

**СБОРНИК СТАТЕЙ ПО МАТЕРИАЛАМ  
НАЦИОНАЛЬНОЙ (ВСЕРОССИЙСКОЙ)  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
«ВЕТЕРИНАРНЫЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ  
ДИКИХ ЖИВОТНЫХ»**

**Материалы Национальной (Всероссийской)  
научно- практической конференции**



**31 марта 2023 г.  
Уссурийск**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования**

**"Приморский государственный аграрно-технологический  
университет"**

**ВЕТЕРИНАРНЫЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ  
АСПЕКТЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ  
ДИКИХ ЖИВОТНЫХ.**

**Материалы Национальной (Всероссийской)  
научно-практической конференции**

**31 марта 2023 г.**

**Уссурийск, 2023**

УДК 619:639.1.091

ББК 48

В 39

Ветеринарные и биологические аспекты в диагностике и лечении диких животных-[Электронный ресурс]: материалы Национальной (Всероссийской) научно-практической конференции (31 марта 2023 г.). – Электрон. текстовые дан. (1 файл: 5,13 МБ). – Систем. требования: Систем. требования: Google Chrome (или аналогичный интернет-браузер); Acrobat Reader 7.0 (или аналогичный продукт для чтения файлов формата .pdf) / ФГБОУ ВО Приморский ГАТУ; отв. ред. Е.Н. Любченко –Уссурийск, 2023 г. – 136 с. – Режим доступа: <http://www.primacad.ru/images/files/books/2023/VBALLDJ23.pdf>

Материалы сборника освещают результаты обзорных, теоретических и экспериментальных исследований в области ветеринарии и биологии, и сохранения диких животных и птиц.

Сборник может представлять интерес для обучающихся, магистрантов, аспирантов, научно-педагогических работников образовательных и научных учреждений, специалистов по работе с дикими животными.

Рецензенты:

- Момот Н.В. - доктор вет. наук, профессор института животноводства и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Приморская ГСХА;
- Чугаева Н.А., канд. биол. наук, доцент, директор института животноводства и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Приморская ГСХА;
- Короткова И.П., канд. вет. наук, доцент института животноводства и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Приморская ГСХА;
- Любченко Е.Н., канд. вет. наук, доцент института животноводства и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Приморская ГСХА;
- Терехова С.В., канд. биол. наук, доцент, руководитель образовательной программы по специальности ветеринария ФГБОУ ВО Приморская ГСХА;
- Колтун Г.Г., канд. с. - х. наук, доцент, руководитель образовательной программы по направлению ветеринарно – санитарная экспертиза ФГБОУ ВО Приморская ГСХА;
- Жилин Р.А., канд. вет. наук, доцент института животноводства и ветеринарной медицины ФГБОУ ВО Приморская ГСХА;
- Подвалова В. В., доцент Института животноводства и ветеринарной медицины, кандидат сельскохозяйственных наук.

© ФГБОУ ВО Приморский ГАТУ, 2023

ISBN 978-5-4281-0113-3

5. Durette-Desset, M.-C. The Origins and Evolutionary Expansion of the Strongylida (Nematoda) / M.-C. Durette-Desset, I. Beveridge, D. M. Sprat. – Текст: непосредственный // International Journal for Parasitology. – 1994. – Vol. 24. – pp. 1139-1165.
6. Lovász, L. Konik, Tarpan, European wild horse: An origin story with conservation implications / L. Lovász, A. Fages, V. Amrhein. – DOI 10.1016/j.gecco.2021.e01911. – Текст: электронный // Global Ecology and Conservation. – 2021. – Vol. 32. – e01911. – URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2351989421004613?token=6835284DE6C165424571A3E3AD242CE0EBC4F16331452154640DDE0ADA80225AFA4690C05EE820A518C8559FD23FC0EF&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230217133745> (дата обращения: 17.02.2023).
7. Mañés, A. M. 50 Q&A about Parasitic Infections of Horses / A. M. Mañés, F. A. R. Vázquez. – Spain: Servet, 2018. – 281 с. – ISBN: 978-84-17225-82-7. – Текст непосредственный.
8. Parasite dynamics in untreated horses through one calendar year / A. E. Steuer, H. P. Anderson, T. Shepherd [et al.]. – DOI 10.1186/s13071-022-05168-z. – Текст: электронный // Parasites & Vectors. – 2022. – Vol. 50. – URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-022-05168-z> (дата обращения: 17.02.2023).

#### Сведения об авторах:

**Балаченкова Ольга Юрьевна**, частный ветеринарный врач, 309605, ул. Лесная, д. 2, г. Новый оскол, Белгородская область., Россия, тел.: +7 (950) 711-68-39, ORCID 0009-0009-6894-663X, e-mail: [balachenkova95@mail.ru](mailto:balachenkova95@mail.ru)

**Новицкий Станислав Викторович**, главный ветеринарный врач ООО «АгроВи», 309163, ул. 1 Мая, д. 4, оф. 11., с. Скородное, Губкинский р-н, Белгородская обл., Россия, тел.: +7 (968) 572-44-76, ORCID 0000-0001-9904-0456, e-mail: [eedcvet@gmail.com](mailto:eedcvet@gmail.com)

**Акимова Людмила Николаевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории паразитологии ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам», г. Минск, ул. Академическая, 27, Беларусь; тел. +375(29)674-20-54, e-mail: [akimova\\_minsk@mail.ru](mailto:akimova_minsk@mail.ru)

УДК 578.834.1

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ГЕНОМА КОРОНАВИРУСА КОШЕК

**Баранчугова К.А.<sup>1,2</sup>, Кокорев А.С.<sup>3</sup>,  
Милованкин П.Г.<sup>3</sup>, Иунихина О.В.<sup>2,3</sup>, Щелканов М.Ю.<sup>2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Ветеринарная клиника «ДАР», Владивосток, Россия;

<sup>2</sup> Дальневосточный федеральный университет, Школа наук о жизни и биомедицины, Владивосток, Россия;

<sup>3</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия;

<sup>4</sup> ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия.

**Аннотация.** В статье описана система, включающая 41 пару праймеров для проведения полногеномного секвенирования коронавируса кошек (современное название – альфакоронавирус 1-го типа), включая физико-химические характеристики олигонуклеотидов. Анализ продуктов амплификации с помощью гель-электрофореза показал, что подобранные праймеры высоко специфичны и могут быть использованы для секвенирования полноразмерного вирусного генома.

**Ключевые слова:** секвенирование, праймеры, геном, коронавирус кошек, альфакоронавирус 1-го типа.

## DEVELOPMENT OF A PRIMER SYSTEM FOR SEQUENCING THE FULL-LENGTH GENOME OF CAT CORONAVIRUS

**Baranchugova K.A.<sup>1,2</sup>, Kokorev A.S.<sup>3</sup>  
Milovankin P.G.<sup>3</sup>, Iunikhina O.V.<sup>2,3</sup>, Shchelkanov M.Yu.<sup>2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Veterinary clinic "DAR", Vladivostok, Russia;

<sup>2</sup> Far Eastern Federal University, School of Life Sciences and Biomedicine, Vladivostok, Russia;

<sup>3</sup> Research Institute of Epidemiology and Microbiology. G.P. Somov Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia;

<sup>4</sup> Federal Scientific Center for Biodiversity of Terrestrial Biota of East Asia FEB RAS, Vladivostok, Russia.

**Abstract.** The article describes a system that includes 41 pairs of primers for whole genome sequencing of feline coronavirus (modern name alphacoronavirus type 1), including the physicochemical characteristics of oligonucleotides. Analysis of the amplification products by gel electrophoresis showed that the selected primers are highly specific and can be used for sequencing the full-length viral genome.

**Key words:** sequencing, primers, genome, feline coronavirus, type 1 alphacoronavirus.

**Введение.** Во второй половине прошлого века коронавирус кошек (FCoV – Feline coronavirus) был известен под двумя различными названиями, каждое из которых относилось к одному из патотипов FCoV: менее летальный коронавирус энтерита кошек (FECV – Feline enteritis coronavirus) и вирус инфекционного перитонита кошек (FIPV – Feline infectious peritonitis virus), способный вызывать системное заболевание с высоким уровнем летальностью. В настоящее время, FCoV (включающий FECV и FIPV) вместе с коронавирусом собак 1-го и 2-го типов (CCoV-1, 2 – Canine coronavirus 1, 2), респираторным коронавирусом свиней (PRCV – Porcine respiratory coronavirus) и вирусом трансмиссивного гастроэнтерита свиней (TGEV – Transmissible gastroenteritis virus), которые ранее считались самостоятельными, входит в состав альфакоронавируса 1-го типа (AlphaCoV-1 – Alphacoronavirus 1) (Nidovirales: Coronaviridae, Alphacoronavirus, подрод Tegacovirus) [3, 4].

Генетическая вариабельность AlphaCoV-1 делает необходимым разработку систем праймеров для секвенирования полноразмерного генома и их верификацию применительно к конкретному хозяину. В частности, в данной работе представлена система праймеров для секвенирования генома различных вариантов FCoV.

**Материалы и методы.** Для поиска последовательностей генов, к которым необходимо подобрать праймеры, была использована биоинформационная база данных NCBI (National Center for Biotechnological Information – Национальный Центр биотехнологической информации), в которой представлены сведения о структуре генома живых организмов, в том числе – FCoV. Выравнивание полного генома коронавируса кошек производилось с помощью программы MEGA 11 в режиме Muscles. Подбор видоспецифичных олигонуклеотидов проводили вручную после множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей FCoV с помощью программы MEGA 7 (PSU, США). После выбора пар праймеров на расстоянии порядка 600 н.п., каждый олигонуклеотид характеризовали в отношении его физико-химических свойств (табл. 1). С помощью программ, расположенных на сервере <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>, была осуществлена верификация полученных пар праймеров на образование возможных вторичных шпилечных структур, димеров, расчёт доли GC-оснований, оценка температуры плавления каждого олигонуклеотида и его молекулярный вес.

**Результаты исследования.** Фрагмент множественного выравнивания последовательностей генома FCoV в программе MEGA 11 представлен на рисунке 1. С учетом соблюдения условий подбора праймеров для FCoV была выбрана 41 пара праймеров (табл. 1). Праймер – короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, который служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы. Затравка

необходима ДНК-полимеразам для инициации синтеза новой цепи, с 3'-конца праймера. ДНК-полимераза последовательно добавляет к 3'-концу праймера нуклеотиды, комплементарные матричной цепи [2].

Таблица 1- Характеристики олигонуклеотидов, составляющих систему пар праймеров для секвенирования полноразмерного генома FCoV.

Обозначение 5'-праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-праймера	5'-конец 5'-праймера	Длина 5'-праймера, nt	Молекулярная масса г/моль	Температура плавления 5'-праймера, °С	Обозначение 3'-праймера	Нуклеотидная последовательность 3'-праймера	3'-конец 3'-праймера	Длина 3'-праймера, nt	Молекулярная масса г/моль	Температура плавления 3'-праймера, °С	Длина амплифицируемого фрагмента, с учетом
1F	TGTAGCGTGGCTATAACTCT	1	18	6123,0	51,0	2R	TTCATCGCGCACAGTTA	726	17	5145,4	51,6	726
3F	TAAGTGTGCGCGATGAAA	760	17	5547,7	51,6	4R	TGAAAGCAGTAGTGCAAAG	1542	19	5909,9	50,5	783
5F	CTTTGCACTACTGCTTTCA	1524	19	5704,8	50,5	6R	TGGTTGAAGGTATCGAGAAA	2304	20	6245,1	51,0	781
7F	TTTCTCGATACCTTCAACCA	2395	20	5986,9	51,0	8R	CACCGCATGTGTCATAAATA	3210	20	6085,0	50,5	816
9F	TATTTATGACACATGCGGTG	3191	20	5067,5	6147	10R	AAACTCATTCTAAGAGGTG	3946	20	6125,0	49,3	756
11F	CACCTCTTAGGAATGAGTTT	3926	20	6107,0	49,3	12R	ACAGTTTTAAGTAGACACTGC	4716	20	6429,2	50,3	791
13F	GCAGTGTCTACTTAAAAGTGT	4696	20	6420,2	50,3	14R	CAGTTGCGTCAATAACATCT	5376	20	6076,0	50,6	681
15F	AGATGTTATTGACGCAACTG	5357	20	6156,1	50,6	16R	ACTACATGCCAATTTATGCA	6120	20	6060,0	50,0	764
17F	TGCATAAATTGGCATGTAGT	6100	20	6171,1	50,0	18R	CTTAAGCACCTCCTGACT	6855	18	5394,6	51,1	756
19F	AGTCAGGAGGTGCTTAAG	6864	18	5603,7	51,1	20R	CCATGTAATCATAACCCTCA	7660	20	6005,0	49,2	797
21F	TGAGGGTTATGATTACATGG	7640	20	6227,1	49,2	22R	CATAACTACTAGGAGAGTGC	8448	20	6150,1	49,1	809
23F	GCACTCTCCTAGTAGTTATG	8428	20	6083,0	49,1	24R	CACAAGATTCACACCCTTA	9238	19	5700,8	49,4	811
25F	TAAGGGTGTGAATCTTGTG	9219	19	5913,9	49,4	26R	TGCTGGATTAATCCAGGTA	9996	20	6156,1	50,9	778
27F	TTACSTGGATTAATCCAGCA	9976	20	6076,0	50,9	28R	GCCGAGCAAAACAACAT	10807	17	5181,4	51,2	832
29F	ATGTTGTTTTGCTCGGC	10790	17	5198,4	51,2	30R	TCATTGTTTTGCAACTTTGT	11588	20	6079,0	49,0	799
31F	ACAAAGTTGCAAAACAATGA	11568	20	6151,1	49,0	32R	CCAATGCATGCAACATCT	12369	18	5427,6	51,1	802
33F	AGATGTTGCATGCATTGG	12351	18	5569,7	51,1	34R	CTGCTTATAATCTGAGCCAT	13109	20	6067,0	49,5	759
35F	ATGGCTCAGATTATAAGCAG	13089	20	6165,1	49,5	36R	GCCTTGCTTACCAAAT	13869	17	5105,4	50,1	781
37F	ATTTGGTAAGGCAAGGC	13852	17	6165,1	50,1	38R	AAAGTCGTCATCAACACTG	14531	19	5780,8	50,2	680
39F	CAGTGTGATGACGACTTT	14512	19	6165,1	50,2	40R	GACATGATCGTAGGAGCA	15236	18	5572,7	51,2	725
41F	TGCTCCTACGATCATGTC	15218	18	5425,6	51,2	42R	TGATAGTAAGGCACCAATGT	15946	20	6165,1	52,1	729
43F	ACATTGGTGCCTTACTATCA	15926	20	6067,0	51,1	44R	TGTGCTAAAAATGCCTTGAC	16642	20	6116,0	51,4	717
45F	GTCAGGCATTTTTAGCACA	16622	20	6116,0	51,4	46R	GCTTTTACAACCTCTATGCT	17314	20	6018,0	50,2	693
47F	AGCATAGAGGTTGAAAAGC	17294	20	6214,1	50,2	48R	TCATTTGTCCATGTACCATG	18045	20	6058,0	50,2	752
49F	CATGGTACATGGACAAATGA	18025	20	6174,1	50,2	50R	ACTTCACCATCAAGATCAGT	18820	20	6045,0	51,0	796
51F	ACTGATCTTGATGGTGAAGT	18800	20	6187,1	51,0	52R	TTGTAAGTGTAGGCATGC	19549	19	5882,9	50,3	750
53F	GCATGCCTACACTTTACAA	19530	19	5731,8	50,3	54R	TGAATTGTGTGACAGTGC	20207	18	5569,7	50,5	678
55F	GCACTGTCACACAATTCA	20189	18	5427,6	50,5	56R	CACCGTCACCTAAACTG	20918	17	5099,4	50,0	730
57F	CAGTTTAGGTGACGGTG	20901	17	5281,5	50,0	58R	CCAAGAAGTGTCTACTCAC	21686	19	5716,8	49,7	786
59F	GTGAGTAGACAGTTCTTGG	21667	19	5898,9	49,7	60R	TTCGGCATGGTCGTAA	22455	16	4912,2	50,7	789
61F	TTACGACCATGCCGAA	22439	16	4850,2	50,7	62R	GAATCTGAATGTATTCGGCT	22898	20	6147,0	50,0	460
63F	AGCCGAATACATTCAGATTC	22878	20	6085,0	50,0	64R	TCAGTTTGTAATGCAACGT	23596	20	5817,8	49,9	719
65F	TACGTTGCATTACAAAAGTGA	23596	20	6100,0	49,7	66R	AAAGTCACTTCACAACCTCG	24315	19	5740,8	50,1	720
67F	CGAGTTGTGAAGTGACTTT	24296	19	5873,9	50,1	68R	CTTCAATATCCAGCTGAAGT	24994	20	6076,0	49,6	699
69F	ACTTCAGCTGGATTTGAAG	24974	20	6156,1	49,6	70R	CTTCTATAAACGGTGCAG	25613	19	5787,8	50,9	640
71F	CTGCACCGTTTATGAGAAG	25606	19	5827,0	50,9	72R	GCCATAGTAGCCACATGA	26422	19	5492,6	51,6	817
73F	TCATGTGGCTACTATGGC	26403	19	5505,6	51,6	74R	AATGCGATAACGCTCCT	27182	20	5154,4	51,2	780
75F	AGGAGCGTTATCGCATT	27162	20	5225,4	51,2	76R	CGCTTGAAGCGTCAAT	27871	17	5185,4	50,3	710
77F	ATTGACGCTTACAAGCG	27854	17	5194,4	50,3	78R	GCAATTGAAACCTTCAACAC	28600	20	6054,0	50,5	747
79F	GTGTTGAAGGTTTCAATTGC	28580	20	6178,1	50,5	80R	AACAATCACTAGATCCAGAC	29253	20	6063,0	49,0	674



Рисунок 1- Пример выравнивания нуклеотидных последовательностей в программе MEGA 11.

Геном FCoV включает 29 300 п.н. [4]. Длина амплифицируемых фрагментов (с учётом праймеров) составляет от 600 до 800 нуклеотидов, что соответствует возможностям однозаходного прочтения на современных секвенаторах. При этом, длина праймеров составляет от 16 до 22 нуклеотидов. Температура отжига праймеров лежит около 50 °С, допустимые колебания  $\pm 1$  °С [1, 2].

#### Список источников

1. Гарафутдинов, Р.Р. Разнообразие праймеров для ПЦР и принципы их подбора / Р.Р. Гарафутдинов, А.Х. Баймиев, А.В. Чемерис // Биомика. – 2019. – Т. 11. – № 1. – С. 23-70.
2. Ковтун, И.С. Особенности подбора праймеров конститутивного гена для проведения полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции / И.С. Ковтун, М.В. Ефимова // Вестник Томского государственного университета. – 2013. – № 2. – С. 160-171.
3. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Ред.: Д.К. Львов. – М.: МИА, 2013. – 1200 с.
4. Щелканов, М.Ю. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) / М.Ю. Щелканов, А.Ю. Попова, В.Г. Дедков и др. // Инфекция и иммунитет. – 2020. – V. 10. – № 2. – С. 221-242.

#### Сведения об авторах:

**Баранчугова Ксения Александровна** – ветеринарный врач; ветеринарная клиника «ДАР», 690077, Владивосток, ул. 50 лет ВЛКСМ, д. 30Б; аспирантка Школы Мирового океана Дальневосточного федерального университета; Россия, г. Владивосток, ул. Суханова, д. 8; +7 914 682 1553; ORCID 0000-0003-3617-9711X; ksenya.008@mail.ru

**Кокорев Александр Сергеевич** – младший научный сотрудник; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; +7 902 488-9279; aksolotl50@gmail.com

**Милованкин Павел Геннадьевич** – младший научный сотрудник; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; +7 914 710-5420; ORCID: 0000-0002-9628935x; academkin@mail.ru

**Иунихина Ольга Викторовна** – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией зоонозных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; доцент кафедры эпидемиологии, микробиологии и паразитологии с Международным научно-образовательным Центром биологической безопасности Школы наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета; Россия, г. Владивосток, ул. Суханова, д. 8; +7 924 238-3986, ORCID 0000-0002-6723-582X, olga\_iun@inbox.ru

**Щелканов Михаил Юрьевич** – доктор биологических наук, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, заведующий кафедрой эпидемиологии, микробиологии и паразитологии Института наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета, ведущий научный сотрудник ННЦ морской биологии Дальневосточного отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией вирусологии ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690087, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1, +7 924 529-7109, ORCID 0000-0001-8610-7623, adorob@mail.ru