

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ТРАНСМІСИВНИХ СПОНГІФОРМНИХ ЕНЦЕФАЛОПАТІЙ (ТСЕ): СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ

В. В. Влізло, Х. Я. Майор, П. І. Вербицький, В. В. Стадник

Інститут біології тварин УААН

У оглядовій статті розглянуто швидкі та референс–методи діагностики ТСЕ, що застосовуються у сучасній лабораторній практиці та наукових дослідженнях. Також у роботі обговорюються методичні підходи диференційної діагностики ТСЕ овець і великої рогатої худоби та проблеми, які стоять у галузі лабораторного діагностування пріонних інфекцій.

Ключові слова: ТСЕ, ГУБЧАСТОПОДІБНА ЕНЦЕФАЛОПАТІЯ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ, СКРЕЙПІ, ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА, ТВЕРЕДОФАЗНИЙ ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, ІМУНОБЛОТ–АНАЛІЗ, ІМУНОГІСТОХІМІЯ.

Трансмисивні спонгіформні енцефалопатії (ТСЕ) або пріонні інфекції — група нейродегенеративних захворювань, які характеризуються ураженням центральної нервової системи (ЦНС) та 100 % летальністю [1]. ТСЕ уражають в основному, ссавців. Так, для великої рогатої худоби (ВРХ) описано губчастоподібну енцефалопатію ВРХ (ГЕ ВРХ) [2-4]; для овець — скрейпі [5–7] і Nor98 [8]; для оленів та лосів — хронічну виснажливу хворобу (ХВХ) [9]; для котятих — спонгіформну енцефалопатію котятих [10,11]. Для людини описано Крейцфельдта–Якоба хворобу (КЯХ) [2, 12, 13], синдром Гертсмана–Штройслера–Шейкнера (ГШШС), фатальне родинне безсоння (ФРБ), куру [2].

Ураження реєструються у сірій речовині стовбурової частини мозку між мозочком і великими півкулями головного мозку, зокрема у довгастому мозку встановлюють добре виражені симетрично розміщені дистрофічні зміни з утворенням великої кількості мікрокіст круглої або овальної форми (вакуолізація) [14–19].

Встановлено, що інфекційним агентом, який викликає вищеописані хвороби є білок — пріон, назва якого походить від proteinaceous infection particle [1]. Пріон є глікопротеїном, який складається, в середньому, з 220 амінокислотних залишків та має молекулярну масу 30–35 кДа [2]. Існують дві основні конфірмаційні ізоформи пріон–протеїну — PrP^C (c-cellular) — фізіологічна форма пріон–протену, яка експресується за нормальних умов в багатьох тканинах організму та PrP^{SC} (sc-scrapie) — патологічна ізоформа пріон–протеїну, яка і є інфекційним агентом пріонних хвороб [20]. Дана ізоформа, в більшості випадків, є ідентичною до PrP^C за первинною структурою, крім спадкових форм хвороб, де в гені Prnp відбуваються мутації, але відмінною за вторинною і, відповідно, третинною структурами [21]. Так, якщо у молекулі фізіологічної форми пріон–протеїну переважають α -спіралі, які складають, приблизно, 40 % від всієї молекули, а β -структури — 3 %, то у патологічній формі переважають β -структури (43 %), а рівень α -спіралей в незначній мірі знижується [1, 22].

Перетворення PrP^C у PrP^{SC} відбувається за рахунок взаємодії молекул патологічного пріон–протеїну з молекулами фізіологічного, наслідком чого є їх конверсія у PrP^{SC} (рис. 1) [1, 23]. Детально даний механізм нез'ясований, хоча й існує декілька гіпотез з цього приводу [24].

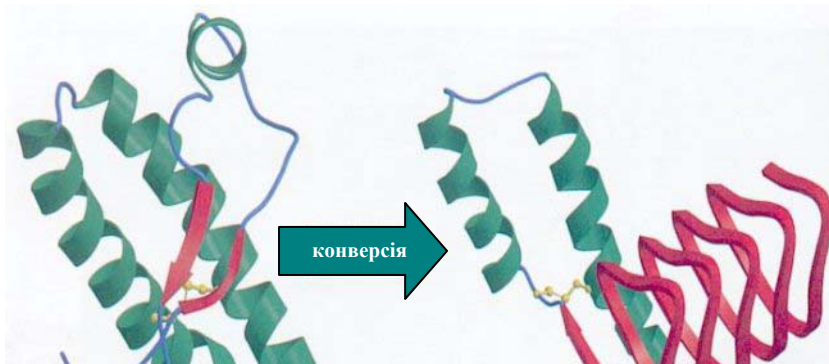


Рис.1. Перетворення фізіологічної форми пріон–протеїну у патологічну.

Основні методичні підходи при лабораторній діагностиці пріонних хвороб

Після встановлення природи інфекційного агента з'явилась можливість одержання могутнього інструмента для діагностики пріонних хвороб — моноклональних антитіл. Їх було вперше отримано групою проф. Прузінера у 1986 р. [25]. Ці антитіла розпізнавали як патологічний, так і фізіологічний пріон–протеїн. Після цього дослідження з'явився ряд робіт, присвячених отриманню моноклональних антитіл до пріон–протеїна [26, 27]. Але їх застосування не було успішним, оскільки патологічний пріон–протеїн не викликає імунної відповіді організму [28, 29]. Тому при отриманні моноклональних антитіл використовували фізіологічний пріон. Наслідком такого підходу було те, що більшість антитіл впізнавали лише фізіологічний пріон, деякі — фізіологічний та патологічний, але жодна з гібридом, отриманих до нашого часу, не продукує антитіл, які б впізнавали лише патологічну форму пріон–протеїну [30]. Тому, для застосування антитіл при діагностиці пріонних хвороб необхідно позбуватися фізіологічного пріону. Цього досягають шляхом обробки проби протеїназою К, до якої PrP^C є чутливою, а PrP^{SC} — стійкою [24, 31]. Даний принцип застосовується у більшості методів діагностики пріонних інфекцій.

Всі сучасні методи для лабораторної діагностики пріонних хвороб можна поділити на три групи: швидкі методи (тривалість виконання яких не перевищує 24 години), референс–методи.

Швидкі методи діагностики

Дані методи включають — імуноблот–аналіз (Western blotting technique), точкову гібридизацію (Dot–blot technique) та твередофазний імуноферментний аналіз — ТФ–ІФА (Enzyme–linked Immunosorbent Assay — ELISA).

Імуноблот–аналіз ґрунтується на детекції патологічного пріона за допомогою моноклональних антитіл після електрофоретичного розділення та перенесення розділених білків з гелю на спеціальну мембрану, на якій досліджуваний білок детектується за допомогою моноклональних антитіл.

Для дослідження патологічного пріону в метод імуноблот–аналізу було внесено деякі зміни. Так, відпала необхідність застосування інгібіторів протеїназ та включено етап обробки матеріалу протеїназою К через стійкість PrP^{SC} до протеолітичної обробки та необхідність позбутися фізіологічної форми пріон–протеїну. У такому, модифікованому варіанті, методика імуноблот–аналізу застосовується як в наукових дослідженнях [32–37], так і у діагностичних цілях [38, 39]. Існують й інші модифікації імуноблот–аналізу, які застосовуються для діагностики ГЕ ВРХ в якості референт–методів.

Техніка ТФ–ІФА ґрунтується на іммобілізації патологічного пріона на твердій підложці (як правило, у лунці спеціального планшета) та наступній детекції за допомогою антитіл, кон'югованих з репортерним ферментом і розчином хромогенного субстрату.

Зараз існує багато модифікацій ELISA, які застосовуються для діагностики пріонних хвороб. В основі однієї з модифікацій цього методу лежить, так звана, сепріонна техніка [40]. Її суть полягає у тому, що замість моноклональних антитіл, дно лунок покривають спеціальною полімерною сполукою під назвою «сепріон» (Seprion), яка вибірково взаємодіє з патологічним пріоном. Таким чином, у даній методиці вдалося скоротити стадію обробки

протеїназою К. Ця техніка та комерційні набори для діагностики GE ВРХ в головному мозку та ХВХ в мозковій та лімфоїдній тканинах розроблені фірмою IDEXX (США).

Подібний методичний підхід застосували вчені компанії Baxter BioScience, Vienna, Austria, при розробці методу глибокої затримки (Dipstick–assay). Замість перших, іммобілізованих в лунках планшету, антитіл вони використали бактеріальний поверхневий кристалін, яким покривали лунку з утворенням S–шару [41]. Дана сполука здатна зв'язувати як фізіологічний, так і патологічний пріон. Тому у даній методиці також застосовують обробку протеїназою К. Після зв'язування пріону з S–шаром проходить класична детекція із застосуванням моноклональних антитіл, кон'югованих з маркерним ферментом. Описана методика володіє чутливістю та специфічністю, подібною до класичного ТФ–ІФА.

Крім вищенаведених сполук, для іммобілізації патологічного пріону застосовують глікозаміноглікани, зокрема хондроїтинсульфати та гепарин [42]. Авторами даної роботи було показано, що найбільш ефективно патологічний пріон зв'язується з хондроїтинсульфатом А. Результати цієї роботи також дозволили з'ясувати, що здатність зв'язуватися хондроїтинсульфатів з пріоном не залежить від заряду перших, оскільки гіперсульфатований хондроїтинсульфат Е не виявив спорідненості до пріон–протеїну. На основі цих даних запропоновано модифікацію методу ELISA для детекції PrP^{SC} із застосуванням іммобілізованого хондроїтинсульфату А. У цій же роботі автори спробували розробити нову систему детекції патологічного пріону із застосуванням лектинів замість других антитіл. Було використано три лектини: DSL, RCA та WGA, кон'югованих з біотином. Відповідно, візуалізація утворених комплексів пріон–лектин–біотин здійснюється із використанням стрептавідину та біотину, кон'югованого з маркерним ферментом — лужною фосфатазою. Згідно отриманих результатів [43], найбільшою чутливістю до патологічного та фізіологічного пріонів володіє лектин RCA, який зв'язує залишки N–ацетилгалактозаміну. Крім цього показано відмінність у рівні зв'язування RCA з пріоном, залежно від виду захворювання — скреїпі чи GE ВРХ. Різниця у рівні зв'язування патологічного пріону з лектином RCA показана також і для спорадичної КЯХ та нвКЯХ [43]. Крім RCA, здатність асоціювати з пріоном мають лектини конканавалін А та лектин з *Aleuria aurantia*, але для них не відзначалися відмінності у зв'язуванні патологічного пріону при різних пріонних хворобах [43]. Таким чином, використання модифікації ELISA з використанням лектину RCA може бути запропоновано для диференціальної діагностики пріонних хвороб.

Інша модифікація ELISA базується на хімічній сепарації PrP^C від PrP^{SC}, що здійснюється за допомогою фосфорновольфрамової кислоти (РТА) [44]. Після інкубації лізату досліджуваного матеріалу з РТА проводять центрифугування, в процесі якого комплекс РТА–PrP^{SC} осідає. Далі осад ресуспендують у спеціальному буфері та проводять класичну ELISA з використанням системи двох антитіл. Діагностичні набори із застосуванням даної технології випускає компанія InPro (США), яку очолює проф. Прузінер — Нобелівський лауреат, першовідкривач пріонів та техніки застосування РТА.

Роботою Chang et al. [45] було продемонстровано можливість діагностики пріонних інфекцій в крові за допомогою техніки каталізованої Т7 РНК–полімеразою ампліфікації флюоресценції, специфічної для агрегованих та ампліфікованих білків (Am–A–FACTT — Amplification–Aggregation–Fluorescent Amplification Catalyzed by T7 RNA Polymerase Technique). Метод Am–A–FACTT є, в значній мірі, модифікованим методом ТФ–ІФА. Суть його полягає в тому, що PrP^{SC} досліджуваного зразка, ампліфікують, використовуючи техніку РМСА (про яку буде йти мова нижче), після чого зразки обробляють протеїназою К та проводять агрегаційно–специфічний твредофазний імуоферментний аналіз (AS–ELISA — Aggregation–Specific ELISA). Його особливість полягає у використанні однакових антитіл в якості іммобілізованих та розчинних (кон'югованих з маркерним ферментом) [46]. Це робиться з огляду на те, що найменша кількість субодиниць PrP^{SC} в білкових агрегатах *in vivo* дорівнює двом, тобто, він є димером [47]. Згідно інших досліджень, PrP^{SC} може утворювати агрегати з молекулярною масою від 300 до 600 кДа, з константою седиментації 40S [48]. У таких комплексах кількість мономерів PrP^{SC} може коливатися від 14 до 28. Зрозуміло, що кількість однакових епітопів в таких мультимолекулярних агрегатах буде

більше одного, тому є можливість використовувати для ELISA однакові антитіла як для іммобілізації PrP^{SC} в лунках, так і для його детекції. Після іммобілізації агрегатів PrP^{SC} в лунках планшета, проводять детекцію патологічного пріона за допомогою системи FАСТТ [45] шляхом додавання розчинних антитіл, кон'югованих з Т7 РНК–полімеразою. Після їх зв'язування з агрегатами патологічного пріона додають ДНК, яка є субстратом для Т7 РНК–полімерази. Результатом каталізованої маркерним ферментом реакції є утворення РНК, кількість якої визначають флуориметрично, використовуючи РНК–інтеркалюючий барвник RiboGreen (Molecular Probes). Тобто, репортером, який свідчить про кількість патологічного пріон–протеїну в даній методиці є РНК [49]. На ранніх стадіях розвитку ТСЕ метод Am–A–FАСТТ володіє 50 % чутливістю та 100 % специфічністю щодо детекції PrP^{SC} в крові [45].

Суть наступної модифікації ТФ–ІФА полягає у застосування гуанідин гідрохлориду для концентрування та збільшення кількості досупних для антитіл епітопів на поверхні молекул PrP^{SC} [50–52]. Після обробки гуанідин гідрохлоридом застосовують для детекції PrP^{SC} класичний ТФ–ІФА або ж її специфічну модифікацію — метод дисоціаційно–посиленої лантанної імунофлуоресценції (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay, DELFIA), в якому для мічення других, розчинних антитіл, використовуються не маркерні ферменти, а метали з групи лантановидів — Eu і Tb [51]. Дана система детекції є чутливішою за ферментативну, але дуже вартісною та трудомісткою. Саме тому DELFIA не набула широкого застосування у лабораторній практиці. Комерційні набори для діагностики пріонних інфекцій методом ТФ–ІФА з використанням гуанідин гідрохлориду в якості хаотропного агенту, який забезпечує концентрування патологічного пріон–протеїну, випускають компанії Cedi (США) та VMRD (США) [53]. Важливим є те, що в даному тесті не використовуються іммобілізовані моноклональні анти–PrP антитіла. Замість них, лунка планшета покрита полівінілдіфторидною (PVDF) мембраною, яка здатна адсорбувати на своїй поверхні білки. Таким чином, у лунку наноситься суміш білків проби, де за допомогою хаотропного агенту була підвищена концентрація патологічної ізоформи пріон–протеїну. Після адсорбції білків PVDF–мембраною додаються розчинні анти–PrP антитіла, кон'юговані з маркерним ферментом, за активністю якого і робиться висновок про кількість патологічного пріону в пробі. Тобто, в даному випадку, компанією Cedi був створений гібрид двох методів — ELISA та точкової гібридизації (dot–blot hybridization).

Точкова гібридизація відрізняється від ТФ–ІФА тим, що зразок, після обробки протеїназою K, наноситься на нітроцелюлозну або PVDF–мембрану. Детекція досліджуваного білка здійснюється аналогічно до детекції при імуноблот–аналізі. Істинну точкову гібридизацію для детекції патологічного пріону до недавнього часу застосовували мало, в основному, для наукових досліджень. Польські вчені провели апробацію даного методу для застосування у якості експрес–методу діагностики пріонних інфекцій [54]. Проте, автори провели невелику кількість досліджень, тому його широке застосування ще не впроваджене.

Референс–тести

Референс–тести або арбітражні методи використовують для підтвердження діагнозу або встановлення патологічного пріону в досліджуваному матеріалі. Сюди відносяться гістологічне та імуногістохімічне дослідження, а також імуноблот–аналіз [55].

Першим лабораторним методом, який був використаний для діагностики пріонних хвороб було гістологічне дослідження головного мозку. При даному дослідженні спостерігається вакуолізація нейронів та позаклітинної речовини, яка є головним критерієм для встановлення відповідного діагнозу (рис. 2).

Гістологічне дослідження дозволяє виявити губчастоподібну вакуолізацію у зоні завитки (*obex*) довгастого мозку. У більшості випадків вакуолі зустрічаються у дорзальному ядрі блукаючого нерва та солітарному тракті (рис. 2) [56]. Саме тому ці зони є ключовими при гістологічній діагностиці ГЕ ВРХ чи скреїпі.

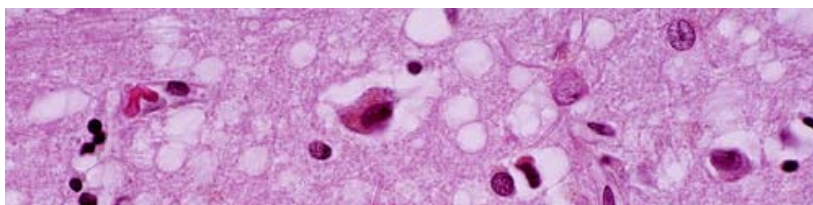


Рис.2. Вакуолізація нейронів довгастого мозку при ГЕ ВРХ (Гематоксилін–еозин, 400х).

Сьогодні гістологічне дослідження не може бути кінцевим результатом у діагностиці ТСЕ. У деяких випадках гістологічна діагностика може давати негативний результат у хворих тварин, або вакуолізація виникає при деяких захворюваннях центральної нервової системи, зокрема, гепатоцеребральній хворобі, або внаслідок методологічних помилок.

Імуногістохімічна діагностика базується на специфічному зв'язуванні моноклональних антитіл з патологічним пріоном на ультра тонкому зрізі. Після зв'язування перших антитіл проводиться візуалізація імунного комплексу PrP^{SC} за допомогою других антитіл, кон'югованих з маркерним ферментом. Перетворення цим ферментом спеціального субстрату на зафарбований продукт і є головним критерієм наявності PrP^{SC} у пробі.

Зараз найпоширенішою системою, яка використовується для діагностики ГЕ ВРХ та скреїпі є АВС–система. У цій системі другі антитіла кон'юговані з авідином. Після їх зв'язування з першими антитілами, додається суміш авідину та біотину, зв'язаного з маркерним ферментом, в результаті чого утворюється надмолекулярний імунний комплекс, кількість якого детектується шляхом утворення зафарбованого продукту реакції маркерного фермента зі специфічним субстратом.

Проведення гістологічного чи імуногістохімічного дослідження неможливо при автолізі тканин довгастого мозку чи їх механічному ушкодженні. У таких випадках застосовують спеціальні модифікації імуноблот–аналізу.

Основною модифікацією імуноблот–аналізу, який використовується для кінцевого встановлення діагнозу, є NaPTA–тест [57]. У цьому методі для концентрування PrP^{SC} використовується його здатність селективно взаємодіяти з РТА [57–59]. Для цього PrP^{SC} із зразку преципітують РТА. Далі преципітат розчиняють в спеціальному буфері та проводять електрофорез з електроблотингом. Детекція PrP^{SC} здійснюється як було описано вище. Преципітування PrP^{SC} з допомогою РТА дозволяє відкинути етап обробки зразку протеїназою К, а також підвищило чутливість імуноблот–аналізу, приблизно, в 100 разів [57].

Другою модифікацією імуноблот–аналізу є метод SAF–western [60]. Даний метод дозволяє виявляти скреїпі–асоційовані фібрили у досліджуваній тканині. Метод базується на виділенні даних фібрил шляхом ультрацентрифугування у градієнті сахарози [60]. Але, як видно з назви, дані фібрили зустрічаються тільки при скреїпі, тому даний тест не може застосовуватися для діагностики ГЕ ВРХ [61]. Для скреїпі дана методика володіє 100 % чутливістю та специфічністю.

Методи диференційної діагностики

Встановлено, що вівці можуть інфікуватися патологічним пріоном, або штамом, який уражає велику рогату худобу [62]. Цей штам за фізико–хімічними властивостями відрізняється від PrP^{SC} при скреїпі [63]. Водночас, у великої рогатої худоби детектовано нетипову форму ГЕ ВРХ, яка була названа губчастоподібна амілоїдна енцефалопатія (ГАЕ

ВРХ) [64, 65]. Дана субформа характеризується подібною до GE ВРХ клінічною картиною, але патоморфологічні показники хвороби є іншими [61].

Отже, диференційна діагностика TSE жуйних має два головних завдання: по-перше — встановити, який збудник викликав хворобу у овець і, по-друге, — який спричинив інфікування великої рогатої худоби. Для вирішення першого завдання використовуються дві групи методів — *in vivo* та *in vitro*.

In vitro методи для визначення штаму PrP^{SC} у овець. П'ять методів, із яких три протоколи імуноблот-аналізу, один протокол ТФ-ІФА та імуногістохімічний метод, дозволяють диференціювати штаму PrP^{SC}. Всі ці методики ґрунтуються, передусім, на вищій чутливості пріона GE ВРХ до обробки протеїназою К, порівняно із скреїпі. Це пов'язано з відмінностями у локалізації сайту розщеплення протеїназою К на N-термінальному кінці PrP^{SC} при GE ВРХ та скреїпі [66, 67]. За допомогою техніки блокування антитіл та Pepscan-аналізу було продемонстровано, що N-кінцева амінокислотна послідовність WGQGGSH зберігається тільки у штамі PrP^{SC}, який спричиняє скреїпі, а PrP^{SC}, відповідальний за розвиток GE ВРХ, не має даної послідовності після протеолітичної обробки [68].

Доведено, що GE ВРХ та скреїпі у овець відрізняються за кількістю та характером накопичення PrP^{SC} у різних типах клітин головного мозку, а також за рівнем зв'язування з антитілами, залежно від їх специфічності [69, 70]. На цих фактах базується диференційна імуногістохімічна діагностика. Було виготовлено декілька видів моноклональних антитіл, які впізнають специфічний епітоп, що розщеплюється протеїназами при інфікуванні овець збудником GE ВРХ, але залишається стабільним при скреїпі [69].

In vivo методи для визначення штаму PrP^{SC} у овець. Експериментальні зараження піддослідних тварин широко використовується при вивченні інфекційних хвороб. Вони знайшли своє застосування і при диференціації штамів патологічного пріону. Для цього визначають інфекційну дозу агента шляхом титрування та спостерігають за клінічним перебігом хвороби [71]. Незважаючи на надзвичайно високу чутливість та специфічність даного методичного підходу, він не набув широкого застосування через тривалий інкубаційний період (для мишей при інфікуванні GE ВРХ чи скреїпі він складає порядку 400 днів) [72]. Завдяки використанню трансгенних мишей вдалося скоротити інкубаційний період до 90 днів. Ці миші мають функціональний овечий чи бичачий ген пріона при нокаутуваному власному [73, 74]. Однак, цей термін є ще досить тривалим, тому експериментальне інфікування використовуються переважно з науковою метою, а не для лабораторної діагностики.

Диференційна діагностика штамів PrP^{SC} у ВРХ. В останні кілька років було виявлено та диференційовано два нейропатологічно та молекулярно атипичних фенотипи GE ВРХ у кількох європейських країнах та Японії [63, 64, 74, 75]. Один з цих фенотипів був виявлений в Італії, де було з'ясовано, що корови, хворі на нетипову форму GE ВРХ, мають інший характер накопичення патологічного пріона в головному мозку та відмінності у профілі глікоформ PrP^{SC} [4]. Так, при нетиповій формі GE ВРХ виявлено значний вміст амілоїд-подібних фібрил у головному мозку, що не характерно для GE ВРХ. Також змінюється локалізація агрегатів патологічного пріона з зони затулки довгастого мозку при GE ВРХ на зони нюхового тракту, гіпокампі, таламус та гіпоталамус при нетиповій формі [4]. Оскільки при її виникненні у тварин спостерігається накопичення амілоїд-подібних агрегатів PrP^{SC}, ця форма була названа губчастою подібна амілоїдна енцефалопатія великої рогатої худоби — ГАЕ ВРХ [59].

Диференційна діагностика ГАЕ ВРХ базується на детекції амілоїд-подібних фібрил у різних ділянках головного мозку, про які було згадано вище. Це здійснюється за допомогою методів гістохімії, імуногістохімії та електронної мікроскопії. Для гістохімічних досліджень використовують барвник Конго червоний, який має здатність специфічно зв'язувати амілоїдні структури, при цьому відбувається зміна його забарвлення у поляризованому світлі з червоного на зелений [76–78]. Але даний тест не може бути використаним для діагностування ГАЕ ВРХ, оскільки Конго червоний зв'язується з усіма амілоїдними чи амілоїд-подібними фібрилами, що перешкоджає його застосуванню як окремого діагностичного теста [79].

Другим підходом при диференційній діагностиці пріонних інфекцій у великої рогатої худоби є порівняльний аналіз профілів глікоформ PrP^{SC}, названі також називають «молекулярними підписами», які дещо відрізняються при GE ВРХ та ГАЕ ВРХ. Відомо, що при імуноблот-аналізі патологічного пріона виявляється три його ізоформи, які, як було з'ясовано, є глікоформами. Виявлено, що ці три глікоформи відповідають ди-, моно- та деглікозильовані формам пріону. Різниця ж у профілах цих глікоформ при ГАЕ ВРХ полягає у збільшенні електрофоретичної рухливості всіх трьох ізоформ PrP^{SC}, тобто їх молекулярна маса зменшується з 29, 25 та 19 кДа для ди-, моно- та деглікозильованої форм при GE ВРХ до 27, 23 та 17 кДа при ГАЕ ВРХ, відповідно [4]. Крім зниження молекулярної маси, при ГАЕ ВРХ відзначається зміна співвідношення глікоформ PrP^{SC}. Так, якщо при GE ВРХ переважає диглікозильована форма патологічного пріона, а моно- і деглікозильовані ізоформи є в меншій кількості, то при ГАЕ ВРХ значно зростає частка деглікозильованої форми на фоні зниження частки диглікозильованої глікоформи PrP^{SC} (рис. 3) [4, 60].

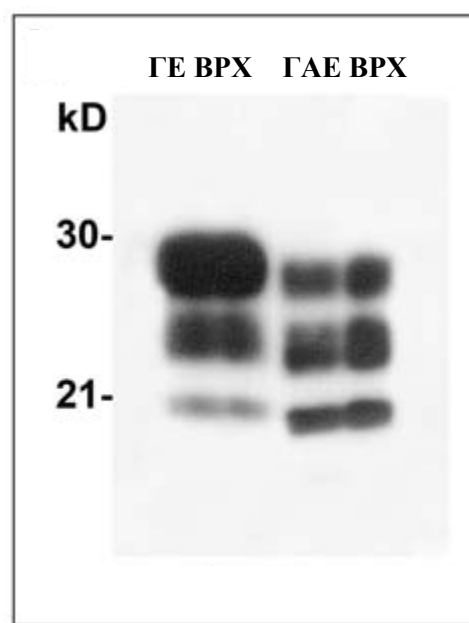


Рис.3. Профіль експресії глікоформ PrP^{SC} при GE ВРХ та ГАЕ ВРХ [59].

Отже, стратегія диференційної діагностики ГАЕ ВРХ полягає у детекції, передусім, нетипового профілю експресії глікоформ PrP^{SC} з наступним виявленням амілоїд-подібних фібрил у різних частинах головного мозку.

Проблеми та перспективи діагностики ТСЕ

Слід відзначити, що всі вищеописані методи дозволяють діагностувати пріонні інфекції посмертно. Головним невирішеним питанням та проблемою є прижиттєва діагностика ТСЕ. Хоча на даному етапі не існує тест-системи, яка б відповідала всім вимогам, проте вже зараз зроблено ряд важливих кроків на шляху створення такого діагностичного методу. Зокрема, групою проф. Сото з Техаського університету розроблено метод РМСА (Protein Misfolding Cyclic Amplification), який дозволяє детектувати 12 молекул патологічного пріона у пробі [80]. Суть даного методу полягає у індукції ампліфікації патологічного пріона, який міститься у досліджуваному матеріалі, за рахунок додавання фізіологічного пріона, який міститься у великій кількості у гомогенаті мозку здорових тварин. Після інкубації, суміш PrP^{SC} та PrP^C піддають дії ультразвуку, що збільшує кількість центрів конверсії PrP^C→PrP^{SC}. Таким чином має місце лавиноподібне зростання кількості молекул патологічного пріона, кількість яких робить можливим застосування стандартних тест-систем, таких як імуноблот-аналіз. На основі РМСА автори розробили тест-систему,

яка дозволяє проводити прижиттєву діагностику ТСЕ шляхом дослідження крові. І все ж, дана методика має ряд недоліків, основним з яких є важка відтворюваність результатів, що зумовлює значні труднощі у його впровадженні у практику.

Велика увага звертається на пошук непріонних маркерів ТСЕ, які б могли використовуватися для діагностики пріонних інфекцій. У різний час на таку роль претендували білок 14–3–3, гліальний фібрилярний ацидофільний протеїн, білок S100, нейрон–специфічна енолаза тощо [81]. Але всі вони не виявили чутливості та специфічності, достатніх для прижиттєвого діагностування ТСЕ.

Іншим підходом, який використовується для діагностування ТСЕ у живих тварин, є виявлення патологічного пріона у нестандартному біологічному матеріалі. Зокрема, з'явилися повідомлення про виявлення PrP^{Sc} у сечі [82]. При чому це вдалося зробити, застосовуючи стандартний протокол імуноблот–аналізу. Проте, при перевірці цих результатів з'ясувалося, що внаслідок артефакту, білок, який вчені приймали за патологічний пріон, виявився мембранним протеїном бактерій, який перехресно взаємодіяв з антитілами до пріон–протеїну [83].

Крім вищеописаних молекулярно–біологічних методів для прижиттєвої діагностики ТСЕ застосовувалися фізико–хімічні підходи. Так, компанією DiaSpec було розроблено тест для прижиттєвої діагностики ТСЕ шляхом дослідження крові [84–86]. Тест базувався на методі Фур'є–трансформуючої інфрачервоної спектроскопії (ФТІС). На думку авторів, при накопиченні у крові патологічного пріона, відбувається зміна її оптичних властивостей, яку можна зареєструвати методом ФТІС. Але, цей тест не пройшов апробації Комісії Європейського Союзу, оскільки його показники чутливості та специфічності були дуже низькими [87].

Зараз Комісією Європейського Союзу є затверджено 11 тестів для посмертної діагностики ТСЕ, серед яких є тест–системи фірм Prionics, BioRad, IDEXX, R–Biopharm тощо [88].

Деякі білки, які за фізіологічних умов присутні у клітинах ссавців, виділяються у підвищених кількостях у спинномозкову рідину в результаті пошкодження тканин центральної нервової системи. Було зроблено припущення, що ці зміни можуть бути хворобоспецифічними і їх дослідження може бути використане при діагностиці тієї чи іншої хвороби. Проте, ймовірно, що тести які базуються на детекції таких змін можуть зафіксувати лише пізні стадії інфекції, коли клінічні ознаки вже неминучі чи видимі.

У червні 2005р., канадійська компанія Canadian Vacci–Test™ Corporation («VTC») розробила тест для детекції інфекційних мозкових хворіб у живих тварин, в тому числі для БСЕ. Було задекларовано, що Vacci–Test детектує маркер нейрональних пошкоджень у центральній нервовій системі — білок 14–3–3. Даний білок належить до регуляторних молекул, які експресуються в клітинах еукаріот. Назва 14–3–3 походить від особливостей електрофоретичної рухливості цього білка.

Vacci–Test досі не затверджений EFSA, проте підвищений рівень білка 14–3–3 у спинномозковій рідині був затверджений WHO (The World Health Organization) для діагностики КЯХ [81, 89]. Провідні спеціалісти з питань ТСЕ зробили дуже скептичні коментарі стосовно 14–3–3 тесту. Зокрема, було зазначено, що тест на визначення білка 14–3–3 у спинномозковій рідині придатний для діагностики КЯХ тільки поруч із іншими діагностичними тестами [90]. 14–3–3 тест не є придатним як загальний скринінговий тест для КЯХ, хоча б тому, що інші захворювання, які дають позитивний результат при використанні цього тесту, є дуже чисельними (енцефалітний герпес та інші вірусні енцефаліти, кровотеча при ішемічному інсульті, гіпоксичне ушкодження мозку, гліобластома, раковий менінгіт, тощо) [91].

ТСЕ тести які затверджені United States Department of Agriculture (USDA) та Animal and Plant Health Inspection Service це: Rapid tests/screening tests Bio–Rad TeSeEc, VMRD CWD dbELISA, BioRad CWD ELISA, IDEXX HerdChek CWD Antigen EIA Test, PDL CWD Rapid Antigen Test, Ventana IHC Systems, а також VMRD Prion Protein Detection Kit. Більшість з них використовуються для виявлення ТСЕ у мулів, оленів та лосів. На даний момент, немає тесту який би був затверджений USDA для детекції БСЕ у живих тварин [3].

В 1993 році в Канаді було виявлено патологічний пріон в м'ясній корові, імпортованої з Великої Британії в 1987 році. Тварину було знищено і, одразу ж, уряд прийняв міри, які мали за мету зниження ризику, якому піддавалася канадська худоба у зв'язку з даним випадком. Завдяку функціонуванню канадської програми спостереження за поширенням БСЕ, було виявлено три випадки БСЕ з 2003 року. Перший випадок було зафіксовано 20 травня 2003 року. Тварину теж було знищено, завдяки чому її м'ясо не потрапило у харчовий ланцюг. Організація CFIA (Canadian Food Inspection Agency) повідомила про дослідження двох тисяч тварин, які перебували в контакті з хворою коровою, на БСЕ. Всі вони дали негативний результат. Другий та третій випадки трапилися 2 та 11 січня 2005 року, відповідно. М'ясо жодної з цих тварин не потрапило у харчовий ланцюг. Детальні дослідження по цим двом випадкам продовжуються і досі. Слід також відзначити, що моніторинг БСЕ ведеться у Канаді з 1990 року.

Дані про всі випадки підозри на БСЕ мають бути передані у CFIA, яка є відповідальною за програми збереження здоров'я тварин та контролю за хворобами. Оскільки досі не існує прийнятого тесту для дослідження БСЕ у живих тварин, діагноз на дане захворювання підтверджується лише посмертно, аналізом мозку методом імуногістохімії, який також є «золотим стандартом» для підтверджуючого діагностування в Канаді. Дана процедура підтвердження діагнозу займає п'ять днів. CFIA затвердила декілька швидких тестів на БСЕ, з яких наразі використовується половина. AAFRD (Alberta Agriculture, Food and Rural Development) використовує тест Bio-Rad TeSeE® ELISA для швидкого скринінгу БСЕ. Цей тест виконується у лабораторіях з підвищеним другим рівнем біологічної небезпеки.

Говорячи про діагностику БСЕ в Україні, слід відзначити, що за моніторинг БСЕ відповідальна Центральна лабораторія ветеринарної медицини (ЦЛВМ) в Києві. Україна належить до «БСЕ-вільних» країн. Але цей факт є спірним, зважаючи на невелику кількість тестів на БСЕ, які були виконані. Більше того, завдяки добре організованій системі діагностики БСЕ було виявлено 50 випадків хвороби в Польщі та 20 — в Словаччині — країнах, які мають спільний кордон з Україною.

ЦЛВМ використовує три методи для діагностики БСЕ. Це є гістологічний, імуногістохімічний та імуноблот методи, останній з яких виконується на наборі фірми Prionics.

Підводячи підсумки можна стверджувати, що головним і відкритим досі є питання прижиттєвої діагностики ТСЕ. І саме ця проблема є першочерговою для вирішення у галузі лабораторної діагностики пріонних інфекцій в майбутньому.

V. V. Vlizlo, Ch. Ya. Mayor, P. I. Verbitskii, V. V. Stadnyk

THE LABORATORY DIAGNOSTICS OF TRANSMISSIBLE SPONGYFORM ENCEPHALOPATHIES (TSE): PRESENT STATE AND PROSPECTS

S u m m a r y

The accumulation of PrP^{SC}, the protease-resistant abnormal form of the host-encoded cellular prion protein, PrP^C, plays a central role in transmissible spongiform encephalopathies. Highly sensitive/accurate specific detection of pathological prion protein in many different samples is a prerequisite for attempts to develop reliable detection methods. In this review, we describe the trend in recent development of diagnostic methods for prion diseases and their applications in prion biology.

1. *Prusiner S. Prions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — №95. — P.13363–13383.*
2. *A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy / Wilesmith J., Wells G., Ryan J. et al. // Vet. Rec. — 1997. — Vol.141. — P.239–243.*
3. *Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases / Gavier-Widen D., Biacabe A-G., Laplanche J-L., Ryder S., Baron T. // EMBO. — 2004. — Vol.5. — P.110–115.*

4. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt–Jakob disease / Casalone C., Zanusso G., Acutis P. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol101. — P.3065–3070.
5. Transmissible subacute spongiform encephalopathies: prion diseases, ed. / Court L., Dodet B. // Elsevier, Paris, 1996. — 158 pp.
6. Biology of PrPsc accumulation in two natural scrapie–infected sheep flocks / Caplazi P., O'Rourke K., Wolf C. et al. // J. Vet. Diagn. Invest. — 2004. — Vol16. — P.489–496.
7. Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy / Ryder S., Dexter G., Bellworthy S., Tongue S. // Res. Vet. Sci. — 2004. — Vol76. — P.211–217.
8. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98 / Benestad S.L., Sarradin P., Thu B. et al. // Vet. Rec. — 2003. — Vol.153. — P.202–208.
9. *Williams E., Miller M.* Chronic wasting disease in deer and elk in North America // Rev. Sci. Tech. — 2002. — Vol21. — P.305–316.
10. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier / Bruce M., Chree A., Mc Connell I. et al. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Sci. — 1994. — Vol.343. — P.405–411.
11. Naturally occurring scrapie–like spongiform encephalopathy in five domestic cats / Wyatt J., Pearson G., Smerdon T. et al. // Vet. Rec. — 1991. — Vol.129. — P.233–236.
12. Transmissions to mice indicate that «new variant» CJD is caused by the BSE agent / Bruce M. E., Will R. G., Ironside J. et al. // Nature. — 1997. — Vol.389. — P.498–501.
13. Molecular analysis of prion strain variation and the etiology of «new variant» CJD / Collinge J., Sidle K., Meads J., et al. // Nature. — 1996. — Vol.383. — P.685–690.
14. *Gavier–Widen D., Jeffrey M., Gonzalez L.* Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie // Curr. Topics. Microbiol. Immunol. — 2004. — Vol.284. — P.65–97.
15. *Spraker T., Balachandran ., Zhuang D., O'Rourke K. I.* Variable patterns of distribution of PrPCWD in the obex and cranial lymphoid tissues of Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with subclinical chronic wasting disease // Vet. Rec. — 2004. — Vol.155. — P.295–302.
16. Distribution of protease–resistant prion protein and spongiform encephalopathy in free–ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease / Spraker T., Zink R., Cummings B. et al. // Vet. Pathol. — 2002. — Vol.39. — P.546–556.
17. *Wells G., Hancock R., Cooley W., Richards M.* Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata // Vet. Rec. — 1989. — Vol.125. — P.521–524.
18. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle / Wells G., Scott A., Johnson C., Gunning R. et al. // Vet. Rec. — 1987. — Vol.121. — P.419–420.
19. *Williams E. S., Young S.* Neuropathology of chronic wasting disease of mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus nelsoni*) // Vet. Pathol. — 1993. — Vol.30. — P.36–45.
20. *Jeffrey M., Martin S., Gonzal'ez L.* Cell–associated variants of disease–specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy // J. Gen. Virol. — 2003. — Vol.84. — P.1033–1046.
21. Prion proteins: Physiological functions and role in neurological disorders / Hu W., Kieseier B., Frohman E. et al. // J Neurol Sci. — 2007. — [Epub ahead of print].
22. *Hu W., Rosenberg R., Stuve O.* Prion proteins: a biological role beyond prion diseases. Acta // Neurol. Scand. — 2007. — Vol.116, N.2. — P.75–82.
23. *Fraser J.* What is the basis of transmissible spongiform encephalopathy induced neurodegeneration and can it be repaired? // Neuropathol. Appl. Neurobiol. — 2002. — Vol.28. — P.1–11.
24. *Prusiner S.* Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie // Science. — 1982. — Vol.216. — P.136–144.

25. A hypothesis on prion disorders: are infectious, inherited, and sporadic causes so distinct? / Fornai F., Ferrucci M., Gesi M. et al. // *Brain. Res. Bull.* — 2006. — Vol.69, N.2. — P.95–100.
26. Prion–protein immunoreactivity in human transmissible dementias / Roberts G. W., Lofthouse R., Brown R. et al. // *N. Engl. J. Med.* — 1986. — Vol.315, N.19. — P.1231–1233.
27. Identification of an epitope in the C–terminus of normal prion protein whose expression is modulated by binding events in the N–terminus / Li R., Liu T., Wong B.–S. et al. // *J. Mol. Biol.* — 2000. — Vol.301. — P.567–574.
28. Prion protein expression in different species: analysis with a panel of new mAbs / Zanusso G. Liu D., Ferrari S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — Vol.95. — P.8812–8816.
29. *Heppner F., Aguzzi A.* Recent developments in prion immunotherapy // *Curr. Opin. Immunol.* — 2004. — Vol.16, N.5. — P.594–608.
30. *Aguzzi A., Heikenwalder M.* Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2006. — Vol.4, N.10. — P.765–75.
31. *Korth C., Streit P., Oesch B.* Monoclonal antibodies specific for the native, disease–associated isoform of the prion protein // *Methods. Enzymol.* — 1999. — Vol.309. — P.106–22.
32. *McKinley M., Bolton D., Prusiner S.* A proteaseresistant protein is a structural component of the scrapie prion // *Cell.* — 1983. — Vol.35. — P.57–62.
33. *Scott A., Wells G., Stack M.* Bovine spongiform encephalopathy: detection and quantitation of fibrils, fibril protein (PrP) and vacuolation in brain // *Vet. Microbiol.* — 1990. — Vol.23, N.1–4. — P.295–304.
34. *Bockman J., Kingsbury D.* Immunological Analysis of Host and Agent Effects on Creutzfeldt–Jakob Disease and Scrapie Prion Proteins // *J. Virol.* — 1988. — Vol.62, N.9. — P.3120–3127.
35. *Serban D., Taraboulos A., DeArmond S., Prusiner S.* Rapid detection of Creutzfeldt–Jakob disease and scrapie prion proteins // *Neurology.* — 1990. — Vol.40, N.1. — P.110–117.
36. Western blot mapping of disease–specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high–yield purification method / Beekes M., Baldauf E., Cassens S. et al. // *J. Gen. Virol.* — 1995. — Vol.76, N.10. — P.2567–2576.
37. Characterisation of antisera raised against species–specific peptide sequences from scrapie–associated fibril protein and their application for post–mortem immunodiagnosis of spongiform encephalopathies / Oberdieck U., Xi Y., Pocchiari M., Diringier H. // *Arch. Virol.* — 1994. — Vol.136, N.1–2. — P.99–110.
38. *Somerville R. A., Birkett C. R., Farquhar C.F.* Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie–infected sheep but not BSE–infected cows // *J. Gen. Virol.* — 1997. — Vol.78, N.9. — P.2389–2396.
39. Prionics, OIE: 2004, Bovine spongiform encephalopathy / In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*, ed. Office International des Epizooties, 5th ed. — OIE, Paris. — Vol I. — P. 549–569. 64. OIE: 2004, Scrapie / In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*, ed. Office International des Epizooties, 5th ed. — OIE, Paris. — Vol I. — P. 642–653.
40. *Lanea A., Stanley C., Dealler S., Wilson S.* Polymeric Ligands with Specificity for Aggregated Prion Proteins // *Clinical Chemistry.* — 2003. — Vol.49. — P.1774–1775.
41. Immunochemical detection of prion protein on dipsticks prepared with crystalline bacterial cell–surface layers / Völkel D., Zimmermann K., Breitwieser A. et al. // *Transfusion.* — 2003. — Vol.43, N.12. — P.1677–1682.
42. *Triantaphyllidou I. E., Sklaviadis T., Vynios D. H.* Detection, quantification, and glycotyping of prion protein in specifically activated enzyme–linked immunosorbent assay plates // *Anal. Biochem.* — 2006. — Vol.359, N.2. — P.176–182.
43. Novel Antibody–Lectin Enzyme–Linked Immunosorbent Assay That Distinguishes Prion Proteins in Sporadic and Variant Cases of Creutzfeldt–Jakob Disease / Pan T., Li R., Wong B. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — Vol.43, N.3. — P.1118–26.

44. *Thackray A., Hopkins L., Bujdoso R.* Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay // *Biochem. J.* — 2007. — Vol. 401, N.2. — P.475–83.
45. Test for detection of disease-associated prion aggregate in the blood of infected but asymptomatic animals / *Chang B., Cheng X., Yin S. et al.* // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2007. — Vol.14, N.1. — P.36–43.
46. An aggregation-specific enzyme-linked immunosorbent assay: detection of conformational differences between recombinant PrP protein dimers and PrP(Sc) aggregates / *Pan T., Wong P., Li C. et al.* // *J. Virol.* — 2005. — Vol.79. — P.12355–12364.
47. Scrapie prion liposomes and rods exhibit target sizes of 55,000 Da / *Bellinger-Kawahara C., Kempner E., Groth D. et al.* // *Virology.* — 1988. — Vol.164. — P.537–541.
48. The most infectious prion protein particles / *Silveira J., Hughson A., Race R. et al.* // *Nature.* — 2005. — Vol.437. — P.257–61.
49. *Zhang H., Richter M., Greene M. I.* A sensitive and high throughput assay to detect low-abundance proteins in serum // *Nat. Med.* — 2006. — Vol.12. — P.473–477.
50. *Kang S., Li R., Wang C.* Guanidine hydrochloride extraction and detection of prion proteins in mouse and hamster prion diseases by ELISA // *J Pathol.* — 2003, Apr;199(4):534–41.,
51. Detection of Bovine Spongiform Encephalopathy-Specific PrP^{Sc} by Treatment with Heat and Guanidine Thiocyanate. / *Meyer R., Oesch B., Fatzer R., Zurbriggen A., Vandeveld M.* // *J. Virol.* — 1999. — Vol.73, N.11. — P.9386–9392.
52. Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP): Categorisation of biological agents according to hazard and categories of containment / 4th ed. — 1995. — HSE Books, Sudbury, UK.
53. *Polak M., Rożek W., Żmudziński J.* Implementation of Dot-Blot In Rapid Diagnosis Of BSE // *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* — 2005. — Vol.49. — P.263–266.
54. *Vernino S., Geschwind M., Boeve B.* Autoimmune encephalopathies // *Neurologist.* — 2007. — Vol.13, N.3. — P.140–147.
55. *Вербицький П., Влізло В., Ложкіна О.* Діагностика трансмісивних спонгіформних енцефалопатій у тварин // *Вет. мед. України.* — 2003. — № 1. — С. 15–17.
56. *Huang H., Rendulich J., Stevenson D.* Evaluation of Western blotting methods using samples with or without sodium phosphotungstic acid precipitation for diagnosis of scrapie and chronic wasting disease // *The Canadian Journal of Veterinary Research.* — 2005. — Vol.69. — P.193–199.
57. Tissue distribution of protease resistant protein in variant Creutzfeldt–Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay / *Wadsworth J., Joiner S., Hill A. et al.* // *The Lancet.* — 2001. — Vol.358. — P.171–180.
58. Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations / *Safar J., Wille H., Itri V. et al.* // *Nat. Med.* — 1998. — Vol.4. — P.1157–1165.
59. *Beekes M., Baldauf E., Cassens S.* Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method // *Gen. Virol.* — 1995. — Vol.76, N.10. — P.2567–2576.
60. Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE? / *Capobianco R., Casalone C., Suardi S. et al.* // *PLoS Pathog.* — 2007. — V.3, №3. — P.0001–0008.
61. *Gonzalez L., Chianini F., Martin S.* Comparative titration of experimental ovine BSE infectivity in sheep and mice // *J. Gen. Virol.* — 2007. — Vol.88, N.2. — P.714–717.
62. *Espinosa J., Andreoletti O., Castilla J.* Sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice // *J. Virol.* — 2007. — Vol.81, N.2. — P.835–843.
63. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases / *Biacabe A., Laplanche J., Ryder S. et al.* // *EMBO J.* — 2004. — №5. — P.10–14.
64. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeld–Jakob disease / *Casalone C., Zanusso G., Acutis P. et al.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2004. — №101. — P.3065–3070.

65. Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of Western blotting and immunohistochemical methods / Lezmi S., Martin S., Simon S. et al. // *J. Virol.* — 2004. — Vol.78. — P.3654–3662.

66. *Stack M., Chaplin M., Clark J.* Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies // *Acta Neuropathol. (Berl.)*. — 2002. — Vol.104. — P.279–286.

67. Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein / Thuring C., Erkens J., Jacobs J. et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol.42. — P.972–980.

68. *Jeffrey M., Martin S., Gonza'lez L.* Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy // *J. Gen. Virol.* — 2003. — Vol.84. — P.1033–1046.

69. Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep / Jeffrey M., Martin S., Gonza'lez L. et al. // *J. Comp. Pathol.* — 2001. — Vol.125. — P.271–284.

70. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to onset of clinical disease after oral challenge / Bellworthy S., Hawkins S., Green R. et al. // *Vet. Rec.* — 2005. — Vol.156. — P.197–202.

71. Primary isolation of the bovine spongiform encephalopathy agent in mice: agent definition based on a review of 150 transmissions / Green R., Horrocks C., Wilkinson A. et al. // *J. Comp. Pathol.* — 2005. — Vol.132. — P.117–131.

72. Transmission of prions from mule deer and elk with chronic wasting disease to transgenic mice expressing cervid PrP / Browning S., Mason G., Sewald T., et al. // *J. Virol.* — 2004. — Vol.78. — P.13345–13350.

73. Prion diseases: diagnosis and pathogenesis / ed. H Kretzschmar. — Springer Verlag, Vienna. — 2000. — 254 pp.

74. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer / Yamakawa Y., Hagiwara K., Nohtomi K. et al. // *Jpn. J. Infect. Dis.* — 2003. — Vol.56. — P.221–222.

75. *De Bosschere H., Roels S., Vanopdenbosch E.* Atypical case of bovine spongiform encephalopathy in an east Flemish cow in Belgium // *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* — 2004. — Vol.2. — P.52–54.

76. *Alder H., Reimann F.* Beitrag zur Funktionsprüfung des retikuloendothelialen Apparates // *Z. Exp. Med.* — 1925. — Vol.47. — P.617–633.

77. *DeLellis R., Glenner G., Ram J.* Histochemical observations on amyloid with reference to polarization microscopy // *J. Histochem. Cytochem.* — 1968. — Vol.16. — 663–665.

78. *Steensma D.* «Congo» red: out of Africa? // *Arch. Pathol. Lab. Med.* — 2001. — Vol.125. — P.250–252.

79. *Frid P., Anisimov S., Popovic N.* Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases // *Brain. Res. Rev.* — 2007. — Vol.53, N.1. — P.135–160.

80. *Saborio G., Permanne B., Soto C.* Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding // *Nature*. — 2001. — Vol.14, N.411. — P.810–813.

81. Brain-derived proteins in the CSF: do they correlate with brain pathology in CJD? / Boesenberg-Grosse C., Schulz-Schaeffer W., Bodemer M. et al. // *BMC Neurol.* — 2006. — Vol. 21. — P.6–35.

82. *Shaked G., Shaked Y., Kariv-Inbal Z.* A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol.276, N.34. — P.31479–31482.

83. A pitfall in diagnosis of human prion diseases using detection of protease-resistant prion protein in urine. Contamination with bacterial outer membrane proteins / Furukawa H., Doh-ura K., Okuwaki R. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol.279, N.22. — P.23661–23667.

84. Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein / Thomzig A., Spassov S., Friedrich M. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol.279, N.32. — P.33847–54.
85. *Spassov S., Beekes M., Naumann D.* Structural differences between TSEs strains investigated by FT–IR spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — Vol.1760, N.7. — P.1138–49.
86. *Beekes M., Lasch P., Naumann D.* Analytical applications of Fourier transform–infrared (FT–IR) spectroscopy in microbiology and prion research // *Vet. Microbiol.* — 2007. — Vol.123, N.4. — P.305–19.
87. *Philipp W., Kollmorgen N., Schimmel H., van Iwaarden P.* The evaluation of DiaSpec's ante mortem BSE test // European Commission, Joint Research Centre. — 2003. — 30 pp.
88. Annex X of Regulation 999/20017 // *Official Journal of the European Communities.* — Vol.44, N147. — P.1–40.
89. *Green A.* Use of 14–3–3 in the diagnosis of CJD disease // *Biochemical Society Transaction.* — 2002. — Vol.30. — Part 4
90. Analyses of 14–3–3 protein in the cerebrospinal fluid in Creutzfeldt–Jakob disease. Preliminary report. / *Golańska E., Hulaś–Bigoszevska K., Sikorska B., Liberski P.* // *Neurol. Neurochir. Pol.* — 2005. — Vol.39, N.5. — P.358–65.
91. <http://www.cjd.ed.ac.uk/index.htm>.