

## Прижизненная диагностика прионных болезней

Кальнов С.Л.<sup>1</sup>, Верховский О.А.<sup>2</sup>, Цибезов В.В.<sup>1</sup>, Алексеев К.П.<sup>1</sup>, Чудакова Д.А.<sup>3</sup>, Филатов И.Е.<sup>1</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

<sup>2</sup>АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Школа биологических наук, Оклендский университет, Окленд 1010, Новая Зеландия

В обзоре представлено современное состояние проблемы диагностики прионных болезней (ПБ) человека и животных с кратким описанием их этиологии и патогенеза. Показано, что понимание природы этиологического агента ПБ определило их зоонозный потенциал и привело к развитию высокоспецифичных иммунологических методов диагностики, направленных на выявление инфекционной изоформы прионного белка (PrP<sup>d</sup>) как единственного маркера заболевания. В этой связи кратко приведены результаты исследований, включая собственные, касающиеся конверсии нормальных молекул прионного белка (PrP<sup>c</sup>) в PrP<sup>d</sup>, получения моноклональных антител (МКАТ) и их апробации в качестве иммунодиагностических реагентов для посмертного выявления PrP<sup>d</sup> в различных форматах иммуноанализа. Особо выделен вопрос, связанный с разработкой методов прижизненной диагностики ПБ. В связи с этим подробно рассматривается методика амплификации аминокислотных последовательностей с использованием индуцированной вибрацией конверсии PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup> в режиме реального времени (ИВК-РВ). Приводятся результаты последних исследований по оценке чувствительности, специфичности и воспроизводимости данного метода, проведённых в различных лабораториях мира. Полученные данные свидетельствуют о том, что ИВК-РВ в настоящее время является наиболее перспективным лабораторным методом исследования для выявления PrP<sup>d</sup> в биологическом материале на доклинической стадии заболевания. Отмечен значительный вклад учёных США во внедрение данной методики в клиническую практику на модели диагностики хронической изнуряющей болезни диких копытных (ХИБ). Возможное дальнейшее распространение ХИБ в популяциях лосей и оленей на межграницных с Россией территориях, также как и установленный факт алиментарной передачи ХИБ макакам, свидетельствуют об угрозе появления ПБ в нашей стране. В заключение подчеркнута важность разработки новых сверхчувствительных и/или селективных компонентов известных методов идентификации PrP<sup>d</sup> с точки зрения оценки рисков создания искусственных инфекционных прионных белков *in vivo* или *in vitro*, прежде всего новых патогенных изоформ («штаммов») и синтетических прионов.

**Ключевые слова:** прионные болезни; инфекционный прионный белок PrP<sup>d</sup>; белковая амплификация; метод ИВК-РВ; хроническая изнуряющая болезнь диких копытных (ХИБ).

**Для цитирования:** Кальнов С.Л., Верховский О.А., Цибезов В.В., Алексеев К.П., Чудакова Д.А., Филатов И.Е., Гребенникова Т.В. Прижизненная диагностика прионных болезней. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(6): 326-334. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-3>

**Для корреспонденции:** Гребенникова Татьяна Владимировна – д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. E-mail: [t\\_grebennikova@mail.ru](mailto:t_grebennikova@mail.ru)

**Участие авторов:** Кальнов С.Л. – написание текста, сбор и обработка материалов; Цибезов В.В. – экспериментальные исследования; Алексеев К.П. – написание текста, экспериментальные исследования; Филатов И.Е. – экспериментальные исследования; Гребенникова Т.В. – резюме, заключение, общая редакция; Верховский О.А. – написание текста, сбор и обработка материалов; Чудакова Д.А. – сбор и обработка материалов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.10.2020

Принята в печать 12.11.2020

## Problems of ante mortem diagnostics of prion diseases

Sergey L. Kal'nov<sup>1</sup>, Oleg A. Verkhovsky<sup>2</sup>, Valery V. Tsibezov<sup>1</sup>, Konstantin P. Alekseev<sup>1</sup>, Daria A. Chudakova<sup>3</sup>, Ilya E. Filatov<sup>1</sup>, Tatyana V. Grebennikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBI «National Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>ANO «Diagnostic and Prevention for Human and Animal Diseases Research Institute», Moscow, 123098, Russia;

<sup>3</sup>School of Biological sciences, University of Auckland, Auckland 1010, New Zealand

The review presents the state-of-the-art on the problem of diagnosis of prion diseases (PD) in humans and animals with a brief description of their etiology and pathogenesis. We pointed out that understanding the nature of the etio-

logical agent of PD determined their zoonotic potential and led to the development of highly specific immunological diagnostic methods aimed at identifying the infectious isoform of prion protein (PrP<sup>d</sup>) as the only marker of the disease. In this regard, we briefly summarize the results of studies, including our own, concerning the conversion of normal prion protein molecules (PrP<sup>c</sup>) to PrP<sup>d</sup>, the production of monoclonal antibodies and their application as immunodiagnostic reagents for the post-mortem detection of PrP<sup>d</sup> in various formats of immunoassay. We also emphasize the issues related to the development of methods for ante mortem diagnostics of PD. In this regard, a method for amplifying amino acid sequences using quacking-induced conversion of PrP<sup>c</sup> to PrP<sup>d</sup> in real time (RT-QulC) described in details. The results of recent studies on the assessment of the sensitivity, specificity and reproducibility of this method, carried out in various laboratories around the world, are presented. The data obtained indicate that RT-QulC is currently the most promising laboratory assay for detecting PrP<sup>d</sup> in biological material at the preclinical stage of the disease. The significant contribution of US scientists to the introduction of this method into clinical practice on the model of diagnosis of chronic wasting disease of wild *Cervidae* (CWD) is noted. The possible further spread of CWD in the population of moose and deer in the territories bordering with Russia, as well as the established fact of alimentary transmission of CWD to macaques, indicate the threat of the appearance of PD in our country. In conclusion, the importance of developing new hypersensitive and/or selective components of known methods for PrP<sup>d</sup> identification from the point of view of assessing the risks of creating artificial infectious prion proteins *in vivo* or *in vitro*, primarily new pathogenic isoforms ("strains") and synthetic prions, was outlined.

**Keywords:** prion diseases; infectious prion protein PrP<sup>d</sup>; protein amplification; RT-QulC; chronic wasting disease (CWD).

**For citation:** Kal'nov S.L., Verkhovsky O.A., Tsibezov V.V., Alekseev K.P., Chudakova D.A., Filatov I.E., Grebennikova N.V. Problems of ante mortem diagnostics of prion diseases. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(6): 326-334. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-3>

**For correspondence:** Tatyana V. Grebennikova, Ph.D., D.Sci. (Biol.). Prof., Corresponding Member of RAS, Head of Laboratory, FSBI «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russia. E-mail: [t\\_grebennikova@mail.ru](mailto:t_grebennikova@mail.ru)

**Information about authors:**

Kal'nov S.L., <https://orcid.org/0000-0002-3130-4790>  
 Verkhovsky O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>  
 Tsibezov V.V., <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>  
 Alekseev K.P., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>  
 Chudakova D.A., <https://orcid.org/0000-0002-9354-6824>  
 Filatov I.E., <https://orcid.org/0000-0001-5274-224X>  
 Grebennikova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

**Contribution:** Kalnov S.L. – writing of the text, collection and processing of materials; Tsibezov V.V. – experimental studies; Alekseev K.P. – writing of the text, Filatov I.E. – experimental studies; Grebennikova T.V. – conclusion, summary, general edition; Verkhovsky O.A. – writing of the text, collection and processing of materials; Chudakova D.A. – collection and processing of materials.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 23 October 2020  
 Accepted 12 November 2020

Согласно существующей классификации прионные болезни (ПБ) человека и животных, патогенетически объединённые в понятие «трансмиссивные губкообразные энцефалопатии», относят к большой группе амилоидозов, основным патогномичным признаком которых является образование так называемых амилоидных бляшек, или амилоида. Главным его компонентом являются фибриллы – нитевидные структуры, формируемые одним из белков поражённого организма, изменившим свою нативную конформацию и приобретшим способность к агрегации, а также высокую устойчивость к клеточным протеазам [1–3]. Природа этиологического агента ПБ на модели скрепи овец была расшифрована в результате исследований нобелевского лауреата Стенли Бенджамина Прузинера (Stanley Benjamin Prusiner), который доказал инфекционность единственного белка организма, полностью лишённого нуклеиновых кислот и кодируемого клеточным геномом [4]. Исследователь назвал этот агент прионом (PrP). Возникновение ПБ связано с изменением пространственной структуры гликопротеина клеточ-

ной мембраны PrP<sup>c</sup>, приводящим к его переходу в патогенную изоформу (PrP<sup>d</sup>), способную, в свою очередь, вызывать конформационную перестройку в других контактирующих с ней молекулах PrP<sup>c</sup>. Таким образом, события, происходящие при развитии данных заболеваний, представляются аналогичными цепным автокаталитическим реакциям [5, 6].

Следует подчеркнуть, что аминокислотные последовательности PrP<sup>c</sup> и PrP<sup>d</sup> абсолютно идентичны, однако вследствие такого конформационного перехода изменяются структура и свойства молекулы. Так, во вторичной структуре функционирующей молекулы PrP<sup>c</sup> преобладают α-спиральные участки – в их состав включено около 40% аминокислотных остатков, тогда как β-слои практически отсутствуют (3%). Для PrP<sup>d</sup> характерно увеличенное содержание β-структур (более 40%), состоящих из большого количества аминокислотных остатков, ранее находившихся в составе спиралей, а также образование в различных областях головного мозга агрегатов в виде спирализованных фибрилл, называемых также скре-

пи-ассоциированными фибриллами (САФ) [7–10]. К наиболее изученным ПБ животных относят скрепи овец, губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота (ГЭ КРС), хроническую изнуряющую болезнь диких копытных (ХИБ); у человека – болезнь Крейтцфельда–Якоба (БКЯ) и её новый вариант (нвБКЯ), синдром Герстманна–Штройслера–Шейнкера (ГШШ), куру и смертельную семейную бессоницу. Некоторые из ПБ могут быть связаны с несколькими субтипами или штаммами приона, которые различаются полиморфизмом в гене, кодирующем PrP<sup>c</sup>, трансмиссивностью, клиническими проявлениями, характерными нейропатологическими изменениями и/или биохимическими особенностями патогенной формы белка PrP<sup>d</sup> [11]. Различают наследственную, спорадическую и инфекционную формы ПБ, при этом большую часть случаев у человека (около 85%) относят к спорадическим. Инфекционная форма характеризуется меж- и внутривидовой трансмиссией и вызывается проникновением в организм аномальных изоформ приона, инициирующих конформационные изменения PrP<sup>c</sup> организма-реципиента.

Патогенез рассматриваемых заболеваний включает в себя деградацию нейронов, пролиферацию астроцитов и клеток микроглии, накопление PrP<sup>d</sup> в различных отделах головного мозга, что клинически проявляется в виде быстро прогрессирующей деменции, церебральной атаксии и заканчивается 100%-ным летальным исходом [12–13]. Для некоторых ПБ характерно накопление PrP<sup>d</sup> в периферической нервной системе или лимфоидных органах; последний вариант характерен для выделенных от нескольких видов оленей штаммов ХИБ [14]. Так, во время продолжающейся вспышки ХИБ в Норвегии из 19 животных в провинции Nordfjella все оказались положительными по PrP<sup>d</sup> в лимфоидных тканях и только у 10 из них он был обнаружен в центральной нервной системе. Высокая степень накопления PrP<sup>d</sup> в лимфоидных органах, характерная для некоторых штаммов ХИБ, вероятно, является причиной высокой контагиозности и трансмиссивности ХИБ у оленей [15].

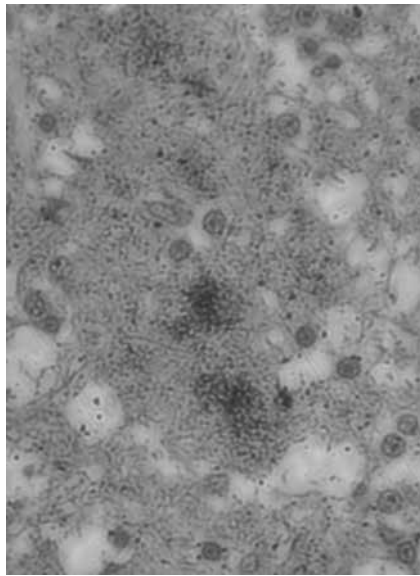
Начиная с 80-х гг. прошлого века и по настоящее время многие аспекты этиологии и патогенеза ПБ, методология выявления и молекулярно-биологические особенности прионных белков были подробно описаны в зарубежной и отечественной литературе [12, 16–17]. В нашей стране в изучение этих заболеваний у животных большой вклад внесли учёные и специалисты ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко РАН» (ВИЭВ) и ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ) [18–22]. Позднее, в рамках осуществления международных проектов, коллектив учёных из НПО «Нарвак», НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ГНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ВНИИВиМ) и ФГБУ «ВНИИЗЖ» при участии коллег из Республики Беларусь выполнил ряд исследований по получению и характеристике рекомбинантных прионных

белков, получению моноклональных антител (МКАТ) и их апробации в качестве иммунодиагностических реагентов для посмертного выявления PrP<sup>d</sup> животных и человека (рис. 1 а, б) [23–27].

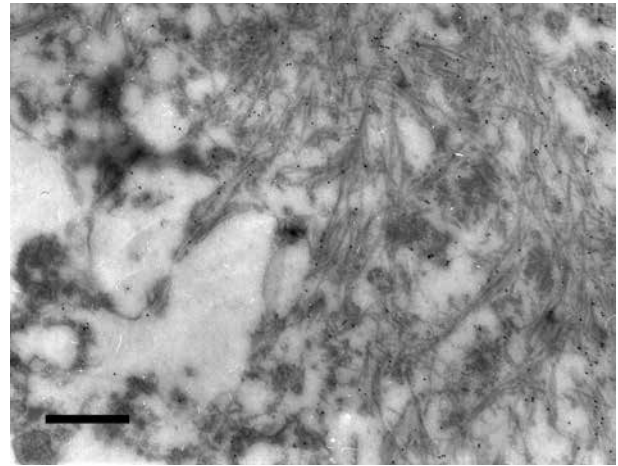
Несмотря на то что многие вопросы, связанные с ПБ, уже достаточно хорошо изучены, некоторые из них остаются в поле зрения профильных специалистов. Это, во-первых, отсутствие средств терапии и профилактики; во-вторых, проблемы, связанные с прижизненной диагностикой болезней. На сегодняшний день все валидированные и узаконенные методы диагностики ПБ (помимо биопробы) направлены на посмертное исследование тканей головного или спинного мозга гистологическим, иммуногистохимическим (ИГХ), иммуноферментным (ИФА), иммунохроматографическим (ИХМ) методами и иммуноблоттингом (ИБ). При этом единственным реагентом, пригодным для выявления PrP<sup>d</sup> как единственного маркера болезни, в вышеописанных форматах иммунологического анализа являются МКАТ, от свойств которых зависят чувствительность и специфичность исследований. Впервые прижизненный (преклинический) тест для обнаружения PrP<sup>d</sup> скрепи в периферической лимфоидной ткани был разработан на основе ИГХ К. О'Rourke с соавт. [28–29]. Эта уникальная методика позволяет выявлять PrP<sup>d</sup> в так называемом третьем веке – лимфоидном органе инфицированной овцы за месяцы или годы до появления первых клинических признаков заболевания. Внедрение данного метода позволило осуществлять мониторинг скрепи среди поголовья живых овец и отбирать клинически здоровых взрослых особей для племенных целей. Кроме этого, этими авторами посредством типирования гена *PRNP* были выделены группы риска для скрепи, что также было использовано для селекции устойчивой к данной патологии популяции овец и коз [30]. В настоящее время подтверждена возможность детекции PrP<sup>d</sup> в лимфоидных узлах, пейеровых бляшках, миндалинах, аппендиксе, третьем веке, что позволяет в ряде случаев выявить болезнь у животных и человека на доклинической стадии [31–32]. Необходимо подчеркнуть, что успех применения ИГХ-анализа в значительной степени зависит от качества подготовки исследуемого материала и используемых антител.

В последние годы появляются варианты методов фактически прижизненной диагностики, столь необходимые в первую очередь для человека. Среди большого количества прототипов таких тест-систем следует выделить 2 наиболее перспективных, в основе которых лежит единый принцип белковой амплификации. Как только идея о белковой природе возбудителя ПБ была в целом принята научным сообществом, начался поиск возможностей воспроизведения наблюдаемой *in vivo* конверсии клеточной формы прионного белка PrP<sup>c</sup> в патогенную PrP<sup>d</sup> при взаимодействии с патогенной затравкой. Первым в 2001 г. был разработан метод циклической амплификации патогенной изоформы приона (циклическая амплификация мисфолдинга белка, ЦАМБ) на субстрате гомогената моз-

a/a



b/b



**Рис. 1.** Выявление PrP<sup>d</sup> в тканях головного мозга человека методами ИГХ и иммунной электронной микроскопии [26].

*a:* Иммуногистохимическое окрашивание препарата полутонкого среза мозга человека (область мозжечка) больного нВБКЯ после обработки МКАТ 2С8. Наблюдаются обширная вакуолизация тканей и визуализация PrP<sup>d</sup> в составе амилоидных бляшек в виде окрашенных темных скоплений. Увеличение ×600.  
*б:* Электронограмма этого же препарата после обработки МКАТ 2С8 и вторичными антителами к IgG человека, конъюгированными частицами коллоидного золота диаметром 10 нм. Результат связывания МКАТ 2С8 с агрегатами PrP<sup>d</sup>, формирующими САФ в вакуолизированной ткани мозга. Размер линии – 500 нм. Увеличение ×20 000.

**Fig. 1.** Identification of PrP<sup>d</sup> in human brain tissue by IGC and immune electron microscopy [26].

*a:* Immunohistochemical staining of the preparation of a half-thin slice of the human brain (cerebellum area) of a patient with vCJD after treatment with MCAT 2C8. There are extensive tissue vacuolization and visualization of PrP<sup>d</sup> in amyloid plaques in the form of painted dark clusters. Magnification ×600.  
*b:* Electronogram of the same preparation after treatment with MCAT 2C8 and secondary antibodies to human IgG by conjugated colloidal gold particles with a diameter of 10 nm. The result of binding MCAT 2C8 with PrP<sup>d</sup> units which form SAF in the vacuolized brain tissue. The line size is 500 nm. Magnification ×20 000.

га хомяка, содержащего клеточную изоформу приона PrP<sup>c</sup>, путём её конверсии в аномальную изоформу *in vitro* [33]. Данный способ, получивший название метода белковой конверсии (Protein misfolding assay, РМА; Protein misfolding cyclic amplification, РМСА), основан на схожем с методикой полимеразной цепной реакции (ПЦР) принципе: если в образце присутствует (даже в ничтожно малых количествах) PrP<sup>d</sup>, то при добавлении в образец PrP<sup>c</sup> происходит конверсия последней в PrP<sup>d</sup>. Агрегаты PrP<sup>d</sup> подвергаются фрагментации/соникации, и образовавшиеся в результате этого его фрагменты, в свою очередь, служат матрицей для конверсии PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup>. Таким образом, в результате циклической амплификации содержание PrP<sup>d</sup> в образце многократно возрастает, а результаты реакции оценивают методом ИБ по конечной точке. Эта методика применима для обнаружения PrP<sup>d</sup> не только в тканях мозга, но и в крови [34]. Одним из её недостатков является возможность спонтанной конверсии субстрата в амилоидную форму в образцах, не содержащих PrP<sup>d</sup>. Кроме того, существенным отрицательным моментом является необходимость использования в качестве субстрата гомогената мозга, что накладывает на ЦАМБ как этические, так и связанные с вопросами биобезопасности ограничения.

Дальнейшим усовершенствованием ЦАМБ стало использование рекомбинантного белка в качестве субстрата конверсии, что частично устраняло

эти недостатки. В результате была разработана новая технология, названная методом амплификации аминокислотных последовательностей с использованием индуцированной вибрацией конверсии PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup> (индуцированная вибрацией конверсия, ИВК; quaking-induced conversion, QuIC) [35]. Модификацией методики ИВК стала возможность детекции накопления амилоидной формы белка в режиме реального времени (ИВК-РВ; quaking-induced conversion real time, QuIC-RT) [36]. В настоящее время ИВК-РВ является одним из самых перспективных подходов к обнаружению PrP<sup>d</sup> и наиболее подходящей диагностической процедурой для использования в повседневной клинической практике с целью выявления сверхмалых концентраций PrP<sup>d</sup> в образце. Метод отличают простота, воспроизводимость, возможность исследовать большие объёмы материала, что важно при мониторинговых исследованиях. Вместо обработки ультразвуком используется периодическое встряхивание планшета с образцами; единственным прибором для регистрации результатов реакции является термостабируемый плащечный флуориметр, подключённый к персональному компьютеру. Благодаря использованию флуоресцентного красителя тиофлавина Т (ThT), избирательно связывающегося с амилоидной формой прионного белка, наблюдение за конверсией субстрата возможно в реальном времени, что позволяет оценить относительное содержание PrP<sup>d</sup> в исследуе-

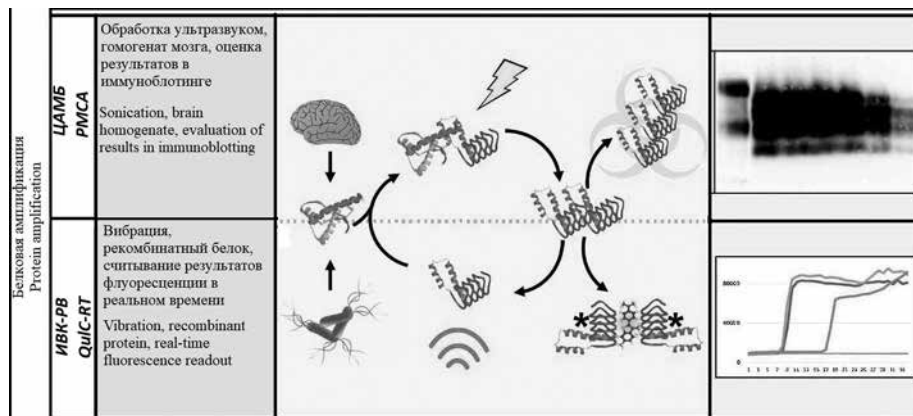


Рис. 2. Методология постановки и проведения реакций ЦАМБ и ИВК-РВ.

Fig. 2. Methodology of staging and conducting of PMCA and QuIC-RT reactions.

мых образцах (рис. 2). По чувствительности ИВК-РВ оказалась сравнимой с биопробой на восприимчивых животных; линейный диапазон чувствительности метода оценивают в  $10^{-3}$ – $10^{-8}$  мкг PrP<sup>d</sup> [37–38]. Экспериментальные данные, полученные с использованием разных субстратов, показали, что прионы некоторых видов животных могут подвергаться конверсии под воздействием достаточно широкого спектра известных природных штаммов PrP<sup>d</sup>. Это обстоятельство диктовало необходимость поиска универсального субстрата конверсии, каковым оказалась прион рыжей полёвки (*Myodes glareolus*). Далее было установлено, что её рекомбинантный PrP<sup>c</sup> способен к конверсии под воздействием всех известных к настоящему времени штаммов PrP<sup>d</sup> [39].

Результат реакции ИВК-РВ позволяет в реальном времени анализировать флуоресцентную эмиссию после серии циклов встряхивания; этот процесс подобен протеканию удалит количественной ПЦР-РВ. В современной практике метод применяется для выявления PrP<sup>d</sup> не только в гомогенатах мозговых тканей: он адаптирован также для исследования спинномозговой жидкости, слюны и мочи оленей, заражённых ХИБ [40–41]. На протяжении последних лет опубликовано много работ по сравнительной оценке методик ЦАМБ и ИВК-РВ при выявлении PrP<sup>d</sup> в различных тканях и биологических жидкостях человека и животных (ликворе, крови, моче, слюне, фекалиях, назальных смывах и др.) с целью диагностики БКЯ, нвБКЯ, ГЭ КРС, скрепи овец и ХИБ оленей (*Cervidae*). Например, чувствительность ИВК-РВ при выявлении PrP<sup>d</sup> в тканях мозга коз в 10 000 раз превышала аналогичный показатель, установленный для ИБ и ИФА [38]. Недавно представлены данные об успешном прижизненном обнаружении PrP<sup>d</sup> при помощи ИВК-РВ в коже человека и животных [42]. Результаты исследований на БКЯ человека показали, что чувствительность метода ИВК-РВ составляет 73–96%, а специфичность достигает 100%. В ряде случаев при изучении спинномозговой жидкости и назальных смывов от людей с клиническими признаками sporadic БКЯ показатели чувствитель-

ности и специфичности рассматриваемой методики составили 100%. Такие же высокие значения этих характеристик установлены при исследовании оленей и лосей на ХИБ, в то время как в ходе обследования людей в отношении нвБКЯ, синдромов ГШШ и фатальной семейной бессонницы величины были ниже [43].

Первые результаты по воспроизводимости методики ИВК-РВ также были обнадеживающими. Так, 25 образцов спинномозговой жидкости, в которой присутствовал PrP<sup>d</sup>, были протестированы в 11 исследовательских центрах, причём в качестве субстрата использовались различные рекомбинантные PrP<sup>c</sup>; оборудование для проведения анализа также было различным. Несмотря на это, данные, полученные в разных лабораториях, почти полностью совпадали [44]. Высокая воспроизводимость результатов, полученных с помощью ИВК-РВ, была подтверждена в ещё одном исследовании на БКЯ [45]. В последние годы эта реакция достаточно широко используется научными лабораториями, занимающимися диагностикой ПБ человека и животных, и является наиболее перспективным способом прижизненной диагностики ПБ с точки зрения разработки коммерческой тест-системы [46]. Рядом учреждений ведутся целенаправленные работы для стандартизации компонентов и протоколов, оценки чувствительности и специфичности ИВК-РВ на охарактеризованной панели образцов [47]. В этой связи необходимо отметить значительный вклад в разработку и усовершенствование этой методики американских исследователей, занимающихся проблемой контроля и мониторинга ХИБ. Распространение этой высококонтагиозной и трансмиссивной формы ПБ оленей на значительной части территории США и Канады происходит из очага, обнаруженного в 60-е гг. прошлого столетия в Колорадо, нанося при этом большой экономический ущерб разводящим оленей коммерческим ранчо [46]. До недавнего времени ХИБ оставалась эндемичной для Северной Америки, однако в 2016 г. вспышка болезни независимого происхождения произошла среди северных оленей в Норвегии [48], и, несмотря на

попытки локализовать и ликвидировать очаг, заболевание продолжает распространяться в популяции животных и в настоящее время. Одновременно с этим многолетние исследования по оценке возможности заражения ХИБ макак алиментарным путём дали положительный результат [49].

Рядом исследователей делались попытки увеличить чувствительность ИВК-РВ, добавляя дополнительные этапы при постановке реакции. В частности, для усиления конверсии были разработаны методики, сочетающие ИВК-РВ с иммунопреципитацией [50] и магнитной экстракцией, при которой происходит осаждение агрегатов PrP<sup>d</sup> при помощи магнитного захвата оксидом железа [51]. Однако эти этапы существенно осложняют проведение реакции и зачастую не приводят к желаемым результатам.

Таким образом, необходимость определения сверхнизких летальных концентраций PrP<sup>d</sup> на доклинической стадии болезни в крови и других биологических жидкостях организма животных и человека стимулировала во всех областях науки интенсивное развитие принципиально новых методов изучения возбудителей особо опасных и редких инфекций. Среди множества потенциальных разработок в области прижизненной диагностики ПБ в настоящее время наиболее перспективным с точки зрения внедрения в лабораторную практику является метод ИВК-РВ. Он апробирован во многих лабораториях для исследований различного биологического материала от человека и животных на доклинической стадии ПБ и становится перспективным и безопасным для операторов. К одной из основных проблем его использования относится невозможность верифицировать и подтвердить амплификацию прионов известными традиционными методиками (ИФА, ИГХ, ИБ и т.п.), учитывая, что необходимый уровень детекции должен составлять аттограммы вещества ( $1 \text{ аг} = 10^{-18} \text{ г}$ ) PrP<sup>d</sup>. Кроме того, отсутствует единый регламент приготовления субстрата реакции, что приводит к ошибкам при сопоставлении результатов, полученных разными лабораториями. Вместе с тем в настоящее время продолжается работа по созданию унифицированных позитивных и негативных стандартов, важность которой сложно переоценить. Так, N.J. Haley с соавт. (2018) в своём обзоре подчёркивают, что для эффективной реализации метода ИВК-РВ необходима унификация 2 принципиально различных контролей: технических (в том числе положительный и отрицательный гомогенаты мозга, а также субстрат для амплификации) и матрикс-специфических биологических контролей, полученных из репрезентативных положительных и отрицательных источников: целевые ткани, биологические жидкости и образцы объектов окружающей среды. Эти же исследователи отмечают, что уже имеется возможность стандартизации рекомбинантного PrP<sup>c</sup>-субстрата, дополнительно обеспечивающая лучшую воспроизводимость результатов при постановке реакции в различных лабораторных учреждениях [52].

Значимой проблемой при рутинных исследованиях полевых образцов в существующих лабораторных

системах ИВК-РВ остаётся дискриминация слабоположительных образцов с низким содержанием PrP<sup>d</sup> и случаев спонтанной конверсии субстрата. Помимо этого, серьёзное препятствие для перехода процедуры ИВК-РВ из научных учреждений в диагностические подразделения заключается в отсутствии неинфекционного положительного контроля реакции. Наряду с этим продолжают поиски оптимальных условий и подходов к её постановке, которые позволили бы увеличить специфичность метода [53].

В настоящее время исследования в области разработки новых сверхчувствительных и/или селективных компонентов известных методик идентификации прионов и других этиологических агентов «конформационных» заболеваний представляют особую важность с точки зрения оценки рисков, возникающих в последние годы при создании искусственных, в том числе инфекционных прионных белков *in vitro* в ряде лабораторий. Об опасных вариантах появления в ходе подобных экспериментов патогенных прионных изоформ и спонтанно возникающих для них «новых» межвидовых барьеров типа животное–животное, животное–человек одними из первых предупреждали специалисты лабораторий переливания крови «Красного Креста» США, отвечающие за трансфузионную безопасность у людей. В первую очередь эти опасения были связаны с методом ЦАМБ, использующим ультразвуковую дезинтеграцию полученных первичных комплексов для последующего масштабирования стартового количества исследуемого патогенного материала [54–55]. Подобные синтетические прионы, в том числе и изоформы прионного белка человека, уже получены в системах белковой амплификации. В описанном случае в качестве матрицы был использован рекомбинантный PrP<sup>c</sup>, затравкой служила проба, полученная от человека со спорадической формой БКЯ, с добавлением в среду кофактора реакции – ганглиозида GM. Полученный синтетический прион оказался инфекционным для трансгенных мышей (PrP<sup>+</sup>) и вызывал у них неврологические расстройства после 224 и 459 дней эксперимента [56]. Аналогичные опыты проведены в отношении возбудителей ХИБ оленьих и нвБКЯ человека. В частности, Vagta M.A. с соавт. (2018) удалось *in vitro* методом ЦАМБ конвертировать PrP<sup>c</sup> человека в его патогенную изоформу, используя прионы поражённых ХИБ оленей как матрицу для амплификации [57]. Исходя из этого современные методы автоматизированной амплификации прионных белков (прежде всего ЦАМБ) можно рассматривать как один из возможных путей возникновения новых патогенных изоформ («штаммов») прионов. К другим путям возможного происхождения различных «штаммов» PrP<sup>d</sup> относят: природный (естественный); экспериментальный в опытах *in vivo* по межвидовой передаче PrP<sup>d</sup> между животными (включая высших приматов) и в опытах *in vitro* – моделирование конверсии PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>d</sup>, включая дальнейшую олигомеризацию мономеров прионных белков в полимерные структуры вплоть до получения протофибрилл и амилоидоподобных фибрилл, обла-

дающих свойством инфекционности [58]. Тем не менее вполне очевидно, что вышеописанные методики амплификации прионов не только внесут вклад в диагностику ПБ и будут способствовать улучшению понимания их патогенеза, но в будущем, возможно, смогут найти более широкое применение – например, для прижизненной диагностики других амилоидозов, обусловленных конформационными переходами белков при отличных от ПБ заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона [59].

#### ЛИТЕРАТУРА

- Gambetti P., Russo C. Human brain amyloidosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998; 13(Suppl. 7): 33–40. [https://doi.org/10.1093/ndt/13.suppl\\_7.33](https://doi.org/10.1093/ndt/13.suppl_7.33).
- Lachmann H.J., Hawkins P.N. Systemic amyloidosis. *Curr. Opin. Pharm.* 2006; 6(2): 214–20. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.10.005>.
- McKinley M.P., Prusiner S.B. Ultrastructural Studies of Prions. In: Chesebro B.W., ed. *Transmissible Spongiform Encephalopathies: Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1991. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-76540-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-76540-7_5).
- Prusiner S.B. Novel proteinaceous infection particles cause scrapie. *Science.* 1982; 216(4542): 136–44. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>.
- Laurent M. Autocatalytic processes in cooperative mechanisms of prion diseases. *FEBS Lett.* 1997; 407(1): 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00310-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00310-4).
- Bieschke J., Weber P., Sarafoff N., Beekes M., Giese A., Kretzschmar H. Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(33): 12207–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404650101>.
- Harris D.A. Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(3): 429–44.
- Hegde R.S., Mastrianni J.A., Scott M.R., DeFea K.A., Tremblay P., Torchia M., et al. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science.* 1998; 279(5352): 827–34. <https://doi.org/10.1126/science.279.5352.827>.
- Mead S. Prion disease genetics. *Eur. J. Hum. Genet.* 2006; 14(3): 273–81. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201544>.
- Bessen R.A., Kocisko D.A., Raymond G.J., Nandan S., Lansbury P.T., Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature.* 1995; 375(6533): 698–700. <https://doi.org/10.1038/375698a0>.
- Collinge J., Clarke A.R. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science.* 2007; 318(5852): 930–6. <https://doi.org/10.1126/science.1138718>.
- Prusiner S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(23): 13363–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363>.
- Baskakov I.V., Breydo L. Converting the prion protein: what makes the prion infectious. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1772(6): 692–703. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.07.007>.
- Benestad S.L., Telling G.C. Chronic wasting disease: an evolving prion disease of cervids. *Handb. Clin. Neurol.* 2018; 153: 135–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63945-5.00008-8>.
- Sakudo A. Chronic wasting disease: current assessment of transmissibility. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2020; 36: 13–22. <https://doi.org/10.21775/cimb.036.013>.
- Зуев В.А., Завалишин И.А., Ройхель В.М. Прионные болезни человека и животных. Руководство для врачей. М.: Медицина; 1999.
- Зуев В.А. Медленные инфекции человека и животных. Вопросы вирусологии. 2014; 59(5): 5–12.
- Надточей Г.А., Шубин В.А., Юров К.П., Коромыслов Г.Ф. Экспериментальные прионные инфекции у животных. Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 1999; 72: 299–305.
- Рыбаков С.С. Скрепи и другие прионные болезни животных и человека. Владимир: Фолиант; 2003.
- Рыбаков С.С. Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота. Владимир: Фолиант; 2007.
- Надточей Г.А. Прионные инфекции: диагностика, профилактика и меры борьбы. Бюллетень Всесоюзного ордена Ленина научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 1996; 77: 5–10.
- Суворов В.С., Шубин В.А., Надточей Г.А., Юров К.П., Санджарев Д.Д. Патоморфологическая дифференциация прионных инфекций: скрепи овец и губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота. Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 2003; 73: 60–3.
- Кальнов С.Л., Григорьев В.Б., Алексеев К.П., Власова А.Н., Гибадулин Р.А., Покидьшев А.Н. и др. Получение и характеристика полноразмерного рекомбинантного PrP<sup>Sc</sup> белка крупного рогатого скота. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006; 141(1): 68–71.
- Grigorjev V.B., Kal'nov S.L., Pokidyshov A.N., Tsubezov V.V., Balandina M.V., Gibadulin R.A., et al. Fibrillization of recombinant bovine prion protein (rec-PrP) *in vitro*. Dokl. Biochem. Biophys. 2008; 420: 112–4. <https://doi.org/10.1134/S1607672908030046>.
- Кальнов С.Л., Верховский О.А., Алипер Т.И. Прионные болезни животных. В кн.: Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013: 910–21.
- Покидьшев А.Н. Характеристика рекомбинантного прионного белка крупного рогатого скота (*Bos taurus*) и разработка методов выявления патологической изоформы прионов. Дис. ... канд. биол. наук. М.; 2009.
- Григорьев В.Б., Покидьшев А.Н., Кальнов С.Л., Клименко С.М. Методы диагностики прионных заболеваний. Вопросы вирусологии. 2009; 54(5): 4–9.
- O'Rourke K.I., Baszler T.V., Parish S.M., Knowles D.P. Preclinical detection of PrP<sup>Sc</sup> in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Vet. Rec.* 1998; 142(18): 489–91. <https://doi.org/10.1136/vr.142.18.489>.
- O'Rourke K.I., Baszler T.V., Besser T.E., Miller J.M., Cutlip R.C., Wells G.A., et al. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(9): 3254–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3254-3259.2000>.
- Spraker T.R., VerCauteren K.C., Gidlewski T., Schneider D.A., Munger R., Balachandran A., et al. Antemortem detection of PrP<sup>Sc</sup> in pre-clinical, ranch-raised Rocky Mountain Elk (*Cervus elaphus nelsoni*) by biopsy of the rectal mucosa. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2009; 21(1): 15–24. <https://doi.org/10.1177/104063870902100103>.
- Andréoletti O., Berthon P., Marc D., Sarradin P., Grosclaude J., van Keulen L., et al. Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(12): 3115–26. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-3115>.
- Hilton D.A., Ghani A.C., Conyers L., Edwards P., McCardle L., Ritchie D., et al. Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *Brit. Med. J.* 2002; 325(7365): 633–4. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7365.633>.
- Saborio G.P., Permann B., Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature.* 2001; 411(6839): 810–3. <https://doi.org/10.1038/35081095>.
- Saa P., Castilla J., Soto C. Presymptomatic detection of prions in blood. *Science.* 2006; 313(5783): 92–4. <https://doi.org/10.1126/science.1129051>.
- Atarashi R., Wilham J.M., Christensen L., Hughson A.G., Moore R.A., Johnson L.M., et al. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat. Methods.* 2008; 5(3): 211–2. <https://doi.org/10.1038/nmeth0308-211>.
- Atarashi R., Sano K., Satoh K., Nishida N. Real-time quaking-induced conversion: a highly sensitive assay for prion detection. *Prion.* 2011; 5(3): 150–3. <https://doi.org/10.4161/pri.5.3.16893>.
- Henderson D.M., Davenport K.A., Haley N.J., Denkers N.D., Mathiason C.K., Hoover E.A. Quantitative assessment of prion infectivity in tissues and body fluids by real-time quaking-induced conversion. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(Pt. 1): 210–9. <https://doi.org/10.1099/vir.0.069906-0>.
- Dassanayake R.P., Orrú C.D., Hughson A.G., Caughey B., Graça T., Zhuang D., et al. Sensitive and specific detection of classical scrapie prions in the brains of goats by real-time quaking-induced conversion. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(3): 803–12. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000367>.
- Orrú C.D., Groveman B.R., Raymond L.D., Hughson A.G., Nonno R., Zou W., et al. Bank vole prion protein as an apparently universal substrate for RT-QuIC-based detection and discrimination

of prion strains. *PLoS Pathog.* 2015; 11(6): e1004983. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004983>.

40. Favole A., Mazza M., Vallino Costassa E., D'Angelo A., Lombardi G., Marconi P., et al. Early and pre-clinical detection of prion seeding activity in cerebrospinal fluid of goats using real-time quaking-induced conversion assay. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 6173. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42449-7>.

41. Davenport K.A., Hoover C.E., Denkers N.D., Mathiason C.K., Hoover E.A. Modified protein misfolding cyclic amplification overcomes real-time quaking-induced conversion assay inhibitors in deer saliva to detect Chronic Wasting Disease prions. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(9): e00947-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00947-18>.

42. Mammanna A., Baiardi S., Rossi M., Franceschini A., Donadio V., Capellari S., et al. Detection of prions in skin punch biopsies of Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann. Clin. Translat. Neurol.* 2020; 7(4): 559–64. <https://doi.org/10.1002/actn.3.51000>.

43. Bongianini M., Orrú C.D., Groveman B.R., Sacchetto L., Fiorini M., Tonoli G., et al. Diagnosis of human prion disease using real-time quaking-induced conversion testing of olfactory mucosa and cerebrospinal fluid samples. *JAMA Neurol.* 2017; 74(2): 155–62. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4614>.

44. McGuire L.I., Poleggi A., Poggiolini I., Suardi S., Grznarova K., Shi S., et al. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: An international study. *Ann. Neurol.* 2016; 80(1): 160–5. <https://doi.org/10.1002/ana.24679>.

45. Cramm M., Schmitz M., Karch A., Mitrova E., Kuhn F., Schroeder B., et al. Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Mol. Neurobiol.* 2016; 53(3): 1896–904. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9133-2>.

46. Haley N.J., Donner R., Henderson D.M., Tennant J., Hoover E.A., Manca M., et al. Cross-validation of the RT-QuIC assay for the antemortem detection of chronic wasting disease in elk. *Prion.* 2020; 14(1): 47–55. <https://doi.org/10.1080/19336896.2020.1716657>.

47. Hwang S., Tatum T., Lebepe-Mazur S., Nicholson E.M. Preparation of lyophilized recombinant prion protein for TSE diagnosis by RT-QuIC. *BMC Res. Notes.* 2018; 11(1): 895. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3982-5>.

48. Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordoñez A., Bolton D., Bover-Cid S., Chemaly M., et al. Update on chronic wasting disease (CWD). *EFSA J.* 2019; 17(11): e05863. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5863>.

49. Schaeztl H. One Health Workshop Series 2020: Chronic Wasting Disease. Zoonotic potential of CWD. Available at: [https://ucalgary.zoom.us/rec/play/hja-r64RAavwd07Wv9-D4QALy-36SAILGC\\_QNqu6j2f6c2F4WhsgM-opx5x56pIDu41zgUwR4moiOAKPf.9-DQ27JE9yCVhya-?startTime=1602079098000](https://ucalgary.zoom.us/rec/play/hja-r64RAavwd07Wv9-D4QALy-36SAILGC_QNqu6j2f6c2F4WhsgM-opx5x56pIDu41zgUwR4moiOAKPf.9-DQ27JE9yCVhya-?startTime=1602079098000).

50. Orrú C.D., Wilham J.M., Raymond L.D., Kuhn F., Schroeder B., Raeber A.J., et al. Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion. *mBio.* 2011; 2(3): e00078-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00078-11>.

51. Denkers N.D., Henderson D.M., Mathiason C.K., Hoover E.A. Enhanced prion detection in biological samples by magnetic particle extraction and real-time quaking-induced conversion. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(8): 2023–9. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000515>.

52. Haley N.J., Richt J.A., Davenport K.A., Henderson D.M., Hoover E.A., Manca M., et al. Design, implementation, and interpretation of amplification studies for prion detection. *Prion.* 2018; 12(2): 73–82. <https://doi.org/10.1080/19336896.2018.1443000>.

53. Metrick M.A., do Carmo Ferreira N., Saijo E., Hughson A.G., Kraus A., Orrú C.D., et al. Million-fold sensitivity enhancement in proteopathic seed amplification assays for biospecimens by Hofmeister ion comparisons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019; 116(46): 23029–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909322116>.

54. Saa P., Cervenakova L. Protein misfolding cyclic amplification (PMCA): Current status and future directions. *Virus Res.* 2015; 207: 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.007>.

55. Seed C.R., Hewitt P.E., Dodd R.Y., Houston F., Cervenakova L. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion safety. *Vox Sang.* 2018; 113(3): 220–31. <https://doi.org/10.1111/vox.12631>.

56. Kim C., Xiao X., Chen S., Haldiman T., Smirnovas V., Kofskey D., et al. Artificial strain of human prions created in vitro. *Nat. Commun.* 2018; 9(1): 2166. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04584-z>.

57. Barria M.A., Libori A., Mitchell G., Head M.W. Susceptibility of human prion protein to conversion by Chronic Wasting Disease prions. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(8): 1482–9. <https://doi.org/10.3201/eid2408.161888>.

58. Зув В.А., Кальнов С.Л., Куликова Н.Ю., Гребенникова Т.В. Современное состояние проблемы прионных болезней и причины их

опасности для человека и животных. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2): 71–6. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-71-76>.

59. Saijo E., Groveman B.R., Kraus A., Metrick M., Orrú C.D., Hughson A.G., et al. Ultrasensitive RT-QuIC seed amplification assays for disease-associated Tau,  $\alpha$ -synuclein, and prion aggregates. *Methods Mol. Biol.* 2019; 1873: 19–37. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8820-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8820-4_2).

## REFERENCES

- Gambetti P., Russo C. Human brain amyloidosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998; 13(Suppl. 7): 33–40. [https://doi.org/10.1093/ndt/13.suppl\\_7.33](https://doi.org/10.1093/ndt/13.suppl_7.33).
- Lachmann H.J., Hawkins P.N. Systemic amyloidosis. *Curr. Opin. Pharm.* 2006; 6(2): 214–20. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2005.10.005>.
- McKinley M.P., Prusiner S.B. Ultrastructural Studies of Prions. In: Chesebro B.W., ed. *Transmissible Spongiform Encephalopathies: Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1991. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-76540-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-76540-7_5).
- Prusiner S.B. Novel proteinaceous infection particles cause scrapie. *Science.* 1982; 216(4542): 136–44. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>.
- Laurent M. Autocatalytic processes in cooperative mechanisms of prion diseases. *FEBS Lett.* 1997; 407(1): 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00310-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00310-4).
- Bieschke J., Weber P., Sarafoff N., Beekes M., Giese A., Kretzschmar H. Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(33): 12207–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404650101>.
- Harris D.A. Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(3): 429–44.
- Hegde R.S., Mastrianni J.A., Scott M.R., DeFea K.A., Tremblay P., Torchia M., et al. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science.* 1998; 279(5352): 827–34. <https://doi.org/10.1126/science.279.5352.827>.
- Mead S. Prion disease genetics. *Eur. J. Hum. Genet.* 2006; 14(3): 273–81. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201544>.
- Bessen R.A., Kocisko D.A., Raymond G.J., Nandan S., Lansbury P.T., Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature.* 1995; 375(6533): 698–700. <https://doi.org/10.1038/375698a0>.
- Collinge J., Clarke A.R. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science.* 2007; 318(5852): 930–6. <https://doi.org/10.1126/science.1138718>.
- Prusiner S.B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(23): 13363–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363>.
- Baskakov I.V., Breydo L. Converting the prion protein: what makes the protein infectious. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; 1772(6): 692–703. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.07.007>.
- Benestad S.L., Telling G.C. Chronic wasting disease: an evolving prion disease of cervids. *Handb. Clin. Neurol.* 2018; 153: 135–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63945-5.00008-8>.
- Sakudo A. Chronic wasting disease: current assessment of transmissibility. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2020; 36: 13–22. <https://doi.org/10.21775/cimb.036.013>.
- Zuev V.A., Zavalishin I.A., Roykhel' V.M. *Prion Diseases of Humans and Animals. A Guide for Doctors [Prionnye bolezni cheloveka i zhivotnykh. Rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow: Meditsina; 1999 (in Russian).
- Zuev V.A. Slow infections of humans and animals. *Voprosy virusologii.* 2014; 59(5): 5–12 (in Russian).
- Nadtochey G.A., Shubin V.A., Yurov K.P., Koromyslov G.F. Experimental prion infections of animals. *Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalenko.* 1999; 72: 299–305 (in Russian).
- Rybakov S.S. *Scrapie and Another Prion Diseases of Animals and Humans [Skrepi i drugie prionnye bolezni zhivotnykh i cheloveka]*. Vladimir: Foliant; 2003 (in Russian).
- Rybakov S.S. *Bovine Spongiform Encephalopathy [Gubkoobraznaya entsefalopatiya krupnogo rogatogo skota]*. Vladimir: Foliant; 2007 (in Russian).
- Nadtochey G.A. Diagnostic, prophylactic and eradication tools of prion infections. Prion and retroviruses infections of animals. *Byulleten' Vsesoyuznogo ordena Lenina nauchno-issledovatel'skogo instituta eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalenko.* 1996; 77: 5–10 (in Russian).
- Suvorov V.S., Shubin V.A., Nadtochey G.A., Yurov K.P., Sandzhaev D.D. Pathomorphology differentiation of prion infec-



- tions: sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalevko*. 2003; 73: 60–3 (in Russian).
23. Kal'nov S.L., Grigorjev V.B., Alekseev K.P., Vlasova A.N., Gibadulin R.A., Pokidyshev A.N., et al. Isolation and characterization of full-length recombinant cattle PrP<sup>Sc</sup> protein. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2006; 141(1): 68–71. <https://doi.org/10.1007/s10517-006-0094-3> (in Russian).
  24. Grigorjev V.B., Kal'nov S.L., Pokidyshev A.N., Tsibezov V.V., Balandina M.V., Gibadulin R.A., et al. Fibrillization of recombinant bovine prion protein (rec-PrP) *in vitro*. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2008; 420: 112–4. <https://doi.org/10.1134/S1607672908030046>.
  25. Kal'nov S.L., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I. Prion diseases of animals. In: L'vov D.K., ed. *Virology Guide. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013: 910–21 (in Russian).
  26. Pokidyshev A.N. *Characterization of bovine recombinant prion protein (Bos taurus) and development methods to detection of prion pathology isophorm*: Diss. Moscow; 2009 (in Russian).
  27. Grigorjev V.B., Pokidyshev A.N., Kal'nov S.L., Klimenko S.M. Methods for diagnosis of prion diseases. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(5): 4–9 (in Russian).
  28. O'Rourke K.I., Baszler T.V., Parish S.M., Knowles D.P. Preclinical detection of PrP<sup>Sc</sup> in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Vet. Rec.* 1998; 142(18): 489–91. <https://doi.org/10.1136/vr.142.18.489>.
  29. O'Rourke K.I., Baszler T.V., Besser T.E., Miller J.M., Cutlip R.C., Wells G.A., et al. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(9): 3254–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3254-3259.2000>.
  30. Spraker T.R., VerCauteren K.C., Gidlewski T., Schneider D.A., Munger R., Balachandran A., et al. Antemortem detection of PrP<sup>Sc</sup> in pre-clinical, ranch-raised Rocky Mountain Elk (*Cervus elaphus nelsoni*) by biopsy of the rectal mucosa. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2009; 21(1): 15–24. <https://doi.org/10.1177/104063870902100103>.
  31. Andréoletti O., Berthon P., Marc D., Sarradin P., Grosclaude J., van Keulen L., et al. Early accumulation of PrP<sup>Sc</sup> in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(12): 3115–26. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-3115>.
  32. Hilton D.A., Ghani A.C., Conyers L., Edwards P., McCardle L., Ritchie D., et al. Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples. *Brit. Med. J.* 2002; 325(7365): 633–4. <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7365.633>.
  33. Saborio G.P., Permanne B., Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*. 2001; 411(6839): 810–3. <https://doi.org/10.1038/35081095>.
  34. Saa P., Castilla J., Soto C. Presymptomatic detection of prions in blood. *Science*. 2006; 313(5783): 92–4. <https://doi.org/10.1126/science.1129051>.
  35. Atarashi R., Wilham J.M., Christensen L., Hughson A.G., Moore R.A., Johnson L.M., et al. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking. *Nat. Methods*. 2008; 5(3): 211–2. <https://doi.org/10.1038/nmeth0308-211>.
  36. Atarashi R., Sano K., Satoh K., Nishida N. Real-time quaking-induced conversion: a highly sensitive assay for prion detection. *Prion*. 2011; 5(3): 150–3. <https://doi.org/10.4161/pri.5.3.16893>.
  37. Henderson D.M., Davenport K.A., Haley N.J., Denkers N.D., Mathiason C.K., Hoover E.A. Quantitative assessment of prion infectivity in tissues and body fluids by real-time quaking-induced conversion. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(Pt. 1): 210–9. <https://doi.org/10.1099/vir.0.069906-0>.
  38. Dassanayake R.P., Orrú C.D., Hughson A.G., Caughey B., Graça T., Zhuang D., et al. Sensitive and specific detection of classical scrapie prions in the brains of goats by real-time quaking-induced conversion. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(3): 803–12. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000367>.
  39. Orrú C.D., Groveman B.R., Raymond L.D., Hughson A.G., Nonno R., Zou W., et al. Bank vole prion protein as an apparently universal substrate for RT-QuIC-based detection and discrimination of prion strains. *PLoS Pathog.* 2015; 11(6): e1004983. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004983>.
  40. Favole A., Mazza M., Vallino Costassa E., D'Angelo A., Lombardi G., Marconi P., et al. Early and pre-clinical detection of prion seeding activity in cerebrospinal fluid of goats using real-time quaking-induced conversion assay. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 6173. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42449-7>.
  41. Davenport K.A., Hoover C.E., Denkers N.D., Mathiason C.K., Hoover E.A. Modified protein misfolding cyclic amplification overcomes real-time quaking-induced conversion assay inhibitors in deer saliva to detect Chronic Wasting Disease prions. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(9): e00947-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00947-18>.
  42. Mammanna A., Baiardi S., Rossi M., Franceschini A., Donadio V., Capellari S., et al. Detection of prions in skin punch biopsies of Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann. Clin. Translat. Neurol.* 2020; 7(4): 559–64. <https://doi.org/10.1002/acn3.51000>.
  43. Bongianni M., Orrú C.D., Groveman B.R., Sacchetto L., Fiorini M., Tonoli G., et al. Diagnosis of human prion disease using real-time quaking-induced conversion testing of olfactory mucosa and cerebrospinal fluid samples. *JAMA Neurol.* 2017; 74(2): 155–62. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4614>.
  44. McGuire L.I., Poleggi A., Poggiolini I., Suardi S., Grznarova K., Shi S., et al. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: An international study. *Ann. Neurol.* 2016; 80(1): 160–5. <https://doi.org/10.1002/ana.24679>.
  45. Cramm M., Schmitz M., Karch A., Mitrova E., Kuhn F., Schroeder B., et al. Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Mol. Neurobiol.* 2016; 53(3): 1896–904. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9133-2>.
  46. Haley N.J., Donner R., Henderson D.M., Tennant J., Hoover E.A., Manca M., et al. Cross-validation of the RT-QuIC assay for the antemortem detection of chronic wasting disease in elk. *Prion*. 2020; 14(1): 47–55. <https://doi.org/10.1080/19336896.2020.1716657>.
  47. Hwang S., Tatum T., Lebepe-Mazur S., Nicholson E.M. Preparation of lyophilized recombinant prion protein for TSE diagnosis by RT-QuIC. *BMC Res. Notes*. 2018; 11(1): 895. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3982-5>.
  48. Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordoñez A., Bolton D., Bouter-Cid S., Chemaly M., et al. Update on chronic wasting disease (CWD). *EFSA J.* 2019; 17(11): e05863. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5863>.
  49. Schaeztl H. One Health Workshop Series 2020: Chronic Wasting Disease. Zoonotic potential of CWD. Available at: [https://ucalgary.zoom.us/rec/play/hja-r64RAavwd07Wv9-D4QALy-36SAILGC\\_QNqu6j2f6c2F4WhsgM-opx5x56pIDu41zgUwR4moiOAKPf9-DQ27JE9yCVhyA-?startTime=1602079098000](https://ucalgary.zoom.us/rec/play/hja-r64RAavwd07Wv9-D4QALy-36SAILGC_QNqu6j2f6c2F4WhsgM-opx5x56pIDu41zgUwR4moiOAKPf9-DQ27JE9yCVhyA-?startTime=1602079098000).
  50. Orrú C.D., Wilham J.M., Raymond L.D., Kuhn F., Schroeder B., Raeber A.J., et al. Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion. *mBio*. 2011; 2(3): e00078-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00078-11>.
  51. Denkers N.D., Henderson D.M., Mathiason C.K., Hoover E.A. Enhanced prion detection in biological samples by magnetic particle extraction and real-time quaking-induced conversion. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(8): 2023–9. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000515>.
  52. Haley N.J., Richt J.A., Davenport K.A., Henderson D.M., Hoover E.A., Manca M., et al. Design, implementation, and interpretation of amplification studies for prion detection. *Prion*. 2018; 12(2): 73–82. <https://doi.org/10.1080/19336896.2018.1443000>.
  53. Metrick M.A., do Carmo Ferreira N., Saijo E., Hughson A.G., Kraus A., Orrú C.D., et al. Million-fold sensitivity enhancement in proteopathic seed amplification assays for biospecimens by Hofmeister ion comparisons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019; 116(46): 23029–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909322116>.
  54. Saa P., Cervenakova L. Protein misfolding cyclic amplification (PMCA): Current status and future directions. *Virus Res.* 2015; 207: 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.007>.
  55. Seed C.R., Hewitt P.E., Dodd R.Y., Houston F., Cervenakova L. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion safety. *Vox Sang.* 2018; 113(3): 220–31. <https://doi.org/10.1111/vox.12631>.
  56. Kim C., Xiao X., Chen S., Haldiman T., Smirnovas V., Kofskey D., et al. Artificial strain of human prions created *in vitro*. *Nat. Commun.* 2018; 9(1): 2166. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04584-z>.
  57. Barria M.A., Libori A., Mitchell G., Head M.W. Susceptibility of human prion protein to conversion by Chronic Wasting Disease prions. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(8): 1482–9. <https://doi.org/10.3201/eid2408.161888>.
  58. Zuev V.A., Kal'nov S.L., Kulikova N.Yu., Grebennikova T.V. Prion diseases and the biosecurity problems. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(2): 71–6. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-71-76> (in Russian).
  59. Saijo E., Groveman B.R., Kraus A., Metrick M., Orrú C.D., Hughson A.G., et al. Ultrasensitive RT-QuIC seed amplification assays for disease-associated Tau,  $\alpha$ -synuclein, and prion aggregates. *Methods Mol. Biol.* 2019; 1873: 19–37. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8820-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8820-4_2).