

2. Дармограй, Л.М. Конверсия корма и производительные показатели молодняка кроликов при различном количестве дрожжей [Текст] / Л.М. Дармограй, М.С. Шевченко, И.С. Лучин // Научный вестник Львовского национального университета вет. медицины. – 2014. – Т 16. – № 3 (60). – Ч. 3. – С. 93-100.

3. Беоглу, Е.В. Влияние усредненного кормового рациона на показатели роста мясного гибрида кроликов в условиях интенсивного производства [Текст] / Е.В. Беоглу, Н.П. Здюмаева, Е.В. Озерецковская // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе: сборник статей 69-й международной научно-практической конференции: в 3-х томах. – Т. 1. – Караваево: Костромская ГСХА, 2018. – С. 149-152.

4. Кондрашкин, М.А. Мясная продуктивность и оценка качества мяса при откорме молодняка кроликов при использовании экспериментального комбикорма / М.А. Кондрашкин, Н.И.Кульмакова, Е.В. Шастина // Наука, образование и бизнес: новый взгляд или стратегия интеграционного взаимодействия: сборник научных трудов по материалам 2 Международной научно-практической конференции. –Нальчик: ФГБОУ ВО Карардино-Балкарский ГАУ, 2022. – С. 173-177

5. Озерецковская, Е.В. Продуктивные качества самок кроликов при использовании универсального комбикорма в условиях промышленной технологии [Текст] / Е.В. Озерецковская, Н.П. Здюмаева, Е.В. Беоглу // Кролиководство и звероводство. – 2018. – №5. – С. 51-55.

6. Lebas, F. Quelques pistes pour améliorer la productivité et la rentabilité d'un élevage commercial de lapin's. François LEBAS Directeur de Recherches honoraire INRA Association "Cuniculture" - France <http://cuniculture.info> VISEU – 19 oct. 2017, – p.1-38.

7. Roy, P., Fonteniau, J., Charrier, J. F., Lebas, F., 2017. Performances de croissance et d'abattage de lapins engraisés en cages ou en parcs avec une alimentation rationnée. Effect de la distribution de foin. 17èmes Journées de la Recherche Cunicole, 21 et 22 November 2017, Le Mans, France, p.47-60 + presentation.

УДК 619:616.98:578.842.1:616-076

## **ВИЗУАЛЬНОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ**

*Глазунова Анастасия Александровна, заместитель руководителя группы,  
СамНИВИ – филиала ФГБНУ ФИЦВиМ, [glazunovaaa@inbox.ru](mailto:glazunovaaa@inbox.ru)*

*Краснова Елена Анатольевна, ученый секретарь, СамНИВИ – филиала  
ФГБНУ ФИЦВиМ, [novitchkova@rambler.ru](mailto:novitchkova@rambler.ru)*

*Севских Тимофей Александрович, руководитель НОЦ, ФГБНУ ФИЦВиМ,  
[sefskih@mail.ru](mailto:sefskih@mail.ru)*

**Титов Илья Андреевич**, заведующий лабораторией Молекулярной Вирусологии, ФГБНУ ФИЦВиМ, TitoffIA@yandex.ru

**Аннотация:** в настоящее время основной мировой тенденцией является разработка и внедрение в практику тест-систем для проведения комплексного многофакторного анализа, основная задача которого дополнить или заменить рутинные методы диагностики патогенных микроорганизмов более чувствительными и экспрессными методами, позволяющими идентифицировать возбудителя непосредственно в полевых условиях без необходимости доставки биоматериала от с/х животных в стационарные лаборатории. Одним из методов, позволяющих реализовать эту концепцию, является метод петлевой изотермической амплификации ДНК с колориметрической детекцией результатов.

**Ключевые слова:** ПЦР, LAMP, колориметрический буфер, амплификация.

Контроль над появлением и распространением болезней животных является важным мировым приоритетом в обеспечении биологической безопасности продуктов животноводства на государственном уровне. Высокая летальность при инфекционных заболеваниях животных и большие экономические потери при ликвидации последствий вспышек обуславливают необходимость разработки эффективных и быстрых методов диагностики. Использование высокоточных диагностических подходов позволяет быстро идентифицировать возбудителя заболевания, что в последующем способствует имплементации адекватных мер по своевременному предупреждению экспансии опасных болезней.

Одним из широко распространенных методов диагностики множества болезней, тщательно апробированным клинически и ставшим стандартным для ряда инфекций, является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Данный метод имеет ряд минусов, выражающихся в необходимости дорогостоящего оборудования, специфических реактивов и обученного персонала, а проведение анализа занимает несколько часов.

Альтернативой ПЦР могут служить методы изотермической амплификации. Наиболее известны три подобных метода: метод амплификации нуклеиновых кислот NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA), рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА) и петлевая изотермическая амплификация ДНК (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP). В основе метода NASBA лежит обнаружение специфических фрагментов нуклеиновых кислот с помощью двух специфических праймеров и трех ферментов [1]. Недостаток метода NASBA заключается в том, что при использовании длинных или слишком коротких нуклеотидных фрагментов последовательностей амплификация будет проходить менее эффективно, по сравнению с ПЦР. Кроме того, данный метод имеет высокую стоимость и сложен в проведении [3].

Метод РПА основан на амплификации специфического участка последовательности ДНК, ограниченного парой праймеров. Амплификация

происходит в изотермических условиях, что существенно увеличивает её скорость по сравнению с ПЦР, и происходит за счёт взаимодействия нескольких ферментов [5]. К недостаткам данного метода можно отнести высокую стоимость реактивов, а также то, что эти реактивы не производятся в Российской Федерации.

Наиболее широкое распространение получил метод LAMP, который основан на изотермической амплификации с участием *Bst* ДНК-полимеразы. К плюсам этого метода можно отнести простоту постановки реакции, доступность реактивов на отечественном рынке, низкие требования к оборудованию, а также высокую скорость протекания реакции. Главным минусом метода является сложность его разработки, поскольку необходимо произвести подбор шести специфических праймеров с уникальными характеристиками для корректной работы [7.]. Несмотря на наличие на рынке вариантов широкого спектра импортных реактивов для LAMP-диагностики инфекционных заболеваний животных, эти реагенты имеют высокую стоимость, а готовые к применению отечественные наборы на рынке отсутствуют.

Исходя из этого, актуальным вопросом остается разработка средств экспресс-диагностики болезней животных. Оптимизация и модификация имеющихся протоколов диагностики на основе метода LAMP позволит сократить время до получения результата, а также предоставит потенциальную возможность использования этих тест-систем в полевых условиях.

Исходя из вышесказанного, целью нашего исследования была оптимизация и модернизация протокола постановки LAMP с колориметрической детекцией результатов для молекулярно-генетической диагностики АЧС.

Исследование проводили на базе лаборатории Молекулярной вирусологии ФГБНУ ФИЦВиМ. В качестве исследуемого образца использовали плазмиду, несущую вставку фрагмента гена B646L (P72) вируса африканской чумы свиней II генотипа, в серии 10-кратных разведений (от  $10^8$  до  $10^0$ ). Постановку реакции LAMP проводили по колориметрическому протоколу LAMP Felipe Navarro Martínez, Fernan Federici Laboratoriode Tecnologías Libres & Millennium Institute for Integrative Biology (iBio), Santiago, Chile [6].

Реакционная смесь LAMP состояла из трех пар праймеров: FIP и VIP (0,8 мкМ), LoopF и LoopB (0,4 мкМ), F3 и B3 (0,2 мкМ) (праймеры разработаны Bohorquez J.A. et.al, 2023 [2]), буфера, состоящего из dNTPs,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , KCl и Tween 20 (таблица 1), в качестве индикатора использовали краситель феноловый красный. Изотермическую амплификацию проводили в термостате "Гном" (ДНК-Технология, Россия) при 65 °С 30 мин. Результат реакции оценивался по изменению цвета реакционной смеси (желтый – «положительный», красный – «отрицательный»), что определялось «невооруженным глазом» без использования специального оборудования [4].

*Таблица 1*

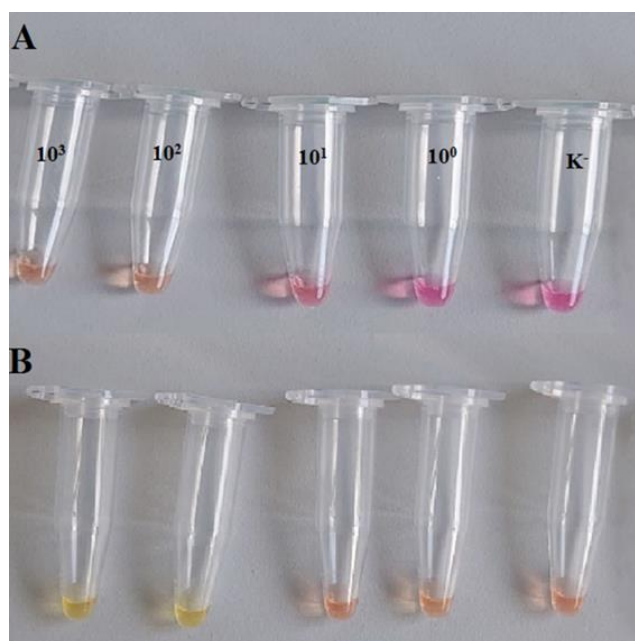
### Состав буферной смеси

Реактивы	Кол-во вещ-ва	2xБуферный р-р	Объем на 1мл
dNTPs	10 мМ	2,8 мМ	280 мкл
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 М	20 мМ	20 мкл
MgSO <sub>4</sub>	1 М	16 мМ	16 мкл
KCl	1 М	100 мМ	100 мкл
Tween 20	100 %	0,2 %	2 мкл
Общий объем смеси			418

В результате амплификации серии стандартных образцов методом LAMP с использованием колориметрического буфера отмечалось изменение pH реакции в образцах с разведениями от  $10^8$  до  $10^2$ , что свидетельствует об успешной амплификации. Образцы в разведениях от  $10^1$  до  $10^0$  являлись отрицательными. С целью подтверждения полученных результатов исследование было воспроизведено с использованием коммерческого набора WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA&RNA) (NEB, США) (рисунок 1). Были получены аналогичные результаты, что свидетельствует о возможности применения оптимизированного колориметрического буфера для постановки реакции LAMP.

Внедрение в рутинную лабораторную практику тест-систем на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) остается актуальной задачей. Этот метод может занять свою нишу в качестве экспресс-метода диагностики, и может найти применение наряду с ПЦР-исследованиями.

Отработанный протокол LAMP с колориметрической детекцией результатов амплификации продемонстрировал высокую воспроизводимость и простоту в интерпретации результатов.



**Рис.1 Сравнение результатов колориметрической LAMP**

А - по протоколу LAMP с буфером для колориметрической детекции. В - с коммерческим набором WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA&RNA) (NEB, США).

Данный факт свидетельствует о возможности применения методики LAMP с колориметрической детекцией как экспресс-метода диагностики болезней животных и подходит для первичных скрининговых исследований.

### Библиографический список

1. Полуян, О. С. Реакция транскрипционной амплификации как новый этап в развитии технологий клинико-лабораторного молекулярно-биологического исследования / О.С. Полуян, С. А. Костюк, Т. В. Глинкина // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. – 2011. – № 3. – С. 119-123.
2. Bohorquez, J. A., Lanka, S., Rosell, R., Pérez-Simó, M., Alberch, M., Rodriguez, F., Ganges, L., & Maddox, C. W. Efficient detection of African Swine Fever Virus using minimal equipment through a LAMP PCR method. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2023, 13.
3. Deiman, B. Characteristics and applications of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) / B. Deiman // *Mol. Biotech.* – 2007. – Vol. 20. – P. 163-179.
4. Jomoui, W., Srivorakun, H., Chansai, S., & Fucharoen, S. (2022). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) colorimetric phenol red assay for rapid identification of  $\alpha 0$ -thalassemia: Application to population screening and prenatal diagnosis / W. Jomoui // *PloS one*. – 2022. – Vol. 17(4),
5. Li, J., Macdonald, J., & von Stetten, F. (2018). Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. / J. Li // *The Analyst*. – 2018. – Vol. 144(1). – P. 31–67.
6. Navarro, F. M, Federici, F. Colorimetric LAMP/RT-LAMP Protocol / F. M Navarro//[protocols.io](https://www.protocols.io/view/colorimetric-lamp-rt-lamp-protocol) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.protocols.io/view/colorimetric-lamp-rt-lamp-protocol> 5qrvor3x7v4o/v1y. – Заглавие с экрана. – (Дата обращения: 30.05.2023.).
7. Padzil, F, Mariatulqabtiah, A.R, Tan, W.S, Ho, K.L, Isa, N.M, Lau, H.Y, Ab, J, Chuang, K.P. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) as a Promising Point-of-Care Diagnostic Strategy in Avian Virus Research / F. Padzil // *Animals (Basel)*. - 2021 Dec 30;12(1):76.

УДК 636.09: 615.371

### СКРИНИНГ ЖИВЫХ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ КРУПНОГО И МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА НА НАЛИЧИЕ МИКОПЛАЗМ И ВИРУСНЫХ КОНТАМИНАНТОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПЦР

*Долинская К.Г., специалист отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», [k.dolinskaya@vgnki.ru](mailto:k.dolinskaya@vgnki.ru)*

*Горбачева Н.С., научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», [gorbacheva@vgnki.ru](mailto:gorbacheva@vgnki.ru)*

*Брюсова М.Б., ведущий научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ», [m.bryusova@vgnki.ru](mailto:m.bryusova@vgnki.ru)*