikh nauk. – Moskva. 2016: 150 [in Russ.].
9. Immunohromatograficheskij analiz. Material iz Vikipedii. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BC%D0%BC%D1%83%D0%BD%D0%BE%D1%85%D1%80%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D1%84%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7 (data obrashcheniya 20.07.2023).
10. Shuralev EA, Khaertynov KS, Valeeva AR, Aleksandrova NM, Mukminov MN. Funkcionirovanie i serologicheskaya aktivnost' ekstrakta kletok i produktov ekspressii Mycobacterium bovis: Veterinariya i kormlenie. 2017; 3: 103-105 [in Russ.].
11. Khaertynov KS, Valeeva AR, Mukminov MN, Khaertynova IM, Nabatov AA, Shuralev EA, Ivanov AV, Aleksandrova NM, Moskvicheva AV, Efimova MA, Akhmadeev RM, Samigullina ES, Urazov NG. Extraction and Serological Properties of Mycobacterium Cell Surface and Excreted Proteins: BioNanoScience. 2018; 8(1): 459-466. – DOI 10.1007/s12668-017-0492-1.