

ГЛАВА 2.2.

БИОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ВВЕДЕНИЕ

Современные концепции племенного животноводства и расширение международной торговли требуют развития диагностических платформ раннего предупреждения, глобальной активности и диагностической гармонизации для увеличения производства животноводческой продукции и улучшения здоровья, а также способствуют объединению технологий, направленных на выявление патогенных возбудителей болезней, что составляет основу глобальной инициативы «один мир – одно здоровье».

Глобальное развитие и улучшение транспортной инфраструктуры способствовали большему международному перемещению людей и товаров. Вследствие этого возрос риск передачи патогенных возбудителей болезней между странами и даже между континентами. В ответ на глобальные изменения климата болезни, которые ранее были эндемичными в определенных областях, например, блутанг (инфекционная катаральная лихорадка овец) и африканская чума свиней проявляют тенденцию к перемещению или распространению в другие географические зоны за пределами их прежнего ареала. И, наконец, постоянная интенсификация животноводства и производства животноводческой продукции требует применять разные подходы к профилактике, диагностике, лечению и мониторингу заболеваний животных.

Для широкого принятия и внедрения современные диагностические методы должны быть проверенными и утверждёнными, чувствительными, специфичными, быстрыми, лёгкими в использовании, рентабельными и, в конечном счёте, автоматизированными, что облегчит оценку большого количества образцов.

Уникальным примером применения новых технологий к контролю и уничтожению болезней является искоренение чумы крупного рогатого скота. В данном случае реакция нейтрализации вируса была заменена хорошо проверенным и утверждённым твердофазным иммуноферментным анализом, который был использован во всемирной программе борьбы с этим заболеванием.

Цель данной главы заключается в предоставлении общей справочной информации неспециалистам. Две проблемы научно-технического обзора МЭБ, касающиеся биотехнологии и диагностики заболеваний животных, доступны на веб-сайте МЭБ. Список тем, которые кратко рассматриваются в этой главе, приведен ниже.

A. Выявление нуклеиновых кислот

- 1. Выделение нуклеиновой кислоты*
- 2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в реальном времени*
- 3. Изотермическая амплификация*
- 4. Выявление нуклеиновых кислот без амплификации ДНК*
- 5. Диагностика на основе полиморфизма длины рестриционных фрагментов и родственных методов на основе ДНК*
- 6. Секвенирование генома*
- 7. Диагностика при помощи зондов ДНК и технология микрочипов ДНК*
- 8. Метагеномика*

B. Выявление белков

B1. Выявление антигенов

1. Твердофазный иммуноферментный анализ с захватом антигена (твердофазный Аг-ИФА)
2. Количественные иммуноанализы (радиоиммуноанализ и количественный иммуноферментный анализ)
3. Реакция иммунной флюоресценции
4. Иммуногистохимия
5. Иммунохроматография (устройства с тест-полосками)

В2. Выявление антител

1. Агглютинация
2. Реакция ингибирования гемагглютинации
3. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле
4. Реакция связывания комплемента
5. Непрямой твердофазный ИФА (нИФА)
6. Конкурентный твердофазный ИФА (кИФА)
7. Блокирующий твердофазный ИФА (БИФА)
8. Иммуноблоттинг
9. Флюоресцентное антитело

В3. Развитие технологий выявления белков

В4. Протеомика

В5. Получение антигенов при помощи технологии рекомбинантных ДНК

С. Результаты применения новых технологий

А. ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Эффективное сдерживание инфекционных заболеваний, особенно, трансграничной природы, требует быстрой, чувствительной, специфичной и подтверждающей идентификации патогенного микроорганизма. Традиционные диагностические методики, такие как выделение патогенного микроорганизма (золотой стандарт для диагностики инфекционных болезней), не только трудоёмки для прихотливых патогенных микроорганизмов, с трудом культивируемых *in vitro*, но также могут представлять угрозу для технического персонала, участвующего в диагностике, болезней зоонозного происхождения. Поскольку эти ограничения часто требуют участия лабораторий с высоким уровнем безопасности (например, BSL3), были продемонстрированы преимущества амплификации нуклеиновых кислот. Особенно следует отметить быстрые революционные преобразования в диагностике инфекционных заболеваний, которые произошли в результате появления новых технологий, основанных на платформе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Платформы амплификации ДНК чувствительны, специфичны, быстры и устойчивы, поскольку они используют в качестве исходного материала несколько неинфекционных матриц нуклеиновых кислот. Эти платформы также рентабельны и поддаются автоматизации, поэтому они идеальны с точки зрения высокой пропускной способности.

1. Выделение нуклеиновой кислоты

Важным этапом процедуры молекулярной диагностики является выделение «чистых» смесей нуклеиновых кислот, которые будут использованы в качестве матрицы для реакций. Хотя извлечение ДНК из бактериальных культур или крови является достаточно простой процедурой, получить подходящий материал из полевых образцов, например, из фекалий, внутренних органов или абортного материала технически более сложно. Если не очистить клинический образец целевого материала от загрязнений, то анализ будет поставлен под угрозу и может привести к ложным результатам. С другой стороны, необходимость обработки большого количества образцов увеличивает риск загрязнения,

что также приводит к ложноположительным результатам. Последовательные манипуляции при выделении нуклеиновых кислот являются важной причиной перекрёстной контаминации образцов, приводящей к ложноположительным результатам. По этим соображениям выделение нуклеиновых кислот следует проводить, используя строгие рабочие процедуры, в изолированном помещении, отделённом от других этапов процедуры ПЦР (таких как подготовка смеси мастер-микс, добавление выделенных образцов в мастер-микс или амплификация). Для того чтобы обнаружить возможную перекрёстную контаминацию, между отдельными экземплярами образцов в анализируемом наборе, обычно вставляют разнообразные средства отрицательного контроля, например, стерильную воду, обработанную ДЭПК (диэтилпиروкарбонатом).

Известно, что некоторые типы образцов подавляют ПЦР, приводя к ложноотрицательным результатам. Для контроля качества при выделении нуклеиновых кислот и для того, чтобы убедиться в отсутствии ингибиторов ПЦР, важно включить в анализ внутренний контроль. В качестве этих средств внутреннего контроля могут быть использованы ген «домашнего хозяйства» (конститутивный ген), эндогенный ген, постоянный ген, экспрессируемый базальной клеткой, например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GPDH3) или β -актин, или экзогенная нуклеиновая кислота, которая изначально не присутствовала в препарате, но была добавлена на стадии выделения (Belák & Thorén, 2001). Существует множество специализированных методов для особых типов образцов и тканей, большинство из которых теперь доступны на коммерческой основе (как руководства или как автоматизированные системы для автоматизированных роботизированных рабочих станций). Разработка и доступность роботизированных платформ для выделения не только сводят к минимуму риск контаминации, но и позволяют обрабатывать большое количество образцов, сохраняя постоянные условия реакции при минимальных манипуляциях со стороны оператора. Следовательно, эти платформы способствовали установлению высокой пропускной способности, стабильности диагностического анализа, сокращению продолжительности необходимой обработки образца от часов до минут (Belák *et al.*, 2009). Они предназначены для большей надёжности при выделении нуклеиновых кислот из различных образцов, но эта область разработок всё еще остаётся проблемной.

В качестве альтернативы выделению нуклеиновых кислот, биотехнологи уделяют всё большее внимание полимеразам, резистентным к ингибиторам ПЦР, причём некоторые из них уже доступны на коммерческой основе для применения с целью прямой амплификации нуклеиновых кислот в патологических образцах без какого-либо этапа выделения. В анализах всё больше используется внутренний контроль, позволяющий продемонстрировать отсутствие ингибиторов ПЦР.

2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в реальном времени

В ПЦР используются естественные механизмы репликации ДНК, а в результате этой реакции можно получить *in vitro* большое количество желательной последовательности ДНК из сложной смеси гетерогенных последовательностей (Saiki *et al.*, 1988). ПЦР может амплифицировать выбранный участок длиной от пятидесяти до нескольких тысяч пар оснований в миллиарды копий. Определённость амплифицированного участка может быть целевым объектом специфических праймеров (коротких синтетических молекул ДНК, комплементарных к обеим цепям и фланкирующих целевые последовательности), которые отжигаются до одноцепочечной матрицы и удлиняются ДНК полимеразой.

По протоколам ПЦР амплификация ДНК достигается за счёт последовательности циклов инкубации при различных температурах. Целевую ДНК сначала термически денатурируют для разделения двух комплементарных цепей, чтобы получить одноцепочечную матрицу. Затем специфические праймеры на стадии отжига связываются с одноцепочечной матрицей, а полимеразы достраивают ДНК при промежуточной

температуре (элонгация). После того как полимеразы синтезировала новую цепь ДНК, продукт отделяется от матрицы при нагревании до более высокой температуры. Эти этапы, называемые циклами, повторяются от 20 до 40 раз, приводя к амплификации целевых последовательностей ДНК. Ключевым моментом ПЦР для амплификации целевой ДНК в геометрической прогрессии является выбор парных праймеров, которые при удлинении создают дополнительные реципрокные сайты отжига с праймерами для элонгации праймеров в последующих циклах. Для выявления РНК (например, РНК-содержащих вирусов), сначала надо получить копию РНК в виде кДНК, для чего используется обратная транскриптаза (ОТ). После этого кДНК действует как матрица для амплификации в ПЦР. Эта методика носит название ПЦР с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ).

Идентичность продукта ПЦР определяют по его характерному размеру и/или подтверждают, используя зонды ДНК (см. ниже) либо фрагменты рестрикции, чтобы проанализировать их полиморфизм по длине. Для этого был придуман соответствующий термин – полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) (см. раздел А.5). После появления автоматизированных методик циклического секвенирования, однозначную идентификацию обычно осуществляют посредством прямого секвенирования продукта ПЦР. Например, секвенирование используют при вирулентном типировании вируса птичьего гриппа А, у которого связанные с вирулентностью структурные мотивы в геномном сайте расщепления гемагглютинаина являются надёжными индикаторами высокой патогенности для кур. Чувствительность ПЦР можно повысить при помощи второго набора праймеров, чтобы амплифицировать субфрагмент продукта первой ПЦР. Эту методику обычно упоминают под названием «гнездовая ПЦР» или «вложенная ПЦР» и применяют её для обнаружения низких уровней патогенных возбудителей в анализируемом образце. Однако использование гнездовой ПЦР увеличивает риск контаминации материала загрязнениями из окружающей среды при второй амплификации (субфрагмента) и, следовательно, повышает вероятность ложноположительных результатов.

ПЦР представляет собой очень чувствительную процедуру выявления возбудителей инфекций в тканях хозяина и хозяйских векторах, даже при том условии, что инфицировано лишь небольшое количество клеток хозяина. ПЦР может прицельно найти и амплифицировать генную последовательность, встроенную в ДНК инфицированных клеток хозяина. Она также способна выявить и амплифицировать генные последовательности вирусов, не встроенные в ДНК хозяина. Очевидно, что одна из ролей ПЦР заключается в тестировании вакцин на контаминацию. Однако ПЦР не позволяет дифференцировать жизнеспособные и нежизнеспособные организмы или распознать неполные фрагменты геномной ДНК, а это может осложнить интерпретацию результатов и поставить под сомнение применимость ПЦР в этой роли.

ПЦР может оказаться очень полезной методикой для диагностики хронических, персистирующих инфекций, таких как вирусная диарея крупного рогатого скота (BVD), энзоотический лейкоз крупного рогатого скота или вирусный артрит/энцефалит коз и овец. Эти болезни представляют серьезные проблемы в диагностике и профилактике, поскольку инфицированные животные являются потенциальным постоянным источником передачи инфекции.

В течение ряда лет методики ПЦР были существенно модифицированы для придания этому подходу большей значимости и полезности в ветеринарной диагностике и идентификации патогенных возбудителей. Для идентификации классов патогенных возбудителей была разработана ПЦР с использованием высоко консервативных праймеров. Используя в ПЦР праймеры, которые комплементарны к этим консервативным участкам последовательностей, можно определить присутствие в образце любых бактерий заданного класса. Необходимо отметить, что положительный результат ПЦР должен быть

дополнен гибридизацией с видоспецифичными зондами, анализом ПДРФ, или секвенированием. Точно так же, можно разработать консенсусную ПЦР с вырожденными праймерами, нацеленными на консервативные участки последовательности или мотивы группы родственных патогенов. Нацеливание вырожденных праймеров (т.е., смеси сходных праймеров с разными основаниями в некоторых положениях) привело к идентификации многих ранее нераспознанных вирусов у различных видов животных. С другой стороны, для одновременного обнаружения нескольких патогенов была разработана мультиплексная ПЦР с использованием в одной реакции двух или более пар праймеров, направленных на уникальные патоген-специфические последовательности. Преимущество мультиплексной ПЦР заключается в высокой степени чувствительности и специфичности. Однако были опубликованы сообщения, авторы которых приводили данные о том, что мультиплексирование может уменьшить чувствительность по сравнению с единичными реакциями в связи с конкуренцией. Если чувствительность анализа выдвигается на первый план, этот вопрос нужно рассмотреть в процедуре оценки и утверждения (разработка и оптимизация анализа).

Классические методы ПЦР для диагностики бактериальных и вирусных патогенов, в настоящее время в значительной степени заменены анализами ПЦР в режиме реального времени. В таких анализах используются интеркалирующие красители или целенаправленный зонд/праймер (меченый флюоресцентной краской). Измеренный флюоресцентный сигнал пропорционален количеству произведённых специфических фрагментов ДНК. Таким образом, при ПЦР в режиме реального времени накопление продуктов ПЦР можно мониторить в каждом последовательном цикле по изменению степени флюоресценции. Говоря другими словами, такой анализ можно использовать для определения абсолютного или относительного количественного содержания ДНК или РНК в данном образце. ПЦР в режиме реального времени, в отличие от традиционной ПЦР, требует меньшей манипуляции, быстрее по скорости выполнения, имеет формат замкнутого контура (меньший риск перекрёстной контаминации), обладает высокой чувствительностью и специфичностью, благодаря чему сохраняет качественную эффективность и обеспечивает количественную информацию. Во многих случаях анализы ПЦР в режиме реального времени оказались более чувствительными, чем существующие базовые методы. Разработка портативных машин и аналитических методик ПЦР в режиме реального времени и испытания открыли перспективу применения этих методик для быстрого (менее 2 часов) установления диагноза эпидемических вспышек заболевания в полевых условиях.

При использовании ПЦР для диагностики требуется большая осторожность во избежание контаминации образцов, поскольку превосходная чувствительность методики легко может привести к ложноположительным результатам. Многоцентровые исследования продемонстрировали постоянство выявления положительных образцов в лабораториях, но также показали наличие частых ложноположительных результатов при исследовании заведомо отрицательных образцов, что свидетельствует о продолжающемся присутствии проблем контаминации (Schweiger *et al.*, 1997). В настоящее время доступно новое поколение роботизированных рабочих станций, которые можно настроить для выполнения ПЦР с единственной пробиркой, которую открывают однократно в любой момент. Это в значительной степени снижает риск контаминации. Также важно контролировать возможное появление «отрицательных» результатов, обусловленных присутствием ингибиторов ПЦР в реакционной смеси. Матрицу, независимую от целевой ДНК, которая заведомо производит продукты ПЦР (имитаторы) со специфичными праймерами, можно использовать в качестве контроля для ингибиторов ПЦР, то есть, для выявления ложноотрицательных результатов (Belák *et al.*, 2009). Использование таких мер предосторожности позволяет ПЦР стать реальным подспорьем для диагноста.

Образование сигнала анализа ПЦР в режиме реального времени до недавнего времени было ограничено определёнными химическими веществами, например, интеркалирующими красителями (SYBR Green и EvaGreen), гидролизуемыми зондами, молекулярными маяками, переносом энергии через зонды праймеров (PriProET), скорпион-праймерами, двойными гибридизационными зондами и лигированием олигонуклеотидов с красящей меткой (Belák *et al.*, 2009). Было разработано альтернативное мечение при помощи маркировочных знаков, которые обеспечивают высокое мультиплексирование анализа. Методика ПЦР типа масс-тэг является улучшением платформы ПЦР в режиме реального времени. В этой методике праймеры несут метки с известными, но различными молекулярными массами. После амплификации целевых фрагментов ДНК метки высвобождаются при помощи ультрафиолетового облучения, а затем проводят их измерение методом масс-спектрометрии. Этот подход обеспечивает мультиплексирование большого числа панелей целевых фрагментов ДНК (и, следовательно, выявление маркеров многих болезней), поскольку анализ не ограничен числом доступных красителей. Применение методики ПЦР масс-тэг уже показало себя надёжным подходом к дифференциальной диагностике синдромных заболеваний (дыхательных, геморрагических, кишечных патогенов, синдрома менингита/энцефалита) и к выявлению новых монофилетических таксонов патогенных микроорганизмов (Lipkin, 2010). Модификация этого метода основана на масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из матрицы (MALDI), что позволяет непосредственно измерять молекулярные массы продуктов ПЦР и сравнивать их с известными базами данных (Lipkin, 2010).

Дополнительное улучшение технологии секвенирования было достигнуто за счёт замены фотометрического выявления реакции ПЦР в режиме реального времени химическим (Neidringhaus *et al.*, 2011). Эта технология упоминается под следующими названиями: секвенирование в потоке ионов, рН-опосредованное секвенирование, кремниевое секвенирование, полупроводниковое секвенирование. Она основана на заметном высвобождении ионов водорода при встраивании нуклеотида в цепь ДНК, опосредованном полимеразой. Ионы водорода изменяют рН раствора, что можно выявить при помощи сенсорного датчика ионов (микропроцессорный рН-метр). Установка в собранном виде использует для выполнения биохимического процесса массово-параллельным способом высокоплотный массив микрообработанных лунок. В качестве доказательства принципа уже разработано четвёртое поколение платформ секвенирования, примерами которого являются технологии нанопорового секвенирования, методы длинного считывания и методы, основанные на прямой видеозаписи нуклеиновых оснований (Neidringhaus *et al.*, 2011). Их значение для научного сообщества ещё предстоит оценить.

3. Изотермическая амплификация

Преимущество технологий изотермической амплификации заключается в исключении термоциклирования и обеспечении амплификации ДНК при постоянной температуре. Эти технологии включают амплификацию, основанную на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), транскрипционно-опосредованную амплификацию (ТМА), технологию сигнально-опосредованной амплификации РНК (SMART), амплификацию с замещением цепей (SDA), амплификацию по типу катящегося кольца (RCA), петлевую изотермическую амплификацию (LAMP), изотермическую амплификацию с множественным вытеснением цепи (IMDA), геликаза-зависимую изотермическую амплификацию (HDA), циркулярную геликаза-зависимую изотермическую амплификацию (сHDA), изотермическую амплификацию с одиночным праймером (SPIA) и амплификацию, основанную на инвазии цепи (SIBA) (Gill & Ghaemi, 2008). Наиболее широко используемым из них является метод LAMP, который вводит в действие четыре праймера, формирующие ДНК по типу «петля-на-стебле», посредством самозапускаемого синтеза ДНК и ДНК полимеразы, обладающей активностью по замещению цепей. Результат процесса амплификации заключается в образовании петель на концах комплементарных цепей, которые непрерывно удлиняются. Индикатором процесса амплификации является или помутнение реакционной смеси, или возникновение флюоресцентного сигнала при использовании флюоресцентных красителей (Gill & Ghaemi, 2008).

4. Выявление нуклеиновых кислот без амплификации ДНК

Благодаря применению усиленного поверхностью комбинационного рассеяния (SERS) был разработан новый подход к выявлению целевой ДНК (Harpster *et al.*, 2009). Этот метод основан на захвате зонда, конъюгированного с тиолом, и репортерного зонда, меченого метиленовым синим, которые присоединяются к комплементарной (целевой) ДНК. Рамановская метка показывает расположение метиленового синего на наночастице золота при сохранении оптимального расстояния для стимуляции SERS. Измеряемый, специфический для захвата сигнал рамановского спектра генерируется посредством элиситации усиленного поверхностью плазмонного резонанса при лазерном возбуждении. Аналитическая чувствительность метода находится в наномолярном диапазоне. Сигнал также можно измерить при помощи кварцевых микровесов с рассеянием (этот метод основан на индукции пьезоэлектрического эффекта), что позволяет получить количественную интерпретацию результатов. Модификация этого метода использует в качестве носителя зонда захвата парамагнитные наночастицы. После присоединения целевой ДНК к зонду захвата и репортерному зонду комплексы за счёт магнитного притяжения попадают в определённое положение, где измеряется «сконцентрированный» сигнал. Использование этого метода также позволяет получить количественную оценку результатов.

5. Диагностика на основе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и родственных методов на основе ДНК

Серологические тесты, обычно используемые для идентификации микроорганизмов, неспособны различать выделенные культуры близкородственных патогенов независимо от их природы (вирусы, бактерии, грибки или паразиты). Процедуры на основе ДНК более перспективны для дифференциации, которая требуется довольно часто. Подходящей отправной точкой может быть анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

Подход ПДРФ основан на том факте, что в геномах даже близкородственных патогенов определяется вариабельность последовательностей. Например, линейное расположение смежных нуклеотидов, составляющее распознаваемую последовательность для

специфического рестрикционного фермента в одном геноме, может отсутствовать в геноме близкородственного штамма или выделенной культуры.

На практике процедура ПДРФ состоит из культивирования целевого патогена, выделения ДНК или РНК (с обратной транскрипцией в кДНК) и последующей обработки нуклеиновых кислот одним или более рестрикционных ферментов. Эти рестрикционные ферменты представляют собой эндонуклеазы, которые способны распознавать и разрезать двухцепочечную ДНК в определённых участках нуклеотидной последовательности, называемых сайтами рестрикции. Затем отдельные фрагменты ДНК, обработанные рестрикционными эндонуклеазами, разделяют посредством электрофореза в геле и визуализируют после окрашивания бромистым этидием. В идеальном варианте каждый штамм будет проявлять уникальный паттерн или отпечаток. Сначала можно рассмотреть применение многих различных рестрикционных ферментов, чтобы провести анализ многих молекулярных отпечатков в результате разрезания ДНК несколькими индивидуальными рестрикционными ферментами. При этом комбинация лучшего набора результатов позволит провести полноценную дифференциацию между штаммами или выделенными культурами патогенов (Loza-Rubio *et al.*, 1999).

Большую полезность для исследования патогенов представляет модификация базовой методики ПДРФ при подключении ПЦР на предварительном этапе. Метод ПЦР используется для амплификации определённого участка генома (уже известного исследователю как варьирующаяся последовательность у различных патогенов). Затем амплифицированный участок служит матрицей для методики ПДРФ. Эта комбинация (ПЦР-ПДРФ) имеет намного большую чувствительность и сопоставимость для идентификации патогенов, причём она особенно полезна, когда патоген у инфицированного животного представлен с низкой численностью, или его трудно выделить в культуре. Таким образом, можно определить участие специфических штаммов или типов возбудителей во вспышке заболевания и провести эпидемиологическое отслеживание патогенных изолятов в стране или между странами. Подключение гелелектрофореза в пульсирующем поле (PFGE) облегчает разделение больших фрагментов ДНК (размером до мегабаз) и может оказаться полезным дополнением к базовому анализу ПДРФ. Эти технологии широко используются в официальной программе по выявлению и дифференциации патогенных микроорганизмов пищевого происхождения (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* или *Campylobacter*), которую проводит центр по контролю и профилактике заболеваний министерства здравоохранения и социального обеспечения США (<<http://www.cdc.gov/pulsenet/>>).

ПДРФ имеет явное значение для эпидемиологических исследований, но более требовательная интерпретация результатов подразумевает создание баз данных, с помощью которых можно определить, насколько значимы в клиническом плане профили ПДРФ и связаны ли они с такими факторами, как вирулентность или диапазон хозяев. Для классификации патогенного изолята на практике обычно полагаются не на один сайт рестрикции, а используют сайты из нескольких разных локализаций в геноме. Постоянная дилемма для ветеринарных диагностов заключается в корректной оценке любых молекулярных различий, которые можно найти между разными изолятами патогенов, поскольку отсутствие или присутствие сайта (сайтов) распознавания для рестрикционной эндонуклеазы не обязательно связано с различиями в способности патогена вызывать заболевание, т.е., различия ПДРФ могут быть функционально незначимыми, кроме выявления отличительного признака.

Случайно амплифицированную полиморфную ДНК (метод РАПИД) получают, используя 8-12-мерные случайные праймеры, которые будут или не будут амплифицировать сегмент ДНК в зависимости от комплементарности к последовательностям этих праймеров. Если мутация в матрице ДНК произойдёт в том сайте, который ранее был комплементарен к праймеру, продукт ПЦР не будет получен, что приведёт к различному распределению

амплифицированных сегментов ДНК в геле. Маркеры РАПИД, определяющие индивидуальные штаммы, могут быть секвенированы, а затем использованы в качестве амплифицированного участка с подтверждённой последовательностью (SCAR). Таким образом, превращение анонимного полиморфного маркера в SCAR означает, что для упрощённой идентификации специфического генома достаточно проведения единственной ПЦР (Lewin *et al.*, 2002).

Хотя ПДРФ и ПЦР-ПДРФ намного менее эффективны по сравнению с современными технологиями секвенирования, они недороги, легки в осуществлении, а также в достаточной степени описательны для эпидемиологических исследований при вспышках заболеваний и для идентификации индивидуальных штаммов патогенов. Исследование мотива ПДРФ/ПЦР-ПДРФ является ценным инструментом для дифференциальной оценки происхождения инфекции (особенно при передаче от животных человеку) и/или для дифференциации между полевыми и вакцинными штаммами индивидуальных патогенов.

6. Секвенирование генома

Методики, при помощи которых можно выявить и охарактеризовать ДНК патогена, продолжают развиваться и улучшаться. В настоящее время окончательной селективной процедурой распознавания является секвенирование генома. Доминирующим подходом и золотым стандартом для секвенирования ДНК, начиная с 1977 года стал метод Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Традиционное секвенирование ДНК основано на циклическом секвенировании фрагментов целевой ДНК с мечеными дидезоксинуклеотидами, особенность которых заключается в приостановке элонгации в месте их связывания. Каждый дидезоксинуклеотид метят различными красителями, что позволяет различать индивидуальные дидезоксинуклеотиды. Поскольку каждый дидезоксинуклеотид конкурирует с «нормальными» нуклеотидами за комплементарные сайты их связывания, результатом такой ПЦР-амплификации будет смесь фрагментов ДНК различной длины, каждый из которых заканчивается определённым дидезоксинуклеотидом (идентифицируемым по его цвету). Затем смесь ПЦР анализируют, используя капиллярный электрофорез, который разделяет фрагменты по длине и считывает цвет каждого фрагмента. После этого используют аналитическое программное обеспечение для преобразования цветных сигналов в принципиальную схему расположения нуклеотидов.

Разработка технологий микрочипов, а также улучшения в манипуляциях ДНК в значительной степени способствовали разработке протоколов прямого секвенирования, дающих возможность выявлять неизвестные патогены. Эта технология позволяет секвенировать большие фрагменты ДНК и проводить сравнение последовательностей с базами данных, которые доступны на местном уровне или являются открытыми источниками общего пользования.

Секвенирование хорошо охарактеризованных частей генома играет важную роль в характеристике патогенов и эпидемиологических исследованиях. Секвенирование продуктов, амплифицированных в ПЦР, с применением вырожденных праймеров, которые нацелены на общий ген, характерный для вирусов одного и того же семейства, стало важным диагностическим инструментом, особенно для идентификации ранее нераспознанных членов этого семейства. Секвенирование определённой области генома используется в эпидемиологических исследованиях для оценки генетического сходства с другими патогенами того же биологического вида (подтипы), что позволяет определить филогенетические свойства патогена или происхождение вспышки/инфекции. Кроме того, анализируя и сравнивая различные мотивы последовательности, эта технология открывает возможность для предсказания тенденции патогенов мутировать в более патогенные штаммы, что позволяет на определённом уровне, проследить/предсказать распространение вспышки или инфекции (Horimoto & Kawaoka, 1995).

Современные технологии, такие как методика высокой ПЦР масс-тэг и высокопроизводительное секвенирование (Belák *et al.*, 2009; Lipkin, 2010), открыли намного больше диагностических возможностей по сравнению с традиционным целевым секвенированием. Методика ПЦР масс-тэг была успешно использована для одновременного выявления и дифференциации синдромных болезней, таких как респираторные заболевания, диареи, энцефалиты/менингиты и геморрагическая лихорадка (Lipkin, 2010). Кроме того, высокопроизводительное секвенирование применённое на мультиплексных платформах, способно генерировать случайное полногеномное секвенирование, создавая возможность для одновременного выявления патогенов и сравнения в разных областях генома.

Коммерческий выход первого параллельного пиросеквенирования (454 платформ секвенаторов ДНК в 2005 году) открыл новую эру высокопроизводительного геномного анализа, который теперь принято называть секвенированием следующего поколения (NGS). Это позволяет секвенировать большой геном за короткое время, облегчая исследование генетического материала, восстановленного непосредственно из внешнесредовых образцов, что составляет основу метагеномики. Эти новые технологии сделали возможной быструю идентификацию неизвестных патогенов (возникающие патогены) или патогенов с трудом культивируемых *in vitro*, а также идентификацию вариантов, которые представлены в смеси в небольшом количестве (Kunin *et al.*, 2008).

Высокопроизводительное секвенирование представляет важную проблему для решений биоинформатики, необходимых при анализе огромного количества полученных данных и направленных на то, чтобы ответить на специфические биологические вопросы, включая возможную амплификацию большого числа неожиданных патогенов и их взаимодействия с геномом клетки хозяина (Kunin *et al.*, 2008). Процесс дифференциации этих патогенов при использовании традиционных методик занимает много времени и не подходит для повседневной практики. В настоящее время в разработке находится несколько подходов к решению этой проблемы, в частности, приготовление образца (удаление эукариотической ДНК клетки хозяина на этапе выделения), уменьшение наборов входных данных для оценки (представление части полученных ампликонов вместо целого генома), нацеливание на ограниченную (уменьшенную) панель патогенов (например, патогенов животного происхождения, только вирусов/бактерий, только группы вирусов/бактерий, и т.д.) и оптимизация биоинформатики (создание специализированных программных платформ, способных анализировать большие объёмы данных с использованием встроенных алгоритмов). Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки, однако представляется, что лучшие решения могут предложить тщательная подготовка образцов и оптимизация биоинформатики.

7. Диагностика при помощи зондов ДНК и технология микрочипов ДНК

Традиционное зондирование ДНК и микроматричный анализ – это разные, но близкородственные процессы. Фундаментальным элементом обоих процессов является связывание (гибридизация) ДНК, которая получена из образца, подозреваемого на содержание патогена («неизвестная ДНК»), с хорошо охарактеризованной ДНК, заранее полученной из представляющего интерес патогена («известная ДНК»).

При традиционном зондировании ДНК неизвестную цель (ДНК или РНК) иммобилизируют на твёрдой поверхности, например, на мембране. Известную ДНК, превращённую в зонд при помощи мечения каким-либо образом или маркировки и находящуюся в жидкой фазе, применяют по отношению к цели.

Кроме того, при традиционном зондировании ДНК целью могут быть нуклеиновые кислоты, выделенные из клинического материала или культивируемых клеток и либо (а) добавленные к мембранам (дот-блот или слот-блот), либо (б), перенесённые на мембраны после гель-электрофореза, что менее удобно в диагностическом контексте.

Количественное содержание патогена в клиническом образце может оказаться слишком низким для выявления. Следовательно, нуклеиновую кислоту можно амплифицировать в ПЦР или ПЦР ОТ, а продукт ПЦР перенести на мембрану. Для визуализации зонда, связанного с целью, зонд можно пометить радиоактивным нуклидом или прикрепить к нему нерадиоактивную метку, что более безопасно и делается чаще. Например, в зонд можно встроить биотин или псорален-биотин, после чего связанный зонд можно обнаружить, добавив стрептавидин, связанный с ферментом для последующего проявления цвета или света (хемилюминесценция).

При микроматричной диагностике используют известную ДНК (большие олигонуклеотиды или комплементарная ДНК), которые служат целью, иммобилизированной на предметном стекле, и неизвестную ДНК в жидкой фазе, которую метят, чтобы сделать зондом.

При микроматричном зондировании зонд делают из нуклеиновой кислоты анализируемого образца. Нуклеиновую кислоту выделяют из образца, а затем проводят ПЦР или ПЦР ОТ, используя случайные олигонуклеотидные праймеры. Таким образом, происходит амплификация части всех нуклеиновых кислот в образце, происходящих как от хозяина, так и от патогена. Эти продукты ПЦР, репрезентативные для каждой нуклеиновой кислоты в образце, метят флюоресцентным красителем и применяют в микроматрице. При оптимальных условиях только ДНК патогенного происхождения будет связываться с ДНК на предметном стекле. Если задача состоит в выявлении конкретного патогена или группы родственных патогенов, то для их амплификации в образце с целью получения зонда можно использовать патоген-специфические олигонуклеотиды.

Микроматрица имеет такое название потому, что она может включать несколько тысяч различных известных ДНК, причём каждую ДНК точно наносят на предметные стёкла, чтобы сформировать матрицу. Диаметр каждого пятна составляет всего около 10 мкм. Для создания матриц можно использовать ДНК, комплементарную к участкам выбранных генов патогенного происхождения (Belák *et al.*, 2009). Однако, если необходимо исследовать множество патогенов, то по техническим причинам проще использовать большемерные олигонуклеотиды.

Микроматрицы для выявления патогенов можно конструировать с учётом нескольких уровней дифференциации. Применительно к олигонуклеотидам надо сказать, что олигонуклеотиды целевой ДНК можно первоначально сконструировать так, чтобы они были способны выявлять и дифференцировать патогены на уровне рода. Можно выбрать их число, например, около 10 олигонуклеотидов с высококонсервативной последовательностью в пределах данного рода (консенсусные олигонуклеотиды), чтобы зонд, полученный из полевого образца, в котором представлен член этого рода, вероятно, мог бы гибридизироваться, по меньшей мере, с некоторыми олигонуклеотидами, при этом не гибридизуясь (или гибридизуясь в меньшей степени) с последовательностями, соответствующими близким родам, например, дифференцировать изоляты афтовируса (вируса эпизоотического стоматита [FMDV]) от штаммов энтеровируса в семействе пикорнавирусов. Можно подобрать другие наборы олигонуклеотидов, которые способны охарактеризовать патоген более точно, например, дифференцировать семь типов FMDV и, возможно, провести ещё более тонкую дифференциацию на уровне подтипа, поместив их на то же самое предметное стекло с матрицей.

При традиционном зондировании ДНК выявление патогена ограничено числом используемых зондов, тогда как микроматричный анализ ограничен только числом целевых ДНК на матрице. Если микроматрица содержит 1000 различных олигонуклеотидов, то для достижения такой же разрешающей способности при обычном зондировании потребовалось бы 1000 зондов и 1000 отдельных реакций зондирования.

Большое преимущество микроматричного анализа заключается в том, что одновременно можно проводить поиск сотен патогенов, зондируя только одно стекло с микроматрицей. Очевидно, что микроматричный анализ имеет большой потенциал при исследовании заболеваний с неизвестной этиологией или таких болезней, где может быть представлено более одного патогена, и когда требуется субтипирование. Для увеличения чувствительности анализа при выявлении патогенов микроматричный метод можно дополнить амплификациями в ПЦР. Такие ПЦР обычно конструируют для амплификации одного или нескольких достаточно консервативных генов или множественных последовательностей, а их примерами являются ПЦР с использованием в целом консервативных праймеров, консенсусная ПЦР и мультиплексная ПЦР. При необходимости идентификации конкретного патогена использование микроматричного подхода менее оправдано, поскольку изготовление стёкол с микроматрицами и гибридизация на них относительно дороги. Вместо этого в таких относительно простых случаях более уместно использовать специфические ПЦР для патогена/подтипа с последующим подтверждением при помощи секвенирования или ПДРФ.

В настоящее время большинство новых технологий, таких как ПЦР масс-тэг, SERS, высокопроизводительное секвенирование и т.д. совместимы с определенными форматами микроматричного анализа. Это обеспечивает высокое мультиплексирование тестов в единственном сеансе анализа, создавая большие объёмы данных из одного образца. Для внутренней процедуры контроля качества/гарантий качества при микроматричном анализе, а также для записи данных, связанных с индивидуальным образцом, используется соответствующее программное обеспечение.

Если бы прошлые разработки в биотехнологии были индикаторами для будущего, то оборудование и реактивы для микроматричного анализа могли бы быть дешевле, что способствовало бы более широкому применению этой технологии в диагностике заболеваний у животных. Этот подход поможет в поиске до сих пор неизвестных вирусов или в получении таких характеристик бактериальных штаммов как вирулентность, чувствительность к антимикробным препаратам, а также для выявления других важных маркеров. Одной из главных проблем применительно к матричным подходам является необходимость обработки и анализа очень больших объёмов данных, генерируемых в этих процессах.

8. Метагеномика

Метагеномику определяют, как независимое от культивирования исследование коллективного набора микробных популяций (микробиома) в образце при анализе содержания нуклеотидных последовательностей (Bexfield & Kellam, 2011). Технология основана на амплификации и секвенировании всего содержания ДНК и/или РНК в данном образце с последующей экстенсивной фильтрацией полученных данных при помощи специального программного обеспечения. Метагеномика - это мощный инструмент для случайного выявления существующих или новых патогенов. Имеется некоторая озабоченность, связанная с этой технологией, например, соотношение между числом целей и числом тотальных амплифицированных последовательностей (0,00135%, считанное в случае выявления аренавируса (Palacios *et al.*, 2008), выбор образца (количество патогенов в целевом образце), занимающие много времени сбор и анализ данных. Главное беспокойство в настоящее время вызывают два ограничения: i) поскольку метод направлен на выявление сходства с известными патогенами, до сих пор нет никакого решения по поводу определения уникальных последовательностей и ii), программные решения, которые могут облегчить интерпретацию результатов. Для сведения к минимуму этих недостатков в настоящее время рассматриваются три решения: увеличенный патогенный груз (целевые образцы с высокой вероятностью увеличения числа патогенов), уменьшение полученных наборов данных за счёт ограничения числа целевых патогенов и/или, исключение эталонных последовательностей хозяина из анализа данных и оптимизация биоинформатики для применения, «связанного с профессией».

В. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Границы между так называемыми «классическими биологическими тестами» и «методами, основанными на биотехнологии» нечётки, и для обнаружения белков, специфичных для возбудителей болезни, или антител, вырабатываемых в ответ на эти белки, используются оба подхода. Большинство методов основано на иммунных взаимодействиях между антигенами и антителами. Кроме того, трудно чётко дифференцировать выявление антител от тестов на обнаружение антигенов, поскольку большая часть существующих анализов позволяет выявлять как антитела, так и антигены в зависимости от соответствующего неизвестного компонента. Поэтому классификация методов выявления антигенов и антител, приведенная в этом разделе, в достаточной степени условна, а описание каждого метода сопровождается его характеристикой. В этом разделе для полноты представления даётся краткое описание традиционных иммунологических анализов, таких как агглютинация и связывание комплемента, а также современных разработок в биотехнологии, таких как различные платформы ИФА.

В1. ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ

1. Твердофазный иммуноферментный анализ с захватом антигена (твердофазный Аг-ИФА)

Твердофазный иммуноферментный анализ с захватом антигена (твердофазный Аг-ИФА) облегчает выявление антигенов у патогенных возбудителей болезней, находящихся в организме животного, во время клинических проявлений заболевания или до их манифестации. Твердофазный Аг-ИФА обычно проводят в формате сэндвич-анализа, используя захват и обнаружение антител (или специфических моноклональных или поликлональных). Антиген из анализируемого образца сначала должен быть захвачен специфическим моноклональным антителом (MAb) или поликлональным антителом, связанным с твердофазной подложкой, а его присутствие обнаруживают, используя второе MAb или поликлональное антитело с радиоактивной или, чаще, с ферментной меткой. Если детекторное антитело не снабжено меткой, можно использовать конъюгацию антивидовых антител (реактивных к детекторному антителу). Имобилизованное

антитело выбирает целевой антиген из других конкурирующих белков в суспензии образца и обеспечивает его половинную концентрацию, увеличивающую возможность выявления. Желательные характеристики иммобилизованного МАb отражают сильную связь с патогеном, распознавание консервативного эпитопа, высокоспецифичного для целевого антигена и способность к фиксации на планшете ИФА без потери реактивности. В дополнение к этому, как часть индикаторной системы часто используют второе МАb, распознающее другой эпитоп, нежели эпитоп, распознанный иммобилизованным МАb, которое связано с планшетом ИФА. Однако из-за трудной идентификации МАb с широкой внутритиповой реактивностью поликлональные антисыворотки могут оказаться более предпочтительными для увеличения вероятности реакции против всех антигенных вариантов.

Твердофазные Аг-ИФА были разработаны для выявления *Anaplasma* (Trueblood *et al.*, 1991), вируса диареи крупного рогатого скота (BVDV) (Mignon *et al.*, 1991), чумы крупного рогатого скота и чумы мелких жвачных животных (PPR) (Libeau *et al.*, 1994). В настоящее время важными и широко применяемыми методами для обнаружения определенных бактериальных инфекций, включая *Listeria*, *Salmonella* и *Escherichia coli*, являются родственные методы с захватом антигена, в которых используется иммуномагнитный бисер. Принцип этой технологии заключается в иммуномагнитном разделении, т.е., в использовании небольших суперпарамагнитных частиц или бисера, покрытого антителами против поверхностных антигенов клеток. После магнитного извлечения из анализируемого образца при использовании второго антитела в формате сэндвич-анализа можно выявить как интактные бактерии, так и их растворимые антигенные детерминанты. Благодаря связыванию без фиксации на твёрдой поверхности, анализы с захватом антигена при помощи иммуномагнитного бисера, способны улучшить кинетику реакции антигена с антителом. В результате уменьшаются как неспецифическое связывание, так и время инкубации.

2. Количественные иммуноанализы (радиоиммуноанализ и количественный иммуноферментный анализ)

Количественный ИФА не принято специально использовать для прямого выявления заболеваний. Однако он широко используется для измерения концентрации специфических белков (тироксин, стероиды), других белков или гаптен в организме или в биологических жидкостях. Следовательно, эти методы часто используют для диагностики гормональных расстройств, главным образом применительно к размножению животных. Принцип весьма сходен с конкурентным ИФА (кИФА). Планшеты покрывают антителами против вещества, которое подлежит измерению. Конкурентное вещество метят маркером (изотопом в радиоиммуноанализе и ферментом или биотином в иммуноферментном анализе) и титруют до концентрации насыщения покрывающих антител. В лунки планшета ИФА добавляют серию стандартов с известной концентрацией. По мере увеличения концентрации стандартов меченый конкурент всё больше и больше перемещается в соответствующие лунки, приводя к уменьшению окраски в конце реакции. На основе этой корреляции вычерчивают стандартную кривую, отображающую обесцвечивание (процентное смещение) как функцию известной концентрации. После вычерчивания стандартной кривой измеряют процентное смещение, вызванное анализируемым образцом, и по стандартной кривой считывают концентрацию целевого вещества.

3. Реакция иммунной флюоресценции

Реакция иммунной флюоресценции (РИФ) используют для обнаружения патогенов в тканях или биологических жидкостях животных, используя специфические антитела против целевого антигена. Антитела метят флюоресцентным красителем (чаще всего используют флюоресцинизотиоцианат [ФИТЦ]). После приготовления образца по

предварительно определённой лабораторной процедуре к нему добавляют меченые антитела, затем образец инкубируют при определённых условиях, отмывают для удаления несвязанных антител и исследуют под флюоресцентным микроскопом. В участках связывания специфических антител появляется видимая флюоресценция. Этот метод обычно используют для выявления вируса бешенства в мозге мёртвых животных и вируса классической чумы свиней в тканях подозрительных животных. Поскольку метод основан на прямом связывании меченого антитела с антигеном (патогенного происхождения), представленным в образце, этот эффект обычно называют прямой иммунной флюоресценцией.

4. Иммуногистохимия

Иммуногистохимия в качестве дополнения к выделению возбудителей болезней из тканей стала стандартным инструментом для идентификации патогенов, а также для подтверждения результатов, полученных при использовании новейших диагностических технологий (например, методики ПЦР масс-тэг). Выявление антигенов *in situ* в фиксированных тканях имеет много преимуществ перед другими диагностическими методиками. Эти преимущества перечислены ниже: (i) удобное представление образцов, (ii) безопасное обращение с потенциальными патогенами для человека, (iii) возможность ретроспективного исследования сохранённых образцов, (iv) быстрое получение результатов и (v) выявление нежизнеспособных микроорганизмов (Haines & Clark, 1991). Иммуногистохимия также используется для обнаружения аномального прионного белка (PrP^{Sc}) в мозговой ткани с целью подтверждения болезни скрепи, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота и других трансмиссивных губчатых энцефалопатий. Этот метод оказался более чувствительным по сравнению со стандартным гистопатологическим исследованием (Thorgeirsdottir *et al.*, 2002). По мере роста числа МАb к определённым антигенам увеличивается использование иммуногистохимии для идентификации микроорганизмов и других специфических маркеров аутоиммунных болезней и неоплазий. Поскольку фиксация в формалине может денатурировать антигенные эпитопы (т.е., трёхмерные структуры, распознаваемые МАb), ограничивающим моментом в применении иммуногистохимии является необходимость определения соответствующей комбинации МАb/антиген, которая будет связана в тканях, фиксированных формалином. Это ограничение можно преодолеть при помощи замороженных срезов или применения методик демаскирования антигена (например, расщепления протеолитическим ферментом, обработки микроволновым излучением) перед иммуноокрашиванием.

5. Иммунохроматография (устройства с тест-полосками)

Иммунохроматография является удобным методом быстрого (за несколько минут) выявления антигенов без специального аппарата. Образец наносят на один конец фильтра с иммобилизованным антителом, куда также наносят микрогранулы (например, из коллоидного золота), конъюгированные с антителом. Антиген в образце формирует иммунокомплекс с антителом, меченым коллоидным золотом. Этот комплекс перемещается вместе с жидким образцом и вступает в контакт с антителом, иммобилизованным на мембране, где образуется иммунокомплекс с иммобилизованным антителом, порождающий цветной продукт, который можно визуализировать на глаз.

В2. ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИТЕЛ

1. Агглютинация

Агглютинация представляет собой метод, в основе которого лежит способность специфических антител связывать многочисленные патогенные микроорганизмы, создавая их скопления, то есть, формируя большие комплексы, которые легко выпадают в осадок. Образование осадка можно увидеть макроскопически или микроскопически. Различные технические варианты применения этого принципа по-прежнему широко

используются в ветеринарных лабораториях, особенно для выявления специфических антител против бруцеллёза и лептоспироза (см. главы по специфике болезней в данном Руководстве по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных). Этот метод можно использовать как для обнаружения антител, когда используется известный антиген, так и для обнаружения антигенов, когда используются хорошо охарактеризованные сыворотки.

2. Реакция ингибирования гемагглютинации

Метод ингибирования гемагглютинации основан на способности некоторых патогенов (главным образом, вирусов) неспецифически агглютинировать эритроциты. В присутствии специфических антител такая активность вируса может быть «заблокирована», что приведёт к подавлению агглютинации эритроцитов. Данный тест используется для качественного и количественного выявления как антигенов, так и антител. Этот подход был широко использован для выявления серотип-специфических антител против птичьего гриппа, чумы мелких жвачных животных (PPR) и других заболеваний. Тест также можно использовать для обнаружения антигена (присутствие вируса птичьего гриппа в аллантоисной жидкости после попытки его выделения) (Mulder & Brans, 1952).

3. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле

Реакция на иммунодиффузию в агаровом геле основана на способности белков случайно диффундировать в агаре определённой концентрации. Антитело и антиген помещают в лунки на определённом расстоянии. После инкубации, в том участке агарового геля, где произошли встреча и связывание антител с антигеном, образуются линии преципитации, видимые на чёрном фоне под лучами интенсивного наклонного света. Этот тест чаще всего используется для выявления антител против птичьего гриппа (матричные антитела), инфекционной анемии лошадей (тест Коггинса) и энзоотического лейкоза крупного рогатого скота. При определенных обстоятельствах этот тест можно использовать для выявления антигена (мониторинг успешного выделения вируса птичьего гриппа в аллантоисной жидкости).

4. Реакция связывания комплемента

Комплемент представляет собой термолабильную систему, состоящую более чем из 25 белков, представленных в крови, которые последовательно активированы комплексами антиген/антитело и помогают элиминировать патогены. Реакция связывания комплемента (РСК) основана на способности некоторых антител использовать комплемент в качестве медиатора. Тест основан на двух независимых реакциях, в каждой из которых комплемент играет роль медиатора: (i) «главная» реакция, в которой анализируемую сыворотку (термически инактивированную для разрушения комплемента) инкубируют с внешним источником комплемента и антигена (обычно от кролика или морской свинки), и (ii) «вспомогательная» (индикаторная) реакция, в которой антитела против эритроцитов («гемолизин») инкубируют с отмытыми овечьими эритроцитами в заранее определённой концентрации. Если анализируемая сыворотка в главной реакции окажется положительной (специфичной в отношении целевого антигена), то комплемент будет израсходован, поэтому вся смесь утратит активный комплемент. Если реакция отрицательна, комплемент не будет израсходован, то есть активный комплемент сохранится в смеси. После соответствующего периода инкубации определённый объем из смеси «главной» реакции добавляют к смеси «вспомогательной» реакции. В случае положительной реакции (отсутствие активного комплемента в «главной» смеси), эритроциты во «вспомогательной» реакции не будут гемолизированы и сформируют дискретную круглую бляшку на дне пробирки (или лунки в анализах, проводимых в формате микропланшета). Надосадочная жидкость в этих пробирках (лунках) будет прозрачной. В случае отрицательной реакции (комплемент в «главной» смеси будет

активен), а эритроциты во «вспомогательной» реакции будут гемолизированы. В этом случае на дне пробирки (или лунки в тестах, проводимых в формате микропланшета) не будет появляться дискретная бляшка. Надосадочная жидкость в этих пробирках (лунках) будет красноватой и мутной. РСК можно использовать для качественного и полуколичественного выявления специфических антител. Эта реакция по-прежнему широко используется для выявления антител против бруцеллёза у крупного рогатого скота, овец и коз, риккетсиоза Бернета, контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота (СВРР) и некоторых других болезней.

5. Непрямой твердофазный ИФА (нИФА)

В нИФА используют целевой антиген (интактный или очищенный), связанный с твёрдой фазой на планшете ИФА. Добавляют образцы сыворотки в соответствующем разведении. Если представлены специфические антитела против фиксированного антигена, они будут связываться с этим антигеном. Планшеты твердофазного ИФА отмывают для удаления любых несвязанных антител. Затем добавляют антисыворотки против иммуноглобулина, конъюгированные с ферментом (обычно с пероксидазой), которые специфичны по отношению к иммуноглобулину анализируемого вида животных. Если специфические антитела против фиксированного антигена были представлены в первой фазе, конъюгированные антииммуноглобулины свяжутся с ними и не будут удалены на втором этапе отмывания. Затем добавляют субстратный буфер. В положительных случаях (присутствие специфических антител) цвет субстратного буфера изменится. Развитие цвета, пропорциональное уровню антител, представленных в образце, измеряют на определённой длине волны, используя спектрофотометр.

6. Конкурентный твердофазный ИФА (кИФА)

кИФА – это иммунологическое обследование, которое можно использовать для обнаружения или количественного анализа антитела либо антигена с применением конкурентного метода. кИФА для выявления специфических антител в значительной степени заменил нИФА в программах крупномасштабного скрининга и эпидемиологического надзора по серологическим данным. кИФА обладает значительными преимуществами по сравнению с нИФА, поскольку он позволяет анализировать образцы от многих биологических видов, не прибегая к видоспецифическим конъюгатам с ферментной меткой для каждого анализируемого вида. Очистка многих антигенов чрезвычайно трудоёмка или требует больших затрат времени. При использовании непрямого анализа могут возникать сильные фоновые величины из-за неспецифического связывания. Однако в кИФА можно использовать относительно неочищенные антигены при том условии, что «детекторное антитело» имеет желательную специфичность. Принцип конкурентного анализа для выявления антител заключается в конкуренции между анализируемой сывороткой и детекторным антителом. Специфическое связывание детекторного антитела распознают, применяя соответствующую конъюгацию антител против данного вида. Уменьшение ожидаемого цвета обусловлено связыванием антител, представленных в анализируемой сыворотке с антигеном, что препятствует связыванию специфического детекторного антитела.

7. Блокирующий твердофазный ИФА (БИФА)

Базовая конфигурация БИФА сходна с таковой для твердофазного Аг-ИФА (см. параграф В1.1.). Антитела, специфические по отношению к целевому антигену, связаны с твёрдой фазой планшета твердофазного ИФА. Антиген перед добавлением к антителу покрывающему планшет, инкубируют с образцами. Если образцы содержат антитела против этого антигена, они будут связывать (блокировать) антиген во время этой инкубации. При добавлении в лунки, заблокированный антиген будет неспособен связываться с фиксированными антителами. Следовательно, когда детекторное антитело будет добавлено в лунки, оно будет не в состоянии распознать любой связанный антиген (развитие цвета отсутствует). В отличие от этого, если происхождение образца связано с отрицательным случаем, связывание произойдёт и будет сопровождаться развитием цвета.

8. Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг объединяет высокое разрешение гель-электрофореза со специфичностью иммунохимического выявления и открывает возможность для идентификации иммунодоминантных белков, распознаваемых антителами инфицированных животных или моноклональными антителами (MAb), направленными против целевого фактора. Процедуру иммуноблоттинга можно разделить на шесть этапов: (i) приготовление образца, (ii) разрешение антигена гель-электрофорезом, (iii) перенос разделённых полипептидов на мембранную подложку (нитроцеллюлозная мембрана, поливинилидендифторид [ПВДФ]), (iv) блокирование сайтов неспецифического связывания на мембране, (v) инкубация с детекторным антителом, и (vi) обнаружение связанного антитела.

Критически важным моментом является выбор детекторного антитела. Поликлональные сыворотки состоят из ряда антител, отражающего полный репертуар иммунного ответа на особый сложный антиген. Поэтому они будут обнаруживать множество разных полипептидов, отображающих характерный «профиль» реактивности. Моноклональные антитела связываются только с одним эпитопом, поэтому они полезны в идентификации очень специфичных полипептидов. После инкубации с детекторным антителом любые антитела, связанные с зонами локализации специфического белка, можно визуализировать при помощи меченых ферментом антисывороток против данного вида и подходящего субстрата/хромогена.

Иммуноблоттинг проводят, главным образом, в диагностических лабораториях для идентификации и/или характеристики возбудителей инфекций на основе антигенной специфичности или за счёт использования известных антигенов, позволяющих выявить специфический серологический ответ. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты других диагностических анализов часто можно разрешить с помощью иммуноблоттинга (Molina Caballero *et al.*, 1993). Например, иммуноблоттинг был в широком масштабе использован для выявления антигенов как основной метод скрининга при губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (BSE) и болезни скрепи, кроме того, этот метод был использован на миллионах образцов ствола мозга в Европе и в других местах для выявления прионного белка (Schaller *et al.*, 1999). В настоящее время иммуноблоттинг был в значительной степени заменён как скринирующий тест методом твердофазного Аг-ИФА, или аппаратными методами ИФА на тест-полосках, но он по-прежнему остаётся важным подтверждающим тестом и неотъемлемой частью дифференциации трансмиссивных штаммов губчатых энцефалопатий на типичную и атипичную губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота и болезнь скрепи. Иммуноблоттинг также часто используют для определения специфичности индивидуальных MAb. Индивидуальные очищенные полипептиды (или рекомбинантно экспрессированные белки), также можно переносить посредством иммуноблоттинга на мембраны из нитроцеллюлозы или ПВДФ, чтобы исследовать реактивность

анализируемых сывороток в отношении индивидуальных белков. Этот характерный профиль реактивности может быть вспомогательным средством для различения вакцинированных и инфицированных животных, например, методы иммуноэлектроблоттинга с ферментативным усилением (ЕИТВ) и вестерн-блоттинга для эпизоотического стоматита (FMD), которые широко используются в Южной Америке (Bergmann *et al.*, 1993). Основным фактором, влияющим на успех применения методики иммуноблоттинга, является природа эпитопов, распознанных антителами. Большинство методик высокого разрешения с использованием геля включают некоторую степень денатурации антигена. В результате разрушаются конформационные детерминанты и сохраняется возможность выявлять только линейные или неконформационные эпитопы. Большинство поликлональных антисывороток содержат антитела к линейным и конформационным эпитопам, но МАb направлены на единичные эпитопы. Таким образом, если они нацелены на конформационные эпитопы, то не будут реагировать с денатурированным белком.

9. Флюоресцентное антитело

Модификация этого метода может быть использована для выявления антител. По существу, модификация заключается в использовании вторичного антитела, специфичного для антител анализируемых видов. Например, если собаку исследуют на присутствие специфических антител против лейшмании, антиген лейшмании фиксируют на предметном стекле, инкубируют с сывороткой исследуемой собаки, отмывают для удаления несвязанных антител и снова инкубируют с мечеными антителами против собаки (антитела, возникшие при иммунизации различных видов животных иммуноглобулинами собаки). Флюоресценция появляется только в том случае, если у исследуемого животного имеются специфические антитела против целевого антигена.

ВЗ. РАЗВИТИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКОВ

На стадии разработки находятся следующие технологии обнаружения белков:

- i) Мультиплексные платформы ИФА, которые можно развёртывать для создания «пакетных анализов болезней» (BVDV, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота [IBR], вирус парагриппа 3 [PI3] и респираторно-синцитиальный вирус [RSV]). Этот тест использует тот же самый принцип, что и обычный ИФА, но он адаптирован в микроформат.
- ii) Времяразрешённый флюоресцентный индуктивно-резонансный перенос энергии (TR-FRET), используемый в качестве источника генерирования сигналов. Мечение конъюгата и антигена проводят, используя два флуорофорных красителя. Принцип был проверен на конкурентном формате и сэндвич-формате.
- iii) «Потенциометрический ИФА», основанный на выработке электрического, а не цветного сигнала, требующий минимальной подготовки образца и приводящий к получению результата в течение 2–15 минут.
- iv) Анализ SERS (с коллоидным золотом в качестве лиганда) для выявления ДНК/РНК и белков в иммунологических реакциях, использующих пьезоэлектрический эффект, а также усиление сигнала при помощи магнитного захвата.
- v) Мультиплексный белковый анализ, основанный на генерировании сигнала при помощи пьезоэлектрического эффекта и модуляции колебаний, вызванных связыванием специфического анализируемого вещества. Этот анализ был разработан для быстрого получения результата (60 секунд), он обладает множественной активностью, обеспечивает качественные и количественные измерения, а также не нуждается в реактивах и/или инкубации. Устройство имеет размер мобильного телефона, а для ускорения анализа данных можно использовать интегрированную

беспроводную передачу результатов. Рабочий принцип был обоснован с научной точки зрения, и продолжают предварительные исследования применимости этого метода для диагностики птичьего гриппа.

vi) Метод близкого лигирования (PLA) для выявления антигенов

Анализы типа PLA представляют собой модификацию традиционных методов иммуногистохимии. Этот метод основан на применении двух антител, нацеленных на разные эпитопы одного белка, который выявляют вторичные антитела, меченые короткими цепями известной ДНК. После связывания вторичных антител их цепи ДНК амплифицируются, а затем комплементарные детекторные зонды (меченые флюоресцентными красителями) в свою очередь связываются с комплементарными последовательностями. Это приводит к многократному усилению сигнала и позволяет обнаружить минимальное количество целевого белка, представленного в образце. Эта методика используется в качестве инструмента для быстрого сканирования множества белков или протеомов.

vii) Анализ MALDI-TOF для детерминативной бактериологии

Времяпролётная масс-спектрометрия (MALDI-TOF) использует матрицу, поглощающую ультрафиолетовое излучение, которая смешана с полимером в подходящем растворителе. Смесь образца и матрицы помещают на наконечник измерительного зонда. В условиях вакуума растворитель удаляют, оставив сокристаллизованные молекулы полимера, гомогенно диспергированные между молекулами матрицы. Молярные массы определяют, используя импульсный лазерный луч с соответствующей частотой. Эта методика всё больше и больше используется в микробиологических лабораториях для выявления и дифференциации вирусных, бактериальных и грибковых патогенов.

В4. ПРОТЕОМИКА

Протеомом называется полная совокупность белков, экспрессируемых в клетке, ткани или организме, а протеомикой называется изучение белков, включая уровень их экспрессии, посттрансляционную модификацию и взаимодействие с другими белками в крупном масштабе. Поскольку не все белки экспрессируются постоянно, а их экспрессия зависит от физиологических и внешнесредовых факторов, протеомика может дать блестящее общее представление о болезненных процессах на уровне белков. Поскольку применение протеомики в разработке новых лекарств обещает огромную экономическую прибыль, компании во всём мире быстро вложили ресурсы в эту новую область исследований.

Многие методы протеомики, включая двумерный гель-электрофорез (2DGE) и масс-спектрометрию (MS), были разработаны много лет назад. Однако недавние успехи в развитии методик MS, наряду с полногеномным секвенированием и разработкой мощных платформ биоинформатики и робототехники, коренным образом изменили идентификацию белков. Общий принцип протеомики заключается в том, что белки разделяют, обычно методом 2DGE на полиакриламидных гелях, затем вырезают пятна белков, переваривают их трипсином, а полученные пептиды анализируют методом MS. Затем массы этих пептидов сравнивают с предсказанными массами пептидов, которые были получены в результате вычислительного анализа баз данных генома, что приводит к идентификации генов. MS можно также использовать для выведения аминокислотной последовательности пептидов и характеристики посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование или фосфорилирование. Метод 2DGE имеет некоторые недостатки, особенно в разделении гидрофобных белков, поэтому в настоящее время всё большее распространение для определённых целей завоёвывают другие методики разделения на основе жидкостной хроматографии. Тем не менее, 2DGE является методом выбора для

создания количественных карт белковой экспрессии, и с его помощью за короткий промежуток времени можно провести анализ многих тысяч белков.

Изменения в протеоме тканей тела или биологических жидкостей, таких как сыворотка, моча или спинномозговая жидкость измеряют прямым образом, поэтому можно точно определить сдвиги, происходящие в процессе болезни. Кроме идентификации молекул, которые могут быть целями новых методов лечения, этот подход служит очень мощным инструментом для диагностики заболеваний на ранней стадии. В настоящее время лучшие установленные клинические применения протеомики связаны с идентификацией маркеров для ранней диагностики онкологических заболеваний, например, маркеров рака мочевого пузыря в моче. Однако продолжаются интенсивные научно-исследовательские разработки и в других областях, таких как сердечно-сосудистые заболевания, болезнь Альцгеймера и инсулин-зависимый сахарный диабет.

Использование протеомики для диагностики инфекционных заболеваний находится на самой ранней стадии, но может оказаться очень важным диагностическим подспорьем. Например, окончательный диагноз хронической вирусной инфекции гепатита В (HBV) до сих пор устанавливают по результатам биопсии печени, но протеомный анализ образцов сыворотки показывает, что у больных хроническим гепатитом В значительно изменяется экспрессия, по меньшей мере, семи сывороточных белков. Сходным образом, протеомика может помочь в дифференциальной диагностике болезни Крейтцфельда-Якоба (CJD) до наступления смерти, поскольку предварительные данные показывают, что семь белков в спинномозговой жидкости (СМЖ) по-разному экспрессируются у больных с вариантной и спорадической формой этой болезни (Choe *et al.*, 2002).

Чрезвычайно полезное применение протеомики в диагностике инфекционных заболеваний связано с идентификацией новых диагностических антигенов при скрининге сывороток от инфицированных и неинфицированных субъектов при сравнении с данными иммуноблоттинга и 2DGE-картирования протеомов возбудителей инфекций.

В ветеринарной области научные исследования на основе протеомики идут полным ходом, и они, несомненно, в будущем дадут в руки ветеринаров новые диагностические инструменты. В стадии разработки находятся протеомные карты для ряда ветеринарных патогенов, включая бактерии (Mujer *et al.*, 2002), простейшие организмы (Rout & Field, 2001) и нематоды (Yatsuda *et al.*, 2003).

В5. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ ПРИ ПОМОЩИ ТЕХНОЛОГИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Достижения молекулярной биологии и генетики в 1970-е годы инициировали развитие технологии рекомбинантных ДНК. С тех пор эта технология играет жизненно важную роль в научных исследованиях, а также в диагностике и лечении заболеваний. В основе технологии рекомбинантных ДНК лежит простой перенос генов из одного организма в другой (буквально выражаясь, рекомбинация ДНК из разных источников). Цели технологии рекомбинантных ДНК включают идентификацию генов, выделение генов, модификацию генов и реэкспрессию генов в других хозяевах или организмах. Реализация этих целей позволит учёным и клиницистам идентифицировать новые гены и кодируемые ими белки, чтобы можно было исправлять эндогенные генетические дефекты и производить большое количество специфических генных продуктов, таких как гормоны, антигены для вакцин и другие белки, производимые теми биологическими агентами, которые вызывают интерес исследователей. Особое значение имеет степень специфичности, достигаемая в диагностических тестах с рекомбинантными белками.

Возможно, идеальными антигенами являются нативные белки, которые обеспечивают специфичные для последовательностей и поверхностные структурные эпитопы. Многие современные диагностические тесты требуют участия испытуемых антигенов, которые

должны быть получены из непрерывных источников: клеточных культур или от инфицированных животных. Такие препараты антигенов дороги и часто имеют короткий срок хранения, причём каждая новая партия антигенов требует стандартизации. Природные белки редко доступны в абсолютно чистой форме, поэтому антитела чаще всего развиваются против контаминированных полипептидов, что может приводить к ложноположительным результатам. Технология рекомбинантных ДНК производит антигены, которые имеют много преимуществ перед антигенами, выделенными из других биологических источников. Эти преимущества включают высокую чистоту, высокую специфическую активность, и, поскольку белок синтезируется в генетически модифицированных клетках, выращенных в лаборатории, каждый препарат белкового продукта идентичен предыдущему препарату, что гарантирует постоянство материала от партии к партии. Когда рекомбинантные антигены используют в сочетании с форматом кИФА, отпадает необходимость очистки рекомбинантного антигена от лизата, поскольку специфичность кИФА зависит, главным образом, от используемых МАб.

Общая схема процедуры получения антигенов посредством технологии рекомбинантных ДНК такова. Идентификация антигена, имеющего потенциальное диагностическое или научное значение достигается, благодаря изучению реакции антител хозяина на белки подозрительного микроорганизма. Высокоиммунные антигены, т.е., определённые белки микроорганизма, против которого организм хозяина отвечает потенциально самым высоким титром антител, вызывают особый интерес, поскольку они, вероятно, являются главными стимулами клеточного и гуморального иммунитета против определённого патогена. Для идентификации биологически значимых высокоиммунных антигенов, применяемых в создании моноклональных антител, а также в разработке вакцин, широко используются исследования по распознаванию антигенов. После идентификации интересующего белка создают ген, кодирующий этот белок, используя матричную РНК (мРНК) из микроорганизма как матрицу для получения кДНК. Этот метод клонирования гена, кодирующего анализируемый белок, требует того, чтобы предварительно была известна последовательность этого гена, или непосредственно от вызывающего интерес микроорганизма, или через использование последовательностей генов близкородственных биологических видов. Если данные о последовательности гена недоступны, то в качестве альтернативного метода используется создание рекомбинантных библиотек из геномной ДНК микроорганизма или кДНК, синтезированной из мРНК. Фрагменты рекомбинантных библиотек клонируют в систему экспрессии белка (прокариотическую или эукариотическую), а полученную библиотеку генов, скринируют на экспрессию белка.

Имеется широкий выбор систем экспрессии. Белок может быть экспрессирован бактериями, обычно *E. coli*, дрожжами, клетками насекомых при использовании бакуловируса, или эукариотическими клетками при введении в них соответствующих вирусных векторов или при перманентной трансфекции. Различия в гликозилировании, связанные с исходными культурами клеток (бактерии, клетки насекомых или млекопитающих), способствуют модификации структуры белка и его реактивности с антителом. Может понадобиться выделение антигена из клетки, или он может быть секретирован. Очистка требуется часто, но не всегда. Намечается тенденция в производстве антигенов аналитического назначения, связанная с разработкой синтетических пептидных антигенов. При тестировании антигенов на возможность их использования в качестве диагностических реактивов, исходя из геномной последовательности, отпадает необходимость экспрессии цельного белка, что существенно укорачивает процесс.

Уже были определены геномные последовательности многих патогенов. Ген, ответственный за антиген, (иммуноген) легко можно клонировать при помощи технологий ПЦР и охарактеризовать по нуклеотидной последовательности (Rappuoli & Covacci, 2003). Вкратце, амплифицированную ДНК можно клонировать в бактериальном плазмидном

векторе и экспрессировать как рекомбинантный антиген. Клонированный ген можно сконструировать таким образом, чтобы рекомбинантный белок на его N- или C-конце был соединён с детекторной меткой, которую можно использовать при его очистке аффинной хроматографией. Существует много меток, но самыми популярными являются полигистидин (6-8 остатков), глутатион-S-трансфераза (GST) или пептид Flag, состоящий из 8 аминокислотных остатков. Затем можно определить антигенные характеристики генных продуктов. Систематический скрининг гена, кодирующего антиген, *in silico* (виртуально) по данным геномной последовательности ускоряет разработку диагностических наборов и вакцин (Tortorella *et al.*, 2000).

В6. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Существует целый ряд тенденций в диагностических технологиях, которые покажут путь, по которому будет развиваться диагностика в будущем. Они относятся к лабораторной обстановке, анализу данных и борьбе с болезнями:

- i) Глобальное развитие технологий чипов породило сильную тенденцию к миниатюризации форматов тестирования, как в молекулярных методах, так и в анализах по выявлению белков. Форматы тестов варьируются от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров.
- ii) Могут быть развиты, хотя и в миниатюрном формате, мультиплексные платформы, способные выявлять в одном образце от небольшого числа до нескольких тысяч патогенов.
- iii) Миниатюризация формата тестов сопровождается параллельной миниатюризацией лабораторного оборудования, что позволяет проводить тестирование в полевых условиях. Эта тенденция приводит к использованию в полевых условиях сложного современного оборудования, которое ранее использовалось только в лаборатории, что облегчает и ускоряет раннюю диагностику инфекционных заболеваний, а также оказывает влияние на реакцию со стороны соответствующих компетентных органов.
- iv) Развитие альтернативных источников генерирования/усиления сигналов, заменяющее свет измерением масс, пьезоэлектрическим эффектом или концентрацией лиганда, приведёт к созданию совершенно новой платформы технологий.
- vi) Хотя развитие новых технологий часто означает улучшение возможностей, всегда необходимо уделять внимание фактической значимости и роли подтверждающих тестов в диагностике!
- viii) Поскольку диагностические платформы непрерывно изменяются в направлении вышеописанных тенденций, это повлияет на некоторые компоненты в цепочке мероприятий по борьбе с болезнями. Для того чтобы систематически собирать, хранить и анализировать в относительно короткое время большие объёмы данных, созданные благодаря новым технологиям, необходимо развивать соответствующие коммуникационные технологии/информационные системы. Вероятно, будет проявляться растущая тенденция к вводу результатов в режиме реального времени через мобильные телефоны или Интернет, что потребует соответствующего развития информационно-технологических систем и систем обработки данных.
- ix) Составными компонентами технологического обновления должны быть соответствующая инфраструктура и подготовленность. Это будет включать дистанционное обучение тестированию в полевых условиях (сбор и подготовка образцов, тестирование, интерпретация полученных результатов, обработка образцов для отправки в референтные лаборатории и отчётность перед компетентными органами).

- х) Адаптация национальных резервных планов действий к одновременной борьбе с множественными болезнями, а также с новыми, неожиданными болезнями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

BELÁK S. & THORÉN P. (2001). Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, **1** (4), 434–443.

BELÁK S., THORÉN P., LEBLANC N. & VILJOEN G (2009). Advances in viral disease diagnostic and molecular epidemiological techniques. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **9** (4), 367–381.

BEXFIELD N. & KELLAM P. (2011): Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Vet. J.*, **190**, 191–198.

CHOE L.H., GREEN A., KNIGHT R.S., THOMPSON E.J. & LEE K.H. (2002). Apolipoprotein E and other cerebrospinal fluid proteins differentiate ante mortem variant Creutzfeldt-Jakob disease from ante mortem sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Electrophoresis*, **23**, 2242–2246.

GILL P. & GHAEMI A. (2008). Nucleic acid isothermal amplification technologies – a review. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **27**, 224–243.

HAINES D.M. & CLARK E.G. (1991). Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.*, **32**, 295–302.

HARPSTER M.H., ZHANG H., SANKARA-WARRIER A.K., RAY B.H., WARD T.R., KOLLMAR J.P., CARRON K.T., MECHAM J.O., CORCORAN R.C., WILSON W.C. & JOHNSON P.A. (2009). SERS detection of indirect viral DNA capture using colloidal gold and methylene blue as a Raman label. *Biosensors & Bioelectronics*, **25**, 674–681.

KUNIN V., COPELAND A., LAPIDUS A., MAVROMATIS K. & HUGENHOLTZ P. (2008). A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72** (4), 557–578.

LEWIN S., SCHONIAN G., EL TAI N., OSKAM L., BASTIEN P. & PRESBER W. (2002). Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 1267–1276.

LIBEAU G., DIALLO A., COLAS F. & GUERRE L. (1994). Rapid differential diagnosis of rinderpest and pestes des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.*, **134**, 300–304.

LIPKIN W.I. (2010). Microbe hunting. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **74** (3), 363–377.

LOZA-RUBIO E., AGUILAR-SETIÉN A., BAHLOUL CH., BROCHIER B., PASTORET P.P. & TORDO N. (1999). Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico. *Arch. Med. Res.*, **30**, 144–149.

MIGNON B., DUBUISSON J., BARANOWSKI E., KOROMYSLOV I., ERNST E., BOULANGER D., WAXWEILER S. & PASTORET P.P. (1991). A monoclonal ELISA for bovine viral diarrhoea pestivirus antigen detection in persistently infected cattle. *J. Virol. Methods*, **35**, 177–188.

MOLINA CABALLERO J.M., ANGUIANO A., FERRER O., SERRANO E. & UCEDA A. (1993). Use of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of clinical paratuberculosis in goats. Study by western blotting of false-positive reactions. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 629–638.

MUJER V.C., WAGNER M.A., ESCHENBRENNER M., HORN T., KRAYCER J.A., REDKAR R., HAGIOUS S., ELZER P. & DELVECCHIO V.G. (2002). Global analysis of *Brucella melitensis* proteomes. *Ann. NY Acad. Sci.*, **969**, 97–101.

MULDER J. & BRANS L.M. (1952). Studies on the antigenic behaviour of egg- and egg-mouse-egg-lines of strains of influenza virus, with the aid of the haemagglutination-inhibition test. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **18** (2), 139–152.

PALACIOS G., DRUCE J., DU L., TRAN T., BIRCH C., BRIESE T., CONLAN S., QUAN P.L., HUI J., MARSHALL J., SIMONS J.F., EGHOLM M., PADDOCK C.D., SHIEH W.J., GOLDSMITH C.S., ZAKI S.R., CATTON M. & LIPKIN W.I. (2008): A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases. *New Engl. J. Med.*, **358-10**, 991–998.

ROUT M.P. & FIELD M.C. (2001). Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*. Identification of a major repetitive nuclear lamina component. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38261–38271.

SAIKI R., GEFLAND D., STOFFEL S., SCHANF S., HIGUCHI R., HORN G., MULLIS K. & ERLICH H. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, **293**, 487–491.

SANGER F., NICKLEN S. & COULSON A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74** (12), 5463–5467.

SCHALLER O., FATZER R., STACK M., CLARK J., COOLEY W., BIFFIGER K., EGLI S., DOHERR M., VANDELDELDE M., HEIM D., OESCH B. & MOSER M. (1999). Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **98**, 437–443.

SCHWEIGER B., PAULI G., ZEICHHARDT H. & KUCHERER C. (1997). A multicentre quality assessment study to monitor the performance of HIV-1 PCR. *J. Virol. Methods*, **67**, 45–55.

THORGEIRSDOTTIR S., GEORGSSON G., REYNISSON E., SIGURDARSON S. & PALSDOTTIR A. (2002). Search for healthy carriers of scrapie: an assessment of subclinical infection in an Icelandic scrapie flock by three diagnostic methods and correlation with PRP genotypes. *Arch. Virol.*, **147**, 709–722.

TORTORELLA D., GEWURZ B.E., FURMAN M.H., SCHUST D.J. & PLOEGH H.L. (2000). Viral subversion of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.*, **18**, 861–926.

TRUEBLOOD E.S., MCGUIRE T.C. & PALMER G.H. (1991). Detection of anaplasma marginale rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1542–1544.

YATSUDA A.P., KRIJGSVELD J., CORNELISSEN A.W., HECK A.J. & DE VRIES E. (2003) comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J. Biol. Chem.*, **278**, 16941–16951.
