НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

ЗАСТОСУВАННЯ НЕЦИКЛІЧНОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ГЕМОРАГІЧНОЇ ХВОРОБИ КРОЛІВ

Київ – 2024

УДК 619:636.3:616.98:578.82/83:577.2
DOI: 10.31073/vet_biotech.meth2025.03

Методичні рекомендації розглянуто Методичною комісією ІВМ НААН (протокол № 2 від 07.11.2024 р.) та затверджено Вченою радою ІВМ НААН (протокол № 11 від 07.11.2024 р.).

Укладачі: **Криця Я. П.**, кандидат ветеринарних наук;
Меженський А. А., аспірант;
Тарасов О. А., кандидат ветеринарних наук;
Меженська Н. А., кандидат ветеринарних наук;
Сидоренко Т. В.;
Меженський А. О., доктор ветеринарних наук.

Рецензенти: **Радзиховський М. Л.**, доктор ветеринарних наук, професор кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології Національного університету біоресурсів і природокористування України;

Жовнір О. М., кандидат ветеринарних наук, завідувач лабораторії анаеробних інфекцій Інституту ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України.

Застосування нециклічної ампліфікації нуклеїнових кислот для діагностики геморагічної хвороби кролів : методичні рекомендації / Я. П. Криця, А. А. Меженський, О. А. Тарасов та ін. Київ : ІВМ НААН, 2024. 17 с. DOI: https://doi.org/10.31073/vet_biotech.meth2025.03

У методичних рекомендаціях наведено дані щодо застосування методики нециклічної ампліфікації нуклеїнових кислот методом RT-LAMP для детекції специфічних фрагментів РНК вірусу геморагічної хвороби кролів в патологічному та/або біологічному матеріалі.

Рекомендації призначені для фахівців діагностичних лабораторій ветеринарної медицини, науковців, слухачів факультетів післядипломного навчання, викладачів та студентів закладів вищої освіти, наукових установ, які здійснюють підготовку здобувачів вищої освіти зі спеціальності Н6 (211) Ветеринарна медицина.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, СИМВОЛІВ

ВКЗ	– внутрішній контрольний зразок
ГХК	– геморагічна хвороба кролів
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
EBHSV	– вірус синдрому європейського зайця
EDTA	– етилендиамінтетраоцтова кислота
ЗТ-ПЛР	– зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція
кДНК	– комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота
мкл	– мікролітр
НКЗ	– негативний контрольний зразок
ПКЗ	– позитивний контрольний зразок
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
ПЛР-РЧ	– полімеразна ланцюгова реакція у режимі реального часу
РНК	– рибонуклеїнова кислота
LAMP	– петльова ізотермічна ампліфікація ДНК/РНК
RT-LAMP	– петльова ізотермічна ампліфікація ДНК/РНК зі зворотною транскрипцією
RHDV	– вірус геморагічної хвороби кролів
с	– секунда
см	– сантиметр
тис. об./хв.	– тисяч обертів за хвилину
хв	– хвилина
°С	– градус Цельсія

ВСТУП

Однією з найбільш загрозливих інфекційних хвороб, яка є дуже заразною і смертельною для диких та домашніх кролів є ГХК, збудником якої є дрібний круглий РНК-вмісний каліцивірус без оболонки (рід *Lagovirus*, сімейство *Caliciviriade*), що містить лише один основний капсидний білок VP60 [1-3].

Вид *Lagovirus europaeus* поділяється на дві геногрупи, до яких, відповідно, відноситься RHDV та EBHSV. Геногрупи підрозділяються на генотипи, які розділені на філогенетичні варіанти. EBHSV має один генотип та три варіанти. RHDV має два генотипи. Перший генотип або «класичний» RHDV (вперше виявлений у 1984 році в Китаї) має чотири варіанти, а другий генотип або «новий» RHDV2 (виявлений у 2010 році у Франції) не має генетичних та антигенних варіантів. В даний час у багатьох країнах RHDV2 замінює «класичний» RHDV. ГХК вважають ендемічною у більшості частин світу (Європа, Північна Африка, Австралія, Нова Зеландія) [1, 6, 7].

Профілактика ГХК включає суворе дотримання вимог біозахисту, санітарно-гігієнічні та карантинні заходи, щеплення тварин, проведення лабораторного моніторингу ГХК серед домашніх кролів та в диких популяціях з метою визначення генотипу вірусу що циркулює в регіоні або в країні [1, 5, 6].

За вимогами Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин рекомендованим методом лабораторної діагностики ГХК є метод ПЛР-РЧ [1, 6, 7]. На сьогодні в Україні відсутні вітчизняні засоби лабораторної діагностики ГХК рекомендованим методом [12]. Такі діагностичні засоби можна закупити лише за кордоном, але вони є дороговартісними та в сьогоднішніх реаліях не можуть бути швидко доставлені в Україну. До того ж, закордонні виробники пропонують окремі тест-системи ПЛР-РЧ для діагностики ГХК викликаної різними підтипами збудника. Враховуючи, що в Україні, як і в усьому світі у кролівничих господарствах одночасно циркулюють обидва підтипи вірусу ГХК, діагностичні лабораторії потребують засоби діагностики які дозволять швидко встановити діагноз та одночасно диференціювати підтип збудника хвороби.

Розроблений в лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН (далі – ІВМ НААН) діагностичний набір для молекулярно-генетичної індикації РНК вірусу ГХК на основі полімеразної ланцюгової реакції зворотної транскрипції в режимі реального часу з можливістю диференціації вірусів першого та другого підтипів (ГХК дуо ЗТ-ПЛР-РЧ) показав свою високу ефективність, у т.ч. на ранніх етапах інфікування кролів. Проте, незважаючи на усі переваги ЗТ-ПЛР-РЧ у неї є ряд недоліків: дуже висока вартість необхідного лабораторного обладнання та витратних матеріалів, що обмежує використання методу у невеликих діагностичних установах; високі вимоги до кваліфікації персоналу, що проводить дослідження; процедура дослідження

займає декілька годин без врахування часу на доставку біоматеріалу до лабораторії.

Враховуючи вище наведене, існує нагальна необхідність у розробці вітчизняної діагностичної тест-системи для виявлення РНК вірусів ГХК (GI.1) та другого типів (GI.2) реакцією RT-LAMP. Ця реакція відноситься до методів молекулярної діагностики, але не потребує спеціального лабораторного обладнання і реактивів, а також значно дешевша та швидша за ЗТ-ПЛР-РЧ.

Авторами методичних рекомендацій здійснено дизайн набору праймерів для діагностики геморагічної хвороби кролів методом ізотермічної петльової ампліфікації нуклеїнових кислот зі зворотною транскрипцією (RT-LAMP), проведено оптимізацію складу реакційної суміші для діагностики геморагічної хвороби кролів методом RT-LAMP. На цьому підґрунті розроблена вітчизняна тест-система та валідована за міжнародними вимогами методика проведення RT-LAMP для детекції РНК вірусу ГХК у патологічному та/або біологічному матеріалі з метою її використання в лабораторній діагностиці.

1. Петльова ізотермічна ампліфікація (LAMP). Принцип методу.

Запропонована методика призначена для виявлення РНК вірусу ГХК в біологічному та/або патологічному матеріалі методом RT-LAMP.

Петльова ізотермічна ампліфікація (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) – це метод ампліфікації ДНК в одній пробірці [2]. LAMP дозволяє проводити молекулярну діагностику істотно швидше і дешевше порівняно з ПЛР. Для детекції РНК-вірусів LAMP можна поєднувати з етапом зворотної транскрипції.

LAMP – ізотермічний метод ампліфікації нуклеїнових кислот. На відміну від ПЛР він не вимагає постійної зміни температурних циклів, реакція протікає при постійній температурі, що забезпечує високу ефективність ампліфікації (ДНК ампліфікується 10^9-10^{10} разів за 15-60 хвилин) [3, 4]. Незмінна температура також дозволяє уникнути необхідності використання ампліфікаторів.

Петльова ізотермічна ампліфікація характеризується використанням двох (або трьох) пар праймерів, спеціально розроблених для розпізнавання шести (або восьми) різних цільових послідовностей. Реакція ампліфікації протікає при постійній температурі 60-65 ^{o}C. Ампліфікацію проводять в один етап шляхом інкубації суміші ДНК, праймерів, нуклеотидів та ДНК-полімерази, що здатна витісняти ланцюг ДНК, при постійній температурі. Усе це забезпечує високу специфічність та ефективність ампліфікації (ДНК ампліфікується 10^9-10^{10} разів за 15-60 хвилин).

Як правило, використовують 4 різних праймери, які розпізнають 6 нуклеотидних послідовностей на цільовому гені. Додаткова пара «петельних праймерів» може ще більше прискорити реакцію [5]. Кількість ДНК, що утворюється в LAMP, значно перевищує ампліфікацію на основі ПЛР.

Продукт ампліфікації виявляють за допомогою гель-електрофорезу, фотометрії або вимірюючи помутніння розчину, спричинене накопиченням осаду пірофосфату магнію [5, 6, 7]. Останні дві методики дозволяють легко візуалізувати продукт ампліфікації неозброєним оком або за допомогою простих фотометричних підходів. В результаті реакції відбувається експоненціальне накопичення продукту ампліфікації і пірофосфату. Оскільки до складу реакційної суміші входить сульфат магнію, утворюється нерозчинний пірофосфат магнію, що дозволяє візуалізувати результати за появою білого осаду.

Іншим методом детекції результатів ампліфікації по супутній зміні концентрації магнію є використання метал-чутливих індикаторів, які змінюють колір від темно-жовтого до жовтого (кальцеїн), від темно-синього до синього (гідроксинафтол синій) або від темно-синього до світло-синього (малахітовий зелений). У випадку використання кальцеїну до початку реакції молекули індикатора зв’язані з манганом, внаслідок чого відбувається гасіння флюоресценції [8]. Після початку ампліфікації манган зв’язується з новоутвореним пірофосфатом і кальцеїн починає флуоресціювати.

Зв'язування кальцеїну з магнієм підвищує флуоресцентний сигнал. Реакцію також можна прослідкувати в режимі реального часу шляхом вимірювання помутніння [9] або реєстрації флуоресценції, застосовуючи інтеркалюючі барвники, такі як SYBR Green, бромистий етидій, picogreen, пропідіум йодид та ін. Молекули барвника інтеркалюють або безпосередньо мітять ДНК і можуть бути співвіднесені з кількістю копій, наявних у початковій суміші. Отже, LAMP також може бути кількісним методом.

2. Сфера застосування методичних рекомендацій

Методичні рекомендації призначені для лабораторної діагностики ГХК методом RT-LAMP.

3. Відбір патологічного та/або біологічного матеріалу і його підготовка для дослідження

Організацію, відбір, методи консервування і терміни доставки патологічного та/або біологічного матеріалу в лабораторію для дослідження з метою діагностики ГХК необхідно здійснювати відповідно до чинних в Україні норм і правил [12].

Відбір матеріалу. Особливу увагу при відборі патологічного та/або біологічного матеріалу слід приділяти не допущенню забруднення навколишнього середовища, відповідно до вимог чинних правил та інструкцій [12]. Матеріал від кожної тварини відбирають окремими інструментами і поміщають в окремий пластиковий або скляний стерильний посуд (флакони, пробірки, пакети).

Від кролів для лабораторної діагностики ГХК відбирають: прижиттєво – фекалії і змиви з прямої кишки, носу, ротової порожнини, кров; від загиблих або вимушено забитих тварин – шматочки печінки та селезінки. Кров стабілізують EDTA або цитратом натрію, або з неї отримують сироватку. Відібраний матеріал доставляють у лабораторію в день відбору або на наступний день, зберігаючи за температури від +2 до +8 °С у термоконтейнері або у термосі з льодом. У разі тривалого транспортування обов'язково використовують охолоджуючи елементи. Допускається зберігання матеріалу за температури не вище -16 °С протягом не більше 7 діб. Можливе лише одноразове розмороження матеріалу. Кров заморожувати заборонено.

Об'єм матеріалу який необхідно відбирати для дослідження. Патологічний матеріал з паренхіматозних органів (у першу чергу з печінки та/або селезінки) повинен бути відібраний шматочками розміром приблизно 1×1×1 см (за неможливості товщина шматочків може бути меншою). Кров або іншій рідкий матеріал відбирають в об'ємі 1 $см^3$.

Підготовка матеріалу для дослідження. Зразки матеріалу з паренхіматозних органів гомогенізують з використанням гомогенізатору, стерильних порцелянових ступок або інших засобів та готують 10 %-ну суспензію на стерильному розчині NaCl (0,85 %). Суспензію переносять у

пробірку об’ємом 1,5 $см^3$ та центрифугують 2 хв за 12 тис. об./хв. Після цього відбирають надосадову рідину (верхню фазу), яку переносять у пробірки типу Eppendorf в об’ємі 100 мкл і використовують для виділення РНК.

З фекалій, оральних, назальних та ректальних змивів готують 10–20 %-ну суспензію на стерильному розчині NaCl (0,85 %) яку центрифугують 2 хв за 10–12 тис. об./хв. Екстракцію РНК проводять з надосадової рідини, яку переносять у пробірки типу Eppendorf в об’ємі 100 мкл.

Кров використовують після центрифугування протягом 10 секунд в об’ємі 100 мкл.

Допускається зберігання зразків за температури не вище -16 °С з одноразовим розморожуванням. Кров заморожувати заборонено.

4. Обладнання, матеріали та реактиви

Діагностичні дослідження з використанням методу RT-LAMP проводять у три етапи в окремих приміщеннях (зонах), які повинні бути оснащені необхідними матеріалами та обладнанням.

4.1. Обладнання та матеріали

Зона 1. Для підготовки зразків досліджуваного матеріалу:

- високошвидкісна центрифуга (13 тис. або більше об/хв.) з охолодженням;
- шафа біологічної безпеки 2 клас (наприклад, ESCO);
- вортекс-центрифуга для пробірок об’ємом 1,5-2 мл;
- холодильник побутовий з холодильною камерою (+2 – +8 °С) та морозильною камерою (-16 – -20 °С);
- гомогенізатор;
- ваги лабораторні (наприклад електронні AXIS A500);
- опромінювач бактерицидний (наприклад ОБН-150М);
- окремий набір дозаторів піпеткових з регульованим об'ємом дози (наприклад Eppendorf Research plus);
- одноразові наконечники об’ємом 100 мкл і 1000 мкл з аерозольним бар’єром (наприклад Axygen, Eppendorf або Labcon);
- одноразові пробірки об’ємом 1,5 $см^3$ (наприклад Eppendorf);
- штативи для мікропробірок та наконечників (наприклад Axygen);
- окремий халат та одноразові гумові рукавички;
- контейнер для збору та інактивації патологічного матеріалу;
- контейнер для збору використаних наконечників;
- серветки безворсові;
- дезінфекційні розчини (70,0 % етиловий спирт, 10,0 % розчин хлорного вапна, 5,0 % розчин хлораміну або 0,5 % розчин віросану).

Зона 2. Для екстракції РНК/ДНК з досліджуваного матеріалу:

- ламінарний бокс 2-го класу біологічної безпеки (наприклад, ESCO);

- твердотільний термостат-струшувач (із змінною температурою та частотою струшування) для пробірок об'ємом 1,5–2 мл, температурний діапазон 25–99 °С;

- високошвидкісна центрифуга (13 тис. або більше об/хв.) з охолодженням для пробірок об'ємом 1,5–2 мл,

- вортекс-центрифуга (наприклад, FVL – 2400N);

- опромінювач бактерицидний (наприклад ОБН – 150М);

- холодильник побутовий з холодильною камерою (+2 – +8 °С) та морозильною камерою (-16 – -20 °С);

- окремий набір дозаторів піпеткових з регульованим об'ємом дози (наприклад, Eppendorf Research plus);

- одноразові наконечники об’ємом 100 і 1000 мкл з аерозольним бар’єром (наприклад, Axygen, Eppendorf або Labcon);

- одноразові пробірки об’ємом 1,5 $см^3$ (наприклад, Eppendorf);

- штативи для мікропробірок та наконечників (наприклад, Axygen);

- окремий халат та одноразові гумові рукавички;

- контейнер для збору та інактивації патологічного матеріалу;

- контейнер для збору використаних наконечників;

- серветки безворсові;

- дезінфекційні розчини для обробки використаних матеріалів (10,0 % розчин хлорного вапна, 5,0 % розчин хлораміну або 0,5 % розчин віросану) та обробки робочого місця (засіб для видалення ДНК/РНК Ultra Clean Lab Cleaner або аналогічний).

Зона 3. Для проведення ампліфікації РНК/ДНК:

- прилад для проведення ПЛР-РЧ (ампліфікатор), наприклад, «Rotor-Gene 6000» виробництва «QIAGEN Hilden» (Німеччина) або аналогічний; або недорогий термоблок, термостат або водяна баня з підтримкою температури 65 ^oC;

- комп’ютер з програмним забезпеченням до ампліфікатора;

- джерело безперебійного живлення (наприклад, BNT-1000AP);

- ПЛР-бокс (наприклад, ESCO);

- окремий набір дозаторів піпеткових з регульованим об'ємом дози (0,5–10 мкл; 2–20 мкл, 10–100 мкл; 20–200 мкл; 100–1000 мкл) (наприклад Eppendorf Research plus);

- одноразові наконечники для дозаторів піпеткових з регульованим об'ємом дози з аерозольним бар’єром.

- одноразові пробірки для ПЛР об’ємом 0,2 та 0,5 $см^3$ (наприклад, Axygen);

- штативи для наконечників (наприклад, Axygen) і мікропробірок;

- окремий халат і одноразові рукавички;

- контейнер для збору використаних наконечників;

- дезінфекційні розчини для обробки використаних матеріалів (10,0 % розчин хлорного вапна, 5,0 % розчин хлораміну, 0,5 % розчин віросану

тощо) та обробки робочого місця (засіб для видалення ДНК/РНК Ultra Clean Lab Cleaner або аналогічний).

4.2. Реактиви

Для виділення РНК використовують доступні в лабораторії комерційні набори (комплекти) для виділення РНК, наприклад, IndiSpin Pathogen Kit, INDICAL Bioscience; RNeasy Mini Kit, Qiagen; «PowerLyzer® UltraClean® Tissue RNA Isolation Kit», MoBio; Patho Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit, iNtRON Biotechnology або інші комерційні набори призначені для виділення вірусної РНК з тканин тварин.

Контрольні зразки:

1) позитивний контрольний зразок;

2) негативний контрольний зразок.

Для дослідження використовуються праймери, розраховані на найбільш консервативний фрагмент гена VP60, номер GenBank KY498543.1, (структурний капсидний протеїн), які фланкують фрагмент в межах 1200 – 1740 bp.

Кожен набір праймерів складається з двох внутрішніх праймерів (FIP та BIP), двох зовнішніх праймерів (F3 і B3) та двох петльових праймерів (LF та LB). FIP складався з ділянки F2 на 3′ кінці та ділянки F1c на 5′ кінці. Аналогічно, BIP складався з ділянки B2 на 3′ кінці та B1c на 5′ кінці. Праймери LF і LB складаються з послідовностей між F1-F2 та B1-B2, відповідно. Розмір фрагменту – 210 нп. Нуклеотидні послідовності праймерів LAMP наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Послідовності праймерів для виявлення цільових фрагментів вірусу геморагічної хвороби кролів

Назва праймера	Послідовність 5′-3′
F3	TCTCAATGCCCGGTGGTAT
B3	ATGGTCAGTTGCAGACGC
FIP	TCAAATGTACGCTGGCTGGGCCCCACCGAAGACACCTGA
BIP	AGAACAGCTGTGAACGGGTTGTCCCGGGCAACATCCTGTA
LF	TGGCATGCAATTCCGGTTTATAGT
LB	TTTGTGGCGAGTGTTGGACA

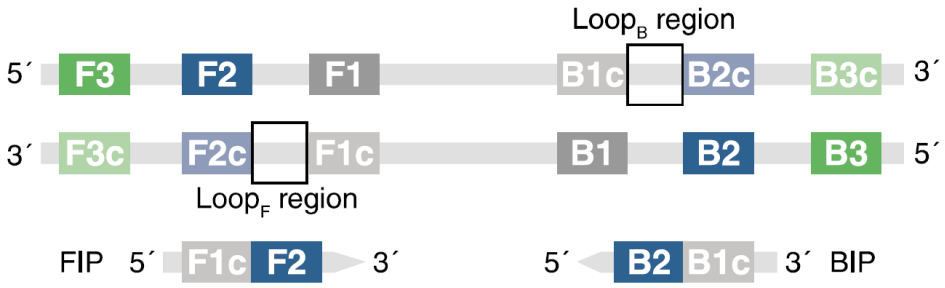

Рис. 1 Схематичне розташування праймерів для проведення реакції.

Оптимальні концентрації праймерів для проведення реакції – 1,6 мкМ для FIP і BIP, 0,8 мкМ для LF і LB та 0,2 мкМ для F3 і B3, оптимальним режимом проведення реакції визначено 64 °С протягом 60 хвилин.

5. Етапи RT-LAMP

5.1. Екстракція РНК з досліджуваного матеріалу

Для виділення РНК зі зразків патологічного та/або біологічного матеріалу використовують комерційно доступні набори, які передбачають виділення РНК згідно інструкції виробника.

Метою даного етапу є виділення РНК з клітин та очищенні її від білків, жирів, вуглеводів та дезактивації клітинних ферментів. Процес виділення РНК складається з наступних етапів:

- лізування (під час даного етапу відбувається руйнування мембран клітин і ядер, вихід РНК в розчин, звільнення її від білків та дезактивація клітинних ферментів);
- адсорбція НК (зв’язування РНК з адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок, на поверхні магнітних частинок (в залежності від набору, який використовується для виділення НК));
- відмивання (РНК від білків, жирів, вуглеводів і залишків клітинних мембран);
- елюція (відокремлення РНК від адсорбуючої речовини і перехід РНК в розчин).

Під час виділення РНК обов’язковим є використання негативного контролю виділення (НКВ) (використовується для виявлення контамінації досліджуваних зразків між собою), що являє собою деіонізовану воду вільну від РНКаз та ДНКаз.

Враховуючи молекулярну нестабільність РНК, з нею необхідно поводитись обережно. Виділену РНК зберігають при температурі від 2 до 8 °С до 4 годин, при температурі не вище -16 °С протягом місяця, і більш тривало при температурі не вище мінус 68 °С, слід мінімізувати кількість циклів замороження-розмороження.

5.2. Отримання кДНК на матриці РНК (опціонально)

У разі, коли необхідно отримати кДНК для тривалого зберігання в якості позитивного контролю, можливо проведення реакції ЗТ-ПЛР відразу після отримання РНК-проби. Для проведення реакції використовують комерційні суміші, наприклад Luna Scriptmix (New England Biolab).

5.3. Підготовка реакційної суміші та проведення ампліфікації

5.3.1. Підрахувати необхідну кількість реакцій з урахуванням кількості досліджуваних зразків і контролів та підготувати для них пробірки.

5.3.2. Розморозити всі компоненти набору, змішати шляхом вортексування і центрифугувати протягом 5 с для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

5.3.3. Приготувати реакційну суміш (на попередньо підраховану кількість реакцій з врахуванням додаткових 10 % від загального об'єму, необхідних для компенсації втрати реагентів під час приготування реакційної суміші) згідно таблиці 2.

Таблиця 2

Склад та кількість компонентів з розрахунку на 1 реакцію

Компонент	**Кількість на одну реакцію, мкл**
Буфер для LAMP (10X) (20 мМ трис HCl, 50 мМ KCl, 8 мМ KCl, 8 мМ MgSO4, 10 мМ (NH4)2SO4, 0,1% Tween 20)	2,5
Барвник SYTO16*	1,0
Bst 3.0 ДНК-полімераза (8 U/мкл)	1,0
Зворотня транскриптаза	0,5
dNTPs (10 мМ кожного)	1,4
F3 (0,2 мкМ)	1,5
Бетаїн 10 мМ	3,0
B3 (0,2 мкМ)	1,5
FIP (1,6 мкМ)	0,5
BIP (1,6 мкМ)	0,5
LF (0,8 мкМ)	1
LB (0,8 мкМ)	1
Виділена ДНК	5,0
Дистильована вода для молекулярно-генетичних досліджень	До 25,0
Загальний об'єм	**25,0**

Змішати реакційну суміш на вортексі і центрифугувати протягом 2 с для осадження крапель реактивів з кришок пробірок.

5.3.4. В кожну підготовлену пробірку/лунку плашки внести по 20 мкл реакційної суміші.

5.3.5. Внести по 5 мкл РНК дослідних зразків у відповідні пробірки.

5.3.6. Внести 5 мкл RNase-Free Water (негативний контроль) у відповідну пробірку.

5.3.7. Внести 5 мкл позитивного контролю у відповідну пробірку.

5.3.8. Помістити пробірки із зразками в ампліфікатор.

5.3.9. Запустити програмне забезпечення ампліфікатора і встановити наступні параметри ампліфікації:

Таблиця 3

Умови проведення RT-LAMP

Етап	**Режим (час, температура)**
Проведення RT-LAMP	60 хв, 64 °С

5.4. Облік та інтерпретація результатів RT-LAMP

Кінцева точка виявлення ампліфікації в LAMP-реакціях, визначалась за допомогою барвника SYTO16. Під видимим світлом колір в LAMP-позитивних реакціях змінювався на жовтувато-зелений, а в ультрафіолетовому світлі проявляв флуоресценцію. У LAMP-негативних реакціях колір барвника залишався незмінним і барвник не флуоресціював в УФ-світлі.

6. Заходи безпеки при постановці RT-LAMP

Для роботи з РНК/ДНК використовують тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, що мають спеціальне маркування «RNase-free» або «DNase-free». Працюють тільки в одноразових рукавичках. Всі маніпуляції, пов'язані з підготовкою проб, проводяться дозаторами змінних об’ємів із використанням одноразових поліпропіленових пробірок і наконечників з аерозольним бар’єром. Використаний одноразовий пластиковий посуд (пробірки, наконечники) слід складати у спеціальний контейнер, що містить один із розчинів: 10 % розчин хлорного вапна, 5 % розчин хлораміну Б або 0,5 % розчин віросану. Після тригодинної витримки розчин виливають у каналізацію, а відпрацьований пластик автоклавують за тиску в 1 атмосферу протягом 30 хв і переміщують в контейнер для сміття.

Лабораторне устаткування (дозатори, лабораторний посуд тощо, а також робочі розчини) повинні бути суворо стаціонарними. **ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ** їхнє переміщення з однієї кімнати в іншу.

Рекомендується опромінювати приміщення ультрафіолетовим світлом упродовж 1 години до початку та після закінчення робіт.

7. Способи знешкодження та утилізації біологічного та/або патологічного матеріалу

З біологічним матеріалом завжди треба поводитись, як із потенційно небезпечним. Використані матеріали і відходи перед утилізацією слід знезаражувати за допомогою сильного окиснювача. Невикористані флакони з позитивними, негативними та досліджуваними матеріалами перед утилізацією інактивують автоклавуванням за температури +130 °С та тиску 2 кг/см^3 протягом 45 хв. Всі тверді відходи після проведення RT-LAMP слід збирати в спеціальний контейнер і автоклавувати протягом 1 години за температури +120 °С.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Steven D. Lukefahr, James I. McNitt, Peter R. Cheeke and Nephi M. Patton. (2022). *Rabbit production 10th Edition*. CABI. 153–156.

2. Notomi, T. (15 червня 2010). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. Т. 28, № 12. с. 63e — 63. doi:10.1093/nar/28.12.e63.

3. Zhao, Yongxi; Chen, Feng; Li, Qian; Wang, Lihua; Fan, Chunhai (25 листопада 2015). Isothermal Amplification of Nucleic Acids. *Chemical Reviews*. Т. 115, № 22. с. 12491—12545. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00428.

4. Nagamine, K.; Hase, T.; Notomi, T. (2002-06). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. Т. 16, № 3. с. 223—229. doi:10.1006/mcpr.2002.0415.

5. Zhang, Xuzhi; Lowe, Stuart B.; Gooding, John Justin (15 листопада 2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*. Т. 61. с. 491—499. doi:10.1016/j.bios.2014.05.039.

6. Notomi, Tsugunori; Mori, Yasuyoshi; Tomita, Norihiro; Kanda, Hidetoshi (2015-01). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*. Т. 53, № 1. с. 1—5. doi:10.1007/s12275-015-4656-9.

7. Lavazza, A. and L. Capucci. (2008). Viral Infection of Rabbits. *Pathology and Hygiene Section, 9th World Rabbit Congress*, Verona, Italy, 879–889.

8. Hall, R.N., J.E. Mahar, S. Haboury, V. Stevens, E.C. Holmes, and T. Strive. (2015). Emerging rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDVb), Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 21(12): 2276–2278. doi:10.3201/ eid2112.151210

9. Напненко О.О., Гордієнко О.І., Дерябін О.М., Мандзя І.М., Іванченко П.О. (2020). Діагностика вірусної геморагічної хвороби кролів методом полімеразної ланцюгової реакції. Ефективне кролівництво і звірівництво. Черкаси: Черкаська дослідна станція біоресурсів НААН, 6, № 5, 155–164

10. Duarte M.D., Carvalho C.L., Barros S.C., Henriques A.M., Ramos F., Fagulha T., Luís T., Duarte E.L. & Fevereiro M. (2015). A real time Taqman RT-PCR for the detection of rabbit hemorrhagic disease virus 2 (RHDV2). *J. Virol. Methods*, 219, 90–95.

11. Gall A., Hoffmann B., Teifke J.P., Lange B. & Schirrmeier H. (2007). Persistence of viral RNA in rabbits which overcome an experimental RHDV infection detected by a highly sensitive multiplex real-time RT-PCR. *Vet. Microbiol*., 120, 17–32.

12. Піщанський О.В., Гаркавенко Т.О., Меженський А.О. та ін. (2019). Методичні рекомендації з організації та відбору проб для діагностичних досліджень на заразні хвороби тварин та птиці. Київ: ДНДІЛДВСЕ. 123 с.

КРИЦЯ Яна Петрівна
кандидат ветеринарних наук, доцент, завідувач лабораторією «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН
МЕЖЕНСЬКИЙ Андрій Андрійович
аспірант лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН
ТАРАСОВ Олександр Анатолійович
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторією зоонозних інфекцій та оцінки ризиків ІВМ НААН
МЕЖЕНСЬКА Наталія Анатоліївна
кандидат ветеринарних наук, доцент, старший науковий співробітник лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН
СИДОРЕНКО Тетяна Володимирівна
головний фахівець лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» ІВМ НААН
МЕЖЕНСЬКИЙ Андрій Олександрович
доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник, доцент, заступник директора з наукової та міжнародної роботи ІВМ НААН

ЗАСТОСУВАННЯ НЕЦИКЛІЧНОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ГЕМОРАГІЧНОЇ ХВОРОБИ КРОЛІВ: МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

В авторській редакції

Підписано до друку 09.09.25 Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 1,0
Наклад 100 прим. Зам. № 250571

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041
тел.: 527-81-55