

блемы аграрной науки и пути их решения : сб. науч. тр. Кинель, 2016. – С. 194-198.

3. Ermakov V, Titov N. An innovative modification of the nutrient medium formulation for the isolation and differentiation of enterobacteriae. В сборнике: BIO Web conferences. Agriculture and Food Security: Technology, Innovation, Markets, Human Resources. Kazan, 2021. С. 00063.

4. Конищева, А. С. Микробиом кишечника телят при дисбактериозе / А. С. Конищева, В. И. Плешакова, Н. А. Лещева // Вестник Омского государственного аграрного университета. – 2021. – № 3 (43). – С. 70-77.

2. Самойленко, В. С. Влияние опытного образца синбиотического средства на микробиоценоз желудочно-кишечного тракта телят в раннем постнатальном онтогенезе / В. С. Самойленко, Н. А. Ожередова, Е. В. Светлакова // Ветеринарная патология. – 2021. – № 2 (76). – С. 53-58.

3. Молянова, Г.В. Биохимические параметры крови козлят зааненской породы при применении препарата на основе *Bacillus amyloliquefaciens* / Г.В. Молянова, В.В. Ермаков, О.В. Семкина, А.П. Винокурова // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. 2023. №4. С. 79–86. doi: 10.55170/19973225_2023_8_4_79

УДК 619:616.98:578.842.1:616-076

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ ГРИППА ТИПА А ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Глазунова Анастасия Александровна, зам. руководителя группы лаборатории, ФГБНУ ФИЦВиМ

Севских Тимофей Александрович, руководитель НОЦ, ФГБНУ ФИЦВиМ

Лунина Дарья Александровна, зам. руководителя группы, СамНИВИ – филиала ФГБНУ ФИЦВиМ

Кудряшов Дмитрий Андреевич, микробиолог, ФГБНУ ФИЦВиМ

Титов Илья Андреевич, зав. лабораторией, ФГБНУ ФИЦВиМ

Аннотация. В исследовании была оптимизирована колориметрическая ЛАМР с использованием отечественных реагентов. Протокол ЛАМР с колориметрической детекцией результатов амплификации продемонстрировал высокую воспроизводимость и простоту интерпретации, что свидетельствует о его перспективности для экспресс-диагностики болезней животных и полевых скрининговых исследований.

Ключевые слова: вирус гриппа типа А, петлевая изотермическая амплификация, колориметрическая детекция, диагностика болезней животных, полевые скрининговые исследования.

Массовое и неконтролируемое распространение вируса гриппа птиц (ВГП) представляет серьезную угрозу для здоровья животных и человека, а

также для глобальной экономики. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения животных, грипп типа А уже выявлен у более чем 70 видов млекопитающих, включая американского черного медведя, лису, американскую куницу, европейского хорька, южноамериканскую лисицу, южноамериканского морского льва, дальневосточного леопарда, серого тюленя, полосатого скунса, дельфина-афалину, морского слона, морскую выдру, виргинского опоссума, южноамериканского тюленя, овец, коз, крупный рогатый скот и других животных [1]. Вирус остается опасным и для людей, особенно циркулирующий в Европе и России клад 2.3.4.4b.

В настоящее время широкомасштабное распространение вируса является глобальной проблемой для мирового птицеводства, приводя к значительным экономическим и экологическим потерям. Водоплавающие птицы служат естественным резервуаром ВГП. Во время миграций они обмениваются различными штаммами вируса с другими видами птиц и переносят его на новые территории, что часто приводит к антигенному дрейфу и шифту, вызывая новые мутации гриппа типа А [2]. Эта ситуация требует постоянного мониторинга в различных регионах для получения актуальных знаний об эволюции вируса гриппа птиц и предотвращения новых эпизоотических и эпидемических вспышек.

Эпизоотическая ситуация по ВГП в мире остается напряженной, затрагивая новые страны и территории, с большим количеством случаев среди дикой орнитофауны. По данным Всемирной организации здравоохранения животных, за первые восемь месяцев 2024 года было зарегистрировано 1129 случаев гриппа типа А (42% среди диких птиц, 37% среди домашней птицы и 21% среди животных). В Российской Федерации за этот период Россельхознадзор зарегистрировал один случай на территории АО «Птицефабрика Островная» в Сахалинской области.

Одним из ключевых изменений в динамике вспышек за последние годы стало их сезонное проявление. Ранее глобальная сезонность начиналась в октябре с пиком в феврале. Начиная с 2023 года, увеличение числа вспышек по-прежнему отмечается в октябре, однако пик, который ранее приходился на февраль, теперь наблюдается в январе [3].

Быстрая диагностика гриппа птиц является важным этапом в контроле болезни, позволяя своевременно выявлять заболевание. Как и в случае с многими другими вирусными заболеваниями, "золотым стандартом" в диагностике гриппа типа А является молекулярно-генетический метод — полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. Этот метод отличается высокой чувствительностью и специфичностью, позволяя обнаружить вирус на ранних стадиях заболевания. Несмотря на широкое применение ПЦР, не во всех регионах имеются лаборатории, оборудованные для проведения данного вида диагностики. Также остаются определенные проблемы, связанные со сложностью и длительностью проведения ПЦР, высокой стоимостью оборудования и высокими требованиями к квалификации персонала.

В настоящее время ведутся активные поиски решений для внедрения экспресс-методов диагностики, которые были бы столь же специфичны, как и метод ПЦР, но при этом более просты и удобны в использовании, что позволило бы применять их даже в полевых условиях. Одним из перспективных направлений являются изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот, такие как LAMP-тесты [4]. К их преимуществам можно отнести быструю скорость проведения реакции (от 30 до 60 минут), что позволяет оперативно получать результаты, а также сопоставимость результатов с данными ПЦР. Оборудование для проведения LAMP-тестов относительно доступно и недорого. Однако, несмотря на эти достоинства, данный метод диагностики пока не получил такого широкого распространения, как ПЦР, и не является официально зарегистрированным диагностическим методом. Тем не менее, на рынке уже появляются такие тесты со специализированным оборудованием, например: PCRBOT (Биодайв, Россия), предназначенный для экспресс-анализа ПЦР, но данное оборудование не может справиться со скрининговыми исследованиями гриппа типа А в полевых условиях, так как в настоящий момент рассчитан для исследования только одной пробы.

С учетом значимости мониторинговых исследований и перспектив интеграции LAMP в рутинную лабораторную диагностику в полевых условиях, была сформулирована цель оптимизации недорогого и эффективного метода изотермической колориметрической LAMP с применением отечественных реагентов.

Исследование было проведено в лаборатории «Молекулярная вирусология» ФГБНУ ФИЦВиМ. В качестве образцов использовалась плазида, несущая вставку фрагмента гена М гриппа типа А размером 206 п.о. в серии 10-кратных разведений (от 10^6 до 10^0).

В качестве красителя использовали рН-зависимый индикатор крезоловый красный с диапазоном изменения рН от 7,2 до 8,8. Уникальность данного индикатора заключается в том, что крезоловый красный не ингибирует Bst-полимеразу в той же степени, что и другие распространенные индикаторы-красители. Постановку реакции LAMP проводили с использованием колориметрического протокола LAMP, разработанного Felipe Navarro Martínez с коллегами [5].

По данному протоколу использовалась реакционная смесь LAMP состоящая из трех пар праймеров: FIP и VIP (0,8 мкМ), LoopF и LoopB (0,4 мкМ), F3 и B3 (0,2 мкМ) [6], буфера, состоящего из dNTPs, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KCl и Tween 20 и крезолового красного в качестве индикатора. Подробный состав буфера описан в таблице 1. Изотермическая амплификация проводилась в термостате "Гном" (ДНК-Технология, Россия) при 60°C в течение 30 минут. Результат реакции оценивался по изменению цвета реакционной смеси (желтый – «положительный», красный – «отрицательный»), что определялось невооруженным глазом без использования специального оборудования.

Состав буферной смеси

Реактивы	Концентрации сто- ковых растворов	2xБуферный р-р	Объем на 1мл
dNTPs	10 мМ	2,8 мМ	280 мкл
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 М	20 мМ	20мкл
MgSO ₄	1 М	16 мМ	16мкл
KCl	1 М	100 мМ	100мкл
Tween 20	100%	0,2 %	2мкл
Общий объем смеси			418

Так же чувствительность использованных плазмид и сопоставимость результатов колориметрической LAMP с индикатором крезоловый красный сравнивались с результатами ПЦР. Постановка ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) проводилась с синтезированными плазмидами согласно верифицированным протоколам, рекомендованным Институтом Фридриха Лёффлера (FLI, Германия) [7]. В соответствии с данным протоколом, использовались рекомендованные FLI праймеры и зонд, готовая реакционная смесь для ПЦР (5X qPCRmix-HS) и деионизированная вода, не содержащая нуклеаз. Амплификация проводилась на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) с детекцией сигнала в канале FAM.

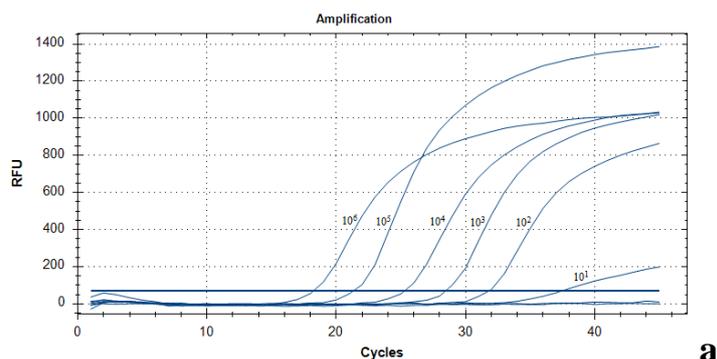
Все экспериментальные работы осуществляли в соответствии с Сан-ПиН 3.3686-21. Исследования проводили в двух отдельных помещениях (зонах) согласно МУ 1.3.2569-09.

В результате амплификации серии стандартных разведений плазмиды методом LAMP с использованием колориметрического буфера наблюдалось изменение pH реакции в образцах с разведениями от 10^6 до 10^2 , в то время как в образцах с разведениями от 10^1 до 10^0 изменения pH не наблюдалось (рисунок 1б) [8]. Постановка аналогичных образцов разведения плазмид методом РВ-ПЦР показало успешную амплификацию в образцах с разведениями от 10^6 до 10^1 (рис. 1а).

Эти результаты согласуются с ожидаемым пределом обнаружения при сравнении методики на основе РВ-ПЦР с колориметрической методикой на основе LAMP. Пределом чувствительности для методики на основе LAMP с колориметрической детекцией составил 10^2 разведение плазмиды, что соответствует $Ct=32$ для методики на основе РВ-ПЦР.

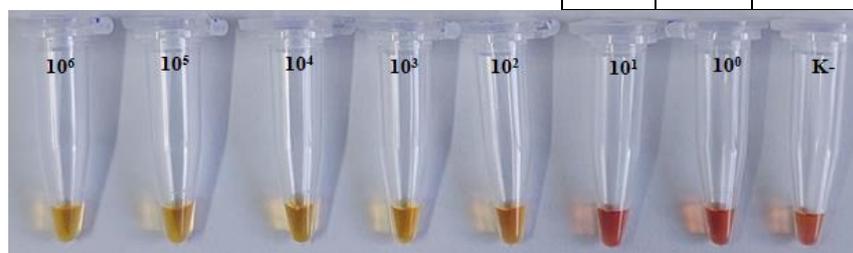
Таким образом, было установлено, что методика на основе LAMP с колориметрической детекцией обладает достаточной степенью чувствительности для применения в мониторинговых исследованиях на ВГП.

Внедрение тест-систем на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) в рутинную лабораторную практику остается актуальной задачей. Протокол LAMP с колориметрической детекцией результатов амплификации продемонстрировал высокую воспроизводимость и простоту в интерпретации результатов, что свидетельствует о возможности его применения как экспресс-метода диагностики болезней животных и для первичных полевых скрининговых исследований.



а

Well	Fluor	Content	Cq
D04	FAM	Unkn	18,19
D05	FAM	Unkn	21,28
D06	FA	Unkn	25,24
D 7	F	Un n	28,42
D08	FAM	Unkn	31 75
D09	FAM	Unkn	37,
D10	FAM	Unkn	N/A
D12	FAM	Neg Ctrl	N/A



б

Рисунок 1. Сравнение результатов колориметрической LAMP с результатами РВ-ПЦР: а – по протоколу РВ-ПЦР, б – по протоколу LAMP с буфером для колориметрической детекции.

Библиографический список

1. CDC / Technical Report: June 2024 Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Viruses [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/bird-flu/php/technical-report/h5n1-06052024.html>. – Заглавие с экрана. – (Дата обращения: 30.09.2024.)
2. Blagodatski, A. Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology / A. Blagodatski, K. Trutneva, O. Glazova, O. Mityaeva, L. [at all.] // Pathogens. 2021 May 20;10(5):630. doi: 10.3390/pathogens10050630.
3. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control; European Union Reference Laboratory for Avian Influenza; Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J.L., Kuiken, T. [at all.] Avian influenza overview September-December 2023. EFSA J. 2023 Dec 19;21(12):e8539. doi: 10.2903/j.efsa.2023.8539.
4. Kashir, J., Yaqinuddin, A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. Med Hypotheses. 2020 Aug;141:109786. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786. Epub 2020 Apr 25.
5. Navarro, F. M, Federici, F. Colorimetric LAMP/RT-LAMP Protocol / F. M Navarro//protocols.io [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

<https://www.protocols.io/view/colorimetric-lamp-rt-lamp-protocol-5qrvor3x7v4o/v1y>. – Заглавие с экрана. – (Дата обращения: 30.09.2024.).

6. Golabi, M., Flodrops, M., Grasland, B., Vinayaka, A.C., Quyen, T.L., Nguyen, T, Bang, D.D., Wolff A. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and On-Site Detection of Avian Influenza Virus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Apr 19;11:652048. doi: 10.3389/fcimb.2021.652048.

7. Spackman, E., Senne, D.A., Myers, T.J., Bulaga, L.L., Garber, L.P., Perdue, M.L., Lohman, K., Daum, L.T., Suarez, D.L.. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3256-60. doi: 10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002.

8. Zhang, S., Shin, J., Shin, S., & Chung, Y. J. (2020). Development of reverse transcription loopmediated isothermal amplification assays for point-of-care testing of avian influenza virus subtype H5 and H9. *Genomic sand Informatics*, 18(4), 1–8. doi:10.5808/GI.2020.18.4.E40.

УДК 619:636.92:612.1:612.2

ИНЪЕКЦИИ ТРИПСИНА ИЗМЕНЯЮТ ГЕМОДИНАМИКУ И БИОХИМИЮ КРОВИ У КРОЛИКОВ

Вертипрахов Владимир Георгиевич, д.б.н., зав. кафедрой, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Галыга Семен Дмитриевич, аспирант, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Полина Светлана Игоревна, аспирант, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева.

Аннотация. Эксперимент по изучению влияния на организм кроликов отечественного препарата трипсин кристаллический в дозе 0,3 мг/кг живой массы и разработанного в нашей лаборатории лиофилизата из ткани поджелудочной железы свиней в дозе 3,0 мг/кг живой массы показал, что препараты по-разному действуют на организм кроликов, но обладают биологической активностью, которую следует в дальнейшем изучать.

Ключевые слова: кролики, трипсин, лиофилизат, давление крови, биохимия крови.

Проблема поиска препаратов, альтернативных антибиотикам, сегодня чрезвычайно актуальна. Практически до 2006 года, когда Евросоюз отказался от использования антибиотиков в животноводстве из-за риска появления устойчивых штаммов бактерий в пищевых продуктах животного происхождения, они занимали прочные позиции в качестве добавок в корма [1]. Для того чтобы найти эффективную замену кормовым антибиотикам, необходи-