НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ З ВИЯВЛЕННЯ ЗБУДНИКА СИБІРКИ МЕТОДОМ ІЗОТЕРМІЧНОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ (LAMP)

Київ – 2024

УДК: 619:579.62(07):637
DOI: 10.31073/vet_biotech.meth2025.06

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: **Тарасов О. А.**, кандидат ветеринарних наук;
Гудзь Н. В., кандидат ветеринарних наук;
Безименний М. В., аспірант.

Рецензенти: **Ситюк М. П.,** доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник; завідувач лабораторії вірусних хвороб тварин Інституту ветеринарної медицини НААН

Уховський В. В., доктор ветеринарних наук, професор, завідувач відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

Методичні рекомендації з виявлення збудника сибірки методом ізотермічної ампліфікації (LAMP) / О. А. Тарасов, Н. В. Гудзь, М. В. Безименний. Київ : ІВМ НААН, 2024. 24 с. DOI: https://doi.org/10.31073/vet_biotech.meth2025.06

У методичних рекомендаціях наведено дані щодо застосування методики ізотермічної петлевої ампліфікації для детекції ДНК збудника сибірки в різних субстратах.

Рекомендації призначені для фахівців діагностичних лабораторій ветеринарної медицини, співробітників науково-дослідних установ ветеринарної медицини, слухачів факультетів післядипломного навчання, викладачів, аспірантів та студентів закладів вищої освіти зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, СИМВОЛІВ

ВКЗ	– внутрішній контрольний зразок
LAMP	– петлева ізотермічна ампліфікація
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
EDTA	– етилендиамінтетраоцтова кислота
ПЛР	–полімеразна ланцюгова реакція
ДНК	–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
КУО	– колонієутворююча одиниця
ГЕ	– геном-еквівалент, кількість копій геному в реакції
см	– сантиметр
тис. об./хв.	– тисяч обертів за хвилину
хв	– хвилина
°С	– градус Цельсія

ВСТУП

Сибірка є однією з найпоширеніших інфекційних хвороб в світі, яка реєструється на всіх континентах [1 - 3]. За опублікованими даними [4], найчастіше спалахи сибірки в Україні реєстрували переважно серед великої рогатої худоби та дрібної рогатої худоби, значно менше у інших видів тварин.

У відповідності до офіційних даних, на території України за період з 1920 по 1970 рр., найбільша їх кількість неблагополучних пунктів щодо сибірки припадає на Вінницьку (396), Харківську (338), Чернігівську (336), Тернопільську (332), Луганську (275), Полтавську (274), Кіровоградську (267) області [4].

На кінець 2022 року, за офіційними даними на території України було зареєстровано більше 13 тис неблагополучних стосовно сибірки населених пунктів.

В генетичному відношенні *B. anthracis* є одним з найбільш мономорфних мікроорганізмів, що пов'язано зі здатністю до спороутворення. Різниця між його штамами обумовлена головним чином до наявності або відсутності плазмід, а також варіабельними ділянками геному (VNTR регіон) [7 - 8].

До сьогоднішнього дня основними методами в діагностиці сибірки залишаються традиційні мікробіологічні дослідження (мікроскопія мазків, бактеріологічні дослідження з метою виділення чистої культури і ідентифікація виділеної культури, біопроба на лабораторних тваринах, серологічні дослідження). Головними недоліками традиційних лабораторних методів діагностики *B. anthracis* є довготривалість, трудомісткість, складність детекції атипових форм бактерій та необхідність в культивуванні збудника, що може впливати на ризики розповсюдження патогенних ізолятів збудника [9-10].

На сьогодні найбільш надійними тестами ідентифікації *B. anthracis* є визначення чутливості до γ-фагу, реакція нейтралізації, а також, виявлення наявності генів токсину та капсули методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). В даний час розробляються варіанти молекулярної діагностики, в першу чергу різні варіанти полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та ізотермічної ампліфікації (LAMP) та методи візуалізації результатів. Дослідження були спрямовані на підбір ефективних комбінацій олігонуклеотидних праймерів, які ідентифікують ділянки специфічних генів, які локалізовані на хромосомі та плазмідах pXO1 і pXO2 [11-16].

Перевагою запропонованого методу є висока специфічність, безпечність, можливість виявлення фрагментів ДНК плазмід pXO1 (ген протективного антигена) і pXO2 (ген капсули) та можливість додаткової диференціації за хромосомним маркером капсуловмісного штаму Ценковського-2 *B. anthracis* від інших вакцинних штамів, що використовуються в Україні.

Авторами методичних рекомендацій проаналізовано послідовності геному збудника сибірки, доступні в GeneBank (NCBI) із використанням повногеномних сіквенсів а саме: BA5345 послідовність з хромосоми (номер

GenBank № NC003997.3), послідовність гену *lef* плазміди pXO1 (GenBank № M30210.1) та послідовність *capB* плазміди pXO2 (GenBank № M24150.1) здійснено дизайн та оптимізацію наборів праймерів для виявлення специфічних фрагментів геному збудника.

Авторами рекомендовано три окремих набора праймерів для проведення LAMP, спрямованих на визначення хромосомного маркера, специфічного для B. anthracis (BA5345) та двох плазмідних маркерів, а саме: lef (pXO1) та capB (pXO2), що дозволяє максимально точно ідентифікувати збудника та наявність обох плазмід.

Праймери були розроблені для трьох мішеней, а саме: BA5345 послідовність з хромосоми (номер GenBank № NC003997.3), послідовність lef з плазміди pXO1 (GenBank № M30210.1) та послідовність capB плазміди pXO2 (GenBank № M24150.1) за допомогою програми Primer Explorer V5 (https:// prime rexpl orer.jp/e/).

Кожен набір праймерів складався 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 складалися з послідовностей між F1-F2 та B1-B2, відповідно.

На цьому підґрунті розроблені методичні рекомендації для швидкого виявлення збудника сибірки в лабораторних та польових умовах.

1. Ізотермічна петлева ампліфікація (LAMP).

Принцип методу

Запропонована методика призначена для виявлення ДНК *B.anthracis* в біологічному та/або патологічному матеріалі методом LAMP.

В основу методу покладено виділення із досліджуваного зразка ДНК збудника, проведення реакції ампліфікації специфічної ділянки ДНК з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів за допомогою ферменту BSt-полімерази та детекція продуктів в режимі реального часу з використанням приладу для проведення ПЛР-РЧ, наприклад «Rotor-Gene 6000» виробництва «QIAGEN Hilden» (Німеччина) або аналогічного. Метод дозволяє проводити оцінку візуально за зміною кольору барвника після завершення реакції.

Метод LAMP (петлева ізотермічна ампліфікація) є методом ампліфікації ДНК, що працює при постійному температурному режимі (звичайно 55°C–65°C). Принцип базується на використанні двох або більше пар праймерів, що розпізнають шість специфічних ділянок на цільовій ДНК, і спеціальної ДНК-полімерази.

Ключові етапи:

- ДНК-полімераза одночасно синтезує нові ланцюги і витісняє вже синтезовані ділянки.
- Формуються петлеподібні структури, що прискорюють подальшу ампліфікацію.
- Реакція відбувається без необхідності циклічної зміни температур, що дозволяє проводити аналіз у простих умовах. Оцінку реакції проводять як на ампліфікаторі із використанням інтеркалюючих барвників, так і візуально із використанням розчинів барвників (в цих методичних рекомендаціях використовується розчин фенолового червоного).

LAMP є швидким, чутливим і специфічним методом для виявлення патогенів, часто використовується у польових умовах або при діагностиці інфекційних хвороб, включаючи сибірку.

2. Сфера застосування методичних рекомендацій

Методичні рекомендації призначені для виявлення ДНК *B.anthracis* методом LAMP в лабораторних та польових умовах. Реакція може застосовуватись лабораторіями всіх форм підпорядкування, науково-дослідними установами, лабораторіями біологічних підприємств для контролю якості вакцинних штамів.

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 молекулярно-генетичними методами необхідно здійснювати відповідно до чинних в Україні норм і правил [17].

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 [17]. Матеріал від кожної тварини відбирають окремими інструментами і поміщають в окремий пластиковий або скляний стерильний посуд (флакони, пробірки, пакети).

За підозри на сибірку розтин тварин заборонено.

Для досліджень можуть бути відібрані різні біологічні матеріали, включаючи ґрунт, воду, рослини, патологічний матеріал від тварин, кров,

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 $см^3$. Грунт та інші матеріали відбирають в кількості приблизно 20 грам.

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 ДНК.

З ґрунту, води, фекалій, оральних, назальних та ректальних змивів готують 10–20 %-ну суспензію на стерильному розчині NaCl (0,85 %). Екстракцію ДНК проводять з надосадової рідини, яку переносять у пробірки типу Eppendorf в об'ємі 100 мкл. Для виділення ДНК із зразків із великою кількістю інгібіторів (ґрунт, кров, стічні води, гній) використовують спеціальні набори для виділення ДНК, наприклад Power Soil Microbiome Kit (Quegen)

Кров перед використанням центрифугують протягом 10 секунд в об'ємі 100 мкл.

Допускається зберігання зразків за температури в діапазоні -20°С … -16°С, не допускаючи циклів повторного розморожування - заморожування.

4. Обладнання, матеріали та реактиви

Діагностичні дослідження в лабораторних умовах з використанням 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 одноразових пластикових 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;

- 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 ДНК використовують доступні в лабораторії комерційні набори (комплекти) для виділення ДНК, 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 ДНК з тканин тварин. Для виділення ДНК із зразків, в яких присутні інгібітори ампліфікації – грунт, фекалії, стічні води, рекомендується застосування спеціальних наборів для виділення ДНК, наприклад Dneasy PowerLyser Microbial Kit, кат №12255-50 (Qiagen, Німеччина).

контрольні зразки:

1) позитивний контрольний зразок;

2) негативний контрольний зразок;

3) внутрішній контрольний зразок, який дає можливість контролювати етап виділення РНК і попереджає отримання псевдонегативних результатів.

Флуоресцентний інтеркалюючий барвник SITO16 (SIBR GREEN) (Invitrogen, USA), 50 мМоль розчин фенолового червоного, якості чда (Китай)

Специфічні олігонуклеотидні праймери наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Послідовності праймерів для виявлення цільових фрагментів збудника сибірки методом LAMP

Назва праймера	Хромосома BA5345 (5′-3′) *	pXO1 lef LAMP (5′-3′)	pXO2CapB (5′-3′)
F3	ATCTGATTAGATG GGGGATAC	GAACAATATACACAT CAAGATGAGA	GAGAAACGACTGCACCTA
B3	TCACCCAAGCAAT TCCAA	CCCTTCTTCCTTAAAA ATATCAATG	GGAAGATAATTTGATAATC GGGTT
FIP	CCGCTTCTATAGG ATTGATTCCTTT ATGGGTCTCGATT TTGTGG	CACCTTTTGAAGGTCC ATGGAGTAA GCAAGTTCATTCAAA AGGGT	CGGTTGCTCCTCGTCAGTA AAC TAAGACTGTAGGGAAAAC AACTG
BIP	CAAATGAGCAAA GGTTTGGGGT TATACTTGGTGCA TTACATACC	TGAGGGTTTTATACAC GAATTTGGA TGTAACTAAATCAGAT TGGTTCT	GTGAGCAACGCAGGGTAGT TA GAACTGCCATACATTCACA A
LF	TAGAACTGCATAC GCAA	CGGGATTCTGGAACA TATA	CATTCGCGCAGATGTA
BF	ACTGGTCTCTTTA GCCG	CATGCTGTGGATGATT ATG	AAGAGGCTGCTGATTTAG

*Примітка * - використані BA5345 праймери, рекомендовані Banger et al. (2021), інші набори розраховані авторами.*

5. Етапи проведення LAMP

5.1. Екстракція ДНК з досліджуваного матеріалу

Для виділення РНК зі зразків патологічного та/або біологічного матеріалу використовують доступні в лабораторії набори 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 ДНК в розчин, звільнення її від білків та дезактивація клітинних ферментів);

- адсорбція НК (зв’язування ДНК 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 (ДНК від білків, жирів, вуглеводів і залишків клітинних мембран);

- елюція (відокремлення ДНК від адсорбуючої речовини і перехід РНК в розчин).

Під час виділення ДНК 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.

Для зберігання виділеної ДНК слід дотримуватися таких температурних режимів:

1. **Короткострокове зберігання (до 4 годин)**: ДНК зберігають при температурі від +2 до +8 °C.
2. **Середньострокове зберігання (до місяця)**: ДНК слід зберігати при температурі -20 °C або нижче.
3. **Довгострокове зберігання**: Для тривалого зберігання рекомендується температура -70 °C або -80 °C. У таких умовах ДНК може зберігатися щонайменше рік без значної деградації.

Також важливо уникати повторних циклів заморожування-розморожування, що призводить до часткового руйнування ДНК, що може негативно позначитись на результатах тестів. Для уникнення цього рекомендується зберігати ДНК в невеликих аліквотах, достатніх для проведення досліджень без повторного заморожування (приблизно по 10-20 мкл)

5.2 Визначення концентрації та якості ДНК

Для визначення концентрації та якості виділеної ДНК використовують наступні підходи:

5.2.1 Вимірювання концентрації ДНК:

Спектрофотометрія (спектрофотометри NanoDrop або інші):

Використовується для швидкого та простого вимірювання концентрації ДНК. Вимірювання проводиться при довжині хвилі 260 нм, оскільки ДНК добре поглинає ультрафіолетове світло на цій довжині.

Співвідношення поглинання при 260/280 нм допомагає визначити чистоту ДНК: чиста ДНК має співвідношення приблизно 1.8. Нижчі значення можуть свідчити про контамінацію білками, а вищі — про наявність інших забруднень, наприклад, фенолу.

Для вимірювання кількості нуклеїнових кислот також використовується співвідношення 260/230 нм, яке повинне бути в межах 2.0-2.2. Низькі значення можуть вказувати на присутність органічних забруднень або солей.

5.2.2 Флуориметрія (прилад Qubit або подібні):

Цей метод дозволяє більш точно визначити концентрацію ДНК, особливо при роботі з низькими концентраціями. Використовуються специфічні флуоресцентні барвники, які зв'язуються лише з ДНК, а не з РНК або білками. Це забезпечує точніші вимірювання, але потребує додаткових реагентів. Вимірювання проводиться згідно протоколів, наданих виробником приладу та відповідних реагентів.

5.2.3. Електрофорез в агарозному гелі:

Аналіз якості ДНК: ДНК поміщається в агарозний гель, де під впливом електричного поля мігрує. Якісна ДНК повинна показувати чіткі, інтенсивні смуги на гелі. Розмиті або "хвилясті" смуги можуть вказувати на деградацію ДНК.

Цей метод дозволяє оцінити розмір фрагментів ДНК та перевірити її цілісність. Якщо присутні численні маленькі фрагменти, це може свідчити про деградацію.

Спектрофотометрія (NanoDrop) корисна для швидкого вимірювання концентрації і чистоти.

Флуориметрія (Qubit) є точнішим методом для низькоконцентрованих зразків.

Електрофорез дає можливість оцінити розмір і цілісність ДНК, що важливо для підтвердження її якості перед подальшим аналізом.

Комплексний підхід до оцінки якості ДНК із застосуванням всіх трьох методів дозволяє точно визначити як концентрацію, так і якість ДНК для подальших досліджень.

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/лунки плашки.

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.

На кожний набір праймерів необхідна окрема пробірка, тобто для проведення реакції необхідно три пробірки дослідних, три негативний контроль та три позитивних контроля (по одному на кожний досліджуваний фрагмент)

Таблиця 2

Оптимальний склад суміші для проведення реакції LAMP (на 25 мкл загального об'єму)

Реагент	Об'єм	Фінальна концентрація в суміші
10X буфер для ізотермальної ампліфікації	2.5 µL	3M (NH4)2SO4-10 µM, 100 µM MgSO4-8 µM, 2M KCl-10 µM, Твін 20-0.1 % v/v
10 mM суміш dNTPs	3.5 µL	1.4 mM
10X суміш праймерів	2.5 µL	0.2 µM F3 0.2 µM B3 1.6 µM FIP 1.6 µM BIP 0.8 µM LF 0.8 µM LB
Bst LF ДНК полімераза	1 µL	8 одиниць / реакція
Nuclease-free water	9.87 µL	-
інтеркалюючий барвник SYTO16	1 µL	-
ДНК зразка	3 µL	-
Загальний об'єм	25 µL	

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 22 мкл реакційної суміші.

5.3.5. Внести по 3 мкл ДНК дослідних зразків у відповідні пробірки/лунки плашки.

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

5.3.7. Внести 3 мкл позитивного контролю у відповідну пробірку/лунку плашки.

5.3.8. Центрифугувати пробірки/плашку при низькій швидкості (для осадження внесених зразків на дно пробірок/лунок плашки і змішування їх з реакційною сумішшю).

5.3.9. Помістити пробірки/плашку із зразками в ампліфікатор.

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

Таблиця 3

Умови ампліфікації ДНК збудника сибірки

Етап	Режим (час, температура)	Кількість повторів
Ізотермічна ампліфікація *	60 хв, 60 °С	1
Зупинка реакції	2 хв 4°С	1

* Детекція флуоресценції проводиться кожні 60 секунд по FAM каналу

5.4. Облік та інтерпретація результатів

Результат ампліфікації ДНК реєструють за барвником FAM (канал Green). Якщо LAMP реакція використовується разом з флуоресцентними барвниками, зміна флуоресцентного сигналу буде основним показником наявності ампліфікованого продукту.

Позитивний результат: зростання флуоресценції вказує на успішну ампліфікацію цільової послідовності ДНК (наявність патогена).

Негативний результат: відсутність змін флуоресцентного сигналу означає відсутність цільової послідовності в зразку.

Порядок роботи (на прикладі «Rotor-Gene 6000» виробництва «QIAGEN Hilden», Німеччина):

– натиснути в меню кнопку «Analysis», обрати режим «Quantification», натиснути кнопку «Cycling A FAM», «Cycling B HEX», «Show»;

– скасувати автоматичний вибір порогу детекції (Threshold);

– в меню основного вікна «Quantification analysis» повинні бути натиснуті дві кнопки «Dynamic tube» та «Slope correct»;

– в меню основного вікна «More setting» встановити значення NTC threshold 10 %;

– в меню «Ct calculation» встановити Threshold – 0,05–0,10 (залежно від базового рівня флуоресценції); в таблиці результатів (вікно «Quantification result») з'являться значення Ct.

Облік результатів ПЛР аналізу проводиться за наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції з встановленою на відповідному рівні пороговою лінією, що відповідає наявності або відсутності значення порогового циклу Tt.

Результати аналізу вважаються достовірними, якщо значення Tt FAM ПКЗ менше або дорівнює 45 (Tt≤45) і відсутнє значення Ct НКЗ, також значення Ct HEX ВКЗ менше або дорівнює 45 (Tt≤45). Оцінка отриманих результатів показників первинного обліку контролів ПЛР-РЧ повинна відповідати критеріям, що зазначені у таблиці 4.

Пробу вважають позитивною, якщо значення Tt FAM менше або дорівнює 45 (Tt≤45), це свідчить про ампліфікацію цільового специфічного фрагменту геному.

Пробу вважають негативною, якщо значення Tt FAM відсутнє.

Таблиця 4

Оцінка результатів аналізу контрольних точок ПЛР-РЧ

Контролі	**Значення Ct на каналі FAM/Green Хромосома BA5345**	**Значення Ct на каналі FAM/Green pXO1 lef**	**Значення Ct на каналі FAM/Green pXO2CapB**
К- (НКЗ)	відсутнє	відсутнє	відсутнє
К+ (ПКЗ)	≤ 45	≤ 45	≤ 45
Патогенний ізолят збудника сибірки	≤ 45	≤ 45	≤ 45
Вакцинний штам збудника сибірки (непатогенний)	≤ 45	≤ 45	-
Збудник сибірки без обох плазмід (непатогенний)	≤ 45	-	-
Негативний результат	-	≤ 45 або -	≤ 45 або -

Результати аналізу не враховуються якщо:
- відсутня ампліфікація ПКЗ за барвником FAM;
- присутня ампліфікація в НКЗ за барвником FAM;
- велика розбіжність результатів у повторах.

У цих випадках проводиться повторне дослідження.

5.5 Проведення досліджень в польових умовах

Для проведення реакції в польових умовах використовується мінімально необхідне обладнання для виділення ДНК (мініцентрифуга, термобокс) та термос або термобокс для ізотермічної ампліфікації.

Для проведення реакції використовується реагент – барвник 50мМоль розчину фенолового червоного. Компоненти реакційної суміші надані в таблиці 5.

Для проведення досліджень необхідно виділення ДНК. Тому набір для виділення використовується такий, що може бути використаний в польових умовах.

Для дослідження одного зразка ДНК необхідно три пробірки для кожної цільової ділянки ДНК, три пробірки негативного зразка НЗК (вода) та три пробірки позитивного зразка.

В пробірки для проведення ПЛР об’ємом 500 мкл вносять по 22 мкл реакційної суміші та по 3 мкл ДНК. В пробірки позитивного контроля вносять 3 мкл позитивного зразка, в пробірки негативного зразка вносять по 3 мкл води для молекулярно-генетичних досліджень.

Для проведення реакції термос або термобокс або інший прилад, здатний забезпечувати постійну температуру, нагрівають до 60°С, після

цього пробірки поміщують в термоприлад і інкубують за температури 60°С протягом 60 хвилин.

Таблиця 5

Склад реакційної суміші для проведення реакції LAMP з колориметричним детектуванням результату реакції (на 25 мкл загального об'єму)

Реагент	Об'єм	Фінальна концентрація в суміші
10Х буфер для ізотермальної ампліфікації	2,5 μL	3M $(NH_4)_2SO_4$-10 μM, 100 μM $MgSO_4$.8 μM, 2M KCl-10 μM, Твін 20-0.1 % v/v
25Х розчин барвника феноловий червоний pH 8.6*	2,0 μL	-
10 mM суміш dNTPs	3.5 μL	1.4 μM
25Х суміш праймерів	2 μL	0.2 μM F3 0.2 μM B3 1.6 μM FIP 1.6 μM BIP 0.8 μM LF 0.8 μM LB
Bst LF ДНК полімераза	1 μL	8 одиниць / реакція
Nuclease-free water	11 μL	-
ДНК зразка	3 μL	-
Загальний об'єм	25 μL	

* барвник додається після зупинки реакції

Після цього реакцію зупиняють або охолодженням на льоді протягом 2 хвилин або нагріванням до температури 80°С протягом 2 хвилин.

Після цього в пробірки додають по 2 мкл 25Х розчину барвника феноловий червоний pH 8.6 (50 ммоль) та зчитують реакцію за зміною забарвлення.

Негативні зразки набувають малинового кольору, позитивні зразки набувають жовтого або помаранчевого кольору. Сумнівні зразки мають червоний колір ближче до малинового. Сумнівні зразки досліджуються повторно. Фото результатів представлено на рис 1.

Оцінку результату досліджень проводять згідно таблиці 6.

Кількісна оцінка зміни кольору від червоного до жовтого у всіх лунках можлива також за допомогою спектрофотометричних вимірювань OD.

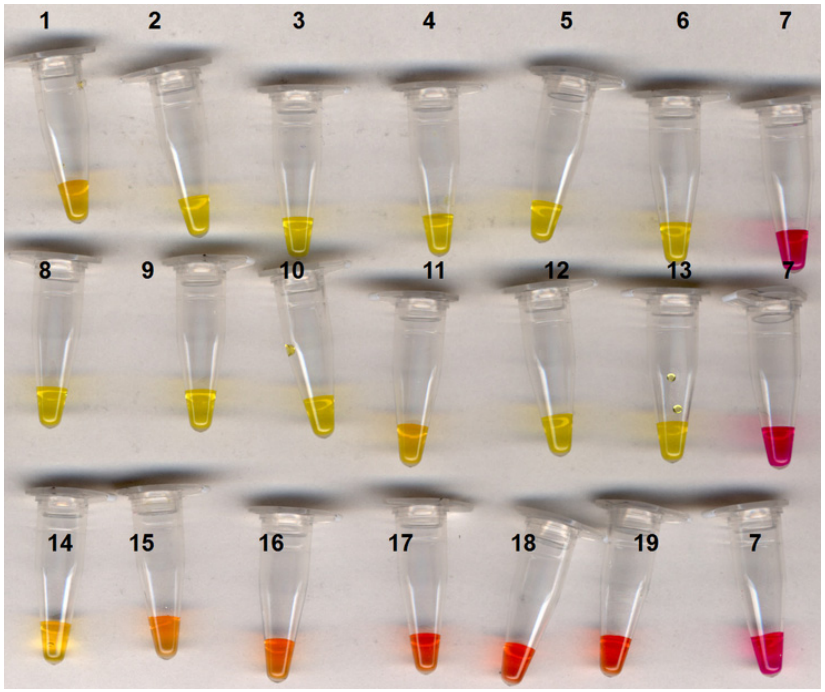

Рис. 1 Результати оцінки реакції LAMP за кінцевою точкою із застосуванням барвника феноловий червоний для виявлення специфічних фрагментів ДНК збудника сибірки

4-14- позитивні проби, інкубація– 60 хвилин; 15-19 –сумнівні проби; 7 – негативний контрольний зразок, 1-3 позитивний контрольний зразок.

Таблиця 6

Оцінка результатів аналізу контрольних точок ПЛР-РЧ

Контролі	**Колір в пробірці з праймером Хромосома BA5345**	**Колір в пробірці з праймером pXO1 lef**	**Колір в пробірці з праймером pXO2CapB**
К- (НКЗ)	Малинове забарвлення	Малинове забарвлення	Малинове забарвлення
К+ (ПКЗ)	Жовте забарвлення	Жовте забарвлення	Жовте забарвлення
Патогенний ізолят збудника сибірки	Жовте забарвлення	Жовте забарвлення	Жовте забарвлення
Вакцинний штам збудника сибірки (непатогенний)	Жовте забарвлення	Жовте забарвлення	Малинове забарвлення
Збудник сибірки без обох плазмід (непатогенний)	Жовте забарвлення	Малинове забарвлення	Малинове забарвлення
Негативний результат	Малинове забарвлення	Малинове забарвлення або зміна кольору	Малинове забарвлення або зміна кольору

Значення кольору кількісно визначається як різниця між довжинами хвиль двох максимуми поглинання застосованого барвника фенолового червоного: ΔOD = OD434 нм – OD560 нм. Жовті (позитивні) зразки характеризуються ΔOD приблизно 0,3 до 0,4 одиниць. Для кожного зразка колір лінії вказує на отримане значення T_T (поріг температури).

Оптимальним часом інкубування з праймерами lef, capB та BA5345 за температури інкубації 60 °C є проміжок часу від 45 до 60 хвилин, що дозволяє виявити 100 та більше копій генома збудника в пробі при цьому уникаючи ризику неспецифічної ампліфікації.

Для більш точного детектування результатів LAMP в лабораторних умовах можливе додаткове проведення електрофоретичної детекції (рис.2).

На рисунку представлено результати детекції різних кількостей ДНК збудника сибірки за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Слід зазначити, що при використанні методики LAMP у реакції утворюються петлеві структури та вторинні продукти ампліфікації, що зумовлює появу декількох смуг різної молекулярної маси на електрофореграмі.

Для візуалізації продуктів ампліфікації після реакції LAMP проводили електрофоретичне розділення в агарозному гелі. Гель готували з використанням 1,5–2% агарози, розчиненої в 1× TBE або TAE буфері, з додаванням міжкалуючого барвника (наприклад, SYBR Safe або Midori Green) для подальшої детекції нуклеїнових кислот.

Після розчинення агарози шляхом нагрівання розчин охолоджували до температури приблизно 50 °C і заливали в камеру з установленим гребінцем для формування лунок. Після застигання гелю лунки заповнювали навантажувальним зразком, що містив 5–10 мкл продукту LAMP, змішаного з буфером завантаження. У якості маркеру молекулярної маси використовуються доступні на ринку комерційні набори, наприклад, 100 bp DNA Ladder (BioRad) для оцінки розміру ампліфікованих фрагментів. Електрофорез проводили за напруги 90–120 В протягом 30–45 хвилин, залежно від товщини гелю та очікуваного розміру фрагментів.

Після завершення розділення гель візуалізують за допомогою ультрафіолетового або синього світла за допомогою гель-документаційної системи або оцінюють візуально. У випадку реакції LAMP характерним є утворення "сходинок" або дифузних смуг різної довжини, що свідчить про мультипродуктову ампліфікацію із формуванням петлеподібних структур, а також залежність інтенсивності сигналу від початкової кількості матриці ДНК.

На Рис.2 представлено результати детекції продуктів ампліфікації методом LAMP при різних концентраціях ДНК збудника сибірки. Лунки 1, 11 та 17 — маркери молекулярної маси (DNA ladder). Лунки 2–10 демонструють позитивні результати ампліфікації за наявності ДНК-матриці у реакційній суміші. Характерне утворення кількох смуг у позитивних зразках обумовлено особливостями механізму LAMP-реакції, у якій генеруються

петлеві структури та фрагменти різної довжини, що утворюють "сходинкоподібний" патерн на електрофореграмі.

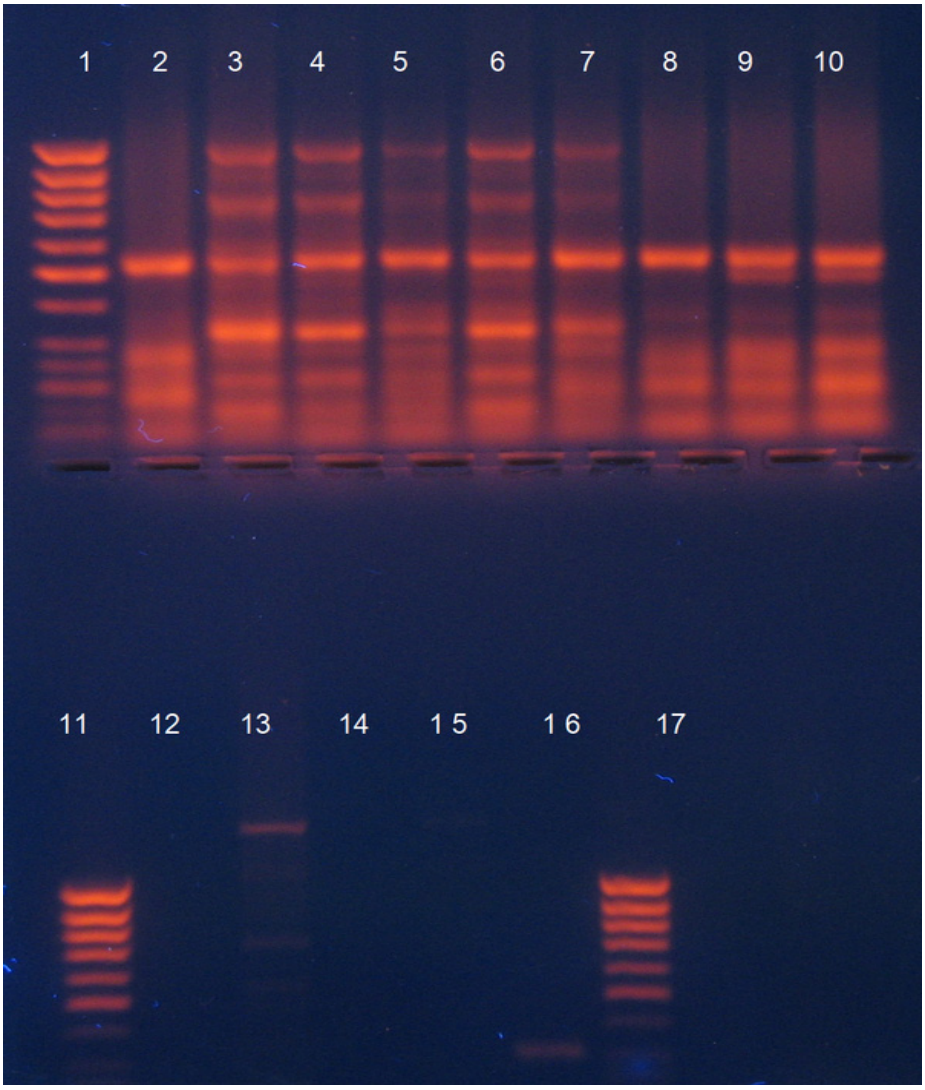

Рис. 2. Електрофоретична детекція продуктів LAMP, виконана зрізними концентраціями ДНК збудника сибірки (копій генома на пробу, ГЕ): 1,11,17 – маркер молекулярної ваги; 2 -10 – позитивні результати; 12- 16 – негативні результати.

Відсутність смуг у лунках 11–16свідчить про негативні результати ампліфікації, зокрема в контрольних зразках без ДНК (no-template control, NTC). Лунки 2, 3 та 4 демонструють позитивні контролі з відомо якісною позитивною ДНК.

6. Заходи безпеки при постановці реакції

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 ПЛР слід збирати в спеціальний контейнер і автоклавувати протягом 1 години за температури +120 °С.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Turnbull P. C. B. (2008). Anthrax in humans and animals. 4th ed. Edition. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

2. Fasanella A., G. Garofolo, M. J. Hossain, M. Shamsuddin, J. K. Blackburn, and M. Hugh-Jones. (2013) Bangladesh anthrax outbreaks are probably caused by contaminated livestock feed. Epidemiology & Infection 141:1021-1028.

3. Robinson S. And E. Milner-Gulland. (2003) Political change and factors limiting numbers of wild and domestic ungulates in Kazakhstan. Human Ecology 31:87-110.

4. Kracalik I., L. Lukhnova, A. Aikimbayev, Y. Pazilov, G. Temiralyeva, and J. K. Blackburn. (2011). Incorporating retrospective clustering into a prospective Cusum methodology for anthrax: evaluating the effects of disease expectation. Spat Spatiotemporal Epidemiol 2:11-21.

5. Skrypnyk, V., Golovko, A., Skrypnyk, A. & Rublenko, I. (2014). Dynamics of anthrax cases in Ukraine during 1970–2013. 16th ICID, International journal of infection diseases, 21S (1–460), 181

6. P.Keim,J.M. Gruendike et al.(2009) The genome and variation of Bacillus anthracis / Molecular aspects of medicine.30: 397–405.

7. Ghosh, S. And Setlow, P. (2009). The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of Bacillus cereus. Journal of Applied Microbiology, 108(2), 582-590. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04442.x

8. Doganay, M., Demiraslan, H. (2015). Human anthrax as a re-emerging disease. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 10(1), 10-29.

9. Imperiale, M. J., Casadevall, A. (2011). Bioterrorism: Lessons learned since the anthrax mailings. MolBio, 2(6), e00232-11.

10. Agren J, Hamidjaja RA, Hansen T, Ruuls R, Thierry S, Vigre H, Janse I, Sundstrom A, Segerman B, Koene M, Lofstrom C, Van Rotterdam B, Derzelle S (2013) In silico and in vitro evaluation of PCR-based assays for the detection of Bacillus anthracis chromosomal signature sequences. Virulence 4:671–685. https:// doi. Org/ 10. 4161/ viru. 26288

11. Antonation KS, Grutzmacher K, Dupke S, Mabon P, Zimmermann F, Lankester F, Peller T, Feistner A, Todd A, Herbinger I, de Nys HM, Muyembe-Tamfun JJ, Karhemere S, Wittig RM, Couacy- Hymann E, Grunow R, Calvignac-Spencer S, Corbett CR, Klee SR, Leendertz FH (2016) Bacillus cereus biovar anthracis causing anthrax in Sub-Saharan Africa-chromosomal monophyly and broad geographic distribution. PloS Negl Trop Dis 10:e0004923. https:// doi. Org/ 10. 1371/ journ al. Pntd. 00049 23

12. Antwerpen MH, Zimmermann P, Bewley K, Frangoulidis D, Meyer H (2008) Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for Bacillus anthracis. Mol Cell Probes 22:313–315

13. Collier RJ, Young JA (2003) Anthrax toxin. Annu Rev Cell Dev Biol 19:45–70. https:// doi. Org/ 10. 1146/ annur ev. Cellb io. 19. 111301.140655

14. Goel AK (2015) Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. World J Clin Cases 3:20–33. https:// doi. Org/ 10.12998/ wjcc. V3. I1. 20

15. Irenge LM, Gala JL (2012) Rapid detection methods for Bacillus anthracis in environmental samples: a review. Appl Microbiol Biotechnol 93:1411–1422. https:// doi. org/ 10. 1007/ s00253- 011- 3845-7

16. 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.

17. Banger S, Pal V, Tripathi NK, Goel AK. Development of a set of three real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of Bacillus anthracis, the causative agent of anthrax. Folia Microbiol (Praha). 2021 Aug;66(4):587-596. doi: 10.1007/s12223-021-00869-x. Epub 2021 Apr 9. PMID: 33834427.

ТАРАСОВ Олександр Анатолійович
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторією зоонозних інфекцій та оцінки ризиків ІВМ НААН
ГУДЗЬ Наталія Вікторівна
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу міжнародної діяльності та ГІС ІВМ НААН
БЕЗИМЕННИЙ Максим Валентинович
аспірант, науковий співробітник сектору секвенування ІВМ НААН

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИЯВЛЕННЯ ЗБУДНИКА СИБІРКИ МЕТОДОМ ІЗОТЕРМІЧНОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ (LAMP)

В авторській редакції

Підписано до друку 09.09.25 Формат 60х84\16
Ум. друк. арк. 1,4
Наклад 100 прим. Зам. № 250576

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