

**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

сельскохозяйственная академия», 692510 Приморский край, г. Уссурийск, ул. Блюхера, 44, ORCIDID: 0000-0002-9441-8250; E-mail: LyubchenkoL@mail.ru;

Капралов Дмитрий Валентинович, старший преподаватель, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приморская государственная сельскохозяйственная академия», 692510 Приморский край, г. Уссурийск, ул. Блюхера, 44, ORCIDID: 0000-E-mail: d-капралов@bk.ru;

Жилин Руслан Алексеевич, кандидат ветеринарных наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приморская государственная сельскохозяйственная академия», 692510 Приморский край, г. Уссурийск, ул. Блюхера, 44, ORCIDID: 0000-0002-7523-5619; e-mail: zhilin.r@mail.ru.

Кожушко Александр Анатольевич, кандидат биологических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приморская государственная сельскохозяйственная академия», 692510 Приморский край, г. Уссурийск, ул. Блюхера, 44, ORCIDID: 0000-0001-5753-2460; E-mail: shurban.12@mail.ru.

УДК 578.52

ПОДБОР СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА (AMARILLOVIRALES, FLAVIVIRIDAE)

Лубова В.А.¹, Белов Ю.А.^{1,2}, Шутикова А.Л.¹, Щелканов М.Ю.^{1,2,3}

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия;

² Дальневосточный федеральный университет, Школа наук о жизни и биомедицины, Владивосток, Россия;

³ ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия.

Аннотация. В статье описан набор из 20 праймеров для проведения полногеномного секвенирования вируса клещевого энцефалита. В работе приводятся необходимые концентрации, а также температурные режимы плавления и отжига. Анализ продуктов амплификации показал, что подобранные олигонуклеотиды характеризуются высокой специфичностью и могут быть использованы для секвенирования вируса клещевого энцефалита.

Ключевые слова: секвенирование, праймеры, геном, вирус клещевого энцефалита.

SELECTION OF A PRIMER SYSTEM FOR FULL-LENGTH SEQUENCING OF THE VIRUS TBE-BASED ENCEPHALITIS (AMARILLOVIRALES, FLAVIVIRIDAE)

Lubova V.A.1, Belov Yu.A.1,2, Shutikova A.L.1, Shchelkanov M.Yu.1,2,3

¹ Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. G.P. Somov Rospotrebnadzor, Vladivostok, Russia

² Far Eastern Federal University, School of Life Sciences and Biomedicine, Vladivostok, Russia;

³ Federal Scientific Center for Biodiversity of Terrestrial Biota of East Asia FEB RAS, Vladivostok, Russia.

Abstract. The article describes a set of 20 primers for whole genome sequencing of tick-borne encephalitis virus. The paper presents the necessary concentrations, as well as the temperature regimes of melting and annealing. Analysis of the amplification products showed that the selected oligonucleotides are characterized by high specificity and can be used for sequencing of the tick-borne encephalitis virus.

Key words: sequencing, primers, genome, tick-borne encephalitis virus.

Введение. Клещевой энцефалит (КЭ) – зооантропонозная, природно-очаговая вирусная инфекция, передающаяся трансмиссивным и алиментарным путем. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) (Amarillovirales: Flaviviridae, Flavivirus) принадлежит к экологической группе вирусов, связанных с иксодовыми клещами (Parasitiformes: Ixodidae). ВКЭ встречается на обширной территории Евразии от Атлантического до Тихого океана в лесных, лесостепных и экстрараональных экосистемах. Ареал вируса, в

основном, совпадает с ареалами его основных переносчиков – *Ixodes persulcatus* и *I. ricinus* [3, 4, 8].

Оболочечный вирион ВКЭ имеет сферическую форму диаметром 45-60 нм. Вирионная РНК упакована в икосаэдрический капсид, сформированный молекулами структурного белка С. Белки Е и М связаны с внешней липидной оболочкой [7, 11]. Вирион содержит единственную копию одноцепочечной РНК положительной полярности длиной примерно 11000 п.н. Кодированная часть генома фланкирована 5'- и 3'-нетранслируемыми областями, которые выполняют регуляторную функцию в процессах репликации и трансляции [6, 11]. 5'-концевой кластер генов образован структурными белками Е, М, С, 3'-концевой кластер генов – неструктурными белками NS1-NS5, на конце которого располагается стоп-кодон UAA [2]. Генетическая изменчивость 5'-концевой области генома определяет фенотипическую изменчивость и высокий уровень экологической пластичности ВКЭ [5, 9, 10, 11].

Ранняя систематика флавивирусов была основана на их антигенном родстве, а также на общих эпидемиологических, патогенетических и экологических характеристиках. Расшифровка нуклеотидных последовательностей геномов штаммов ВКЭ с использованием современных молекулярно-генетических методов является наиболее информативным подходом к изучению внутривидовых различий ВКЭ.

Цель работы – осуществить подбор видоспецифичных праймеров для секвенирования полного генома ВКЭ.

Материалы и методы. Для проверки работоспособности системы праймеров был выбран штамм ВКЭ/Primorye-124 из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора [1], изолированный в 1983 г. из *I. persulcatus*. Выделение РНК осуществляли с использованием коммерческого набора реагентов РНК/ДНК «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Москва), кДНК получали при помощи набора «Реверта-Л» (ЦНИИЭ, Москва). Полимеразную цепную реакцию с «горячим стартом» проводили с использованием коммерческого набора БиоМастер HS-Тaq ПЦР (2×) (Биолабмикс, Новосибирск).

Последовательности референс-штаммов были взяты из международной базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Результаты исследования. Для каждой последовательности референс-штаммов ВКЭ было произведено многократное выравнивание в программе MEGA 7 (PSU, США) с использованием алгоритма Clustal W, после чего нуклеотидные последовательности были условно разделены на участки по 600 п.н. Подбор праймеров производили вручную без использования каких-либо дополнительных программ, но с учетом всех требований к конструированию видоспецифичных олигонуклеотидов. Для полногеномного секвенирования ВКЭ были выбраны 20 пар видоспецифичных праймеров.

С помощью инструментов сервера <https://eu.idtdna.com/calc/analyser> была проведена проверка полученных пар праймеров на образование возможных вторичных шпилечных структур, димеров, расчёт доли GC-оснований, оценка температуры плавления каждого олигонуклеотида и его молекулярный вес.

Далее, в процессе экспериментальной верификации была подобрана оптимальная температура отжига олигонуклеотидов, необходимые концентрации кДНК и праймеров (табл. 1-2).

Таблица 1 - Состав реакционной смеси для проведения ПЦР.

| Компонент | Количество для одной реакции (мкл) |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Мастер-микс «БиоМастер HS-Тaq ПЦР» | 25 |
| Стерильная деионизированная вода | 19 |
| 5'-праймер | 1 |
| 3'-праймер | 1 |
| кДНК | 4 |

Таблица 2 - Протокол амплификации

| Этап | Температура, °С | Время инкубации | Количество циклов |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Предварительная денатурация | 95 | 3 мин | 1 |
| Денатурация | 95 | 30 сек | 30 |
| Отжиг | 54 | 30 сек | |
| Элонгация | 72 | 60 сек | |
| Финальная элонгация | 72 | 10 мин | 1 |

Анализ полученных ПЦР-продуктов проводили методом электрофореза в 1,5 %-ом агарозном геле, который готовили следующим образом: к 3 г порошка агарозы (Fermentas, США) добавляли 200 мл однократного буфера TBE, разогревали до кипения смеси, остужали до 60 °С, дегазировали и заливали в ванночки для проведения электрофореза. Для визуализации результатов использовали интерколяционный краситель – бромид этидия (Thermo FS, США). Электрофорез проводили в буфере TBE (при напряжении 120 В и токе 80 мА). Полученные фрагменты нуклеиновых кислот после электрофоретического разделения визуализировали в УФ-свете (рис. 1).

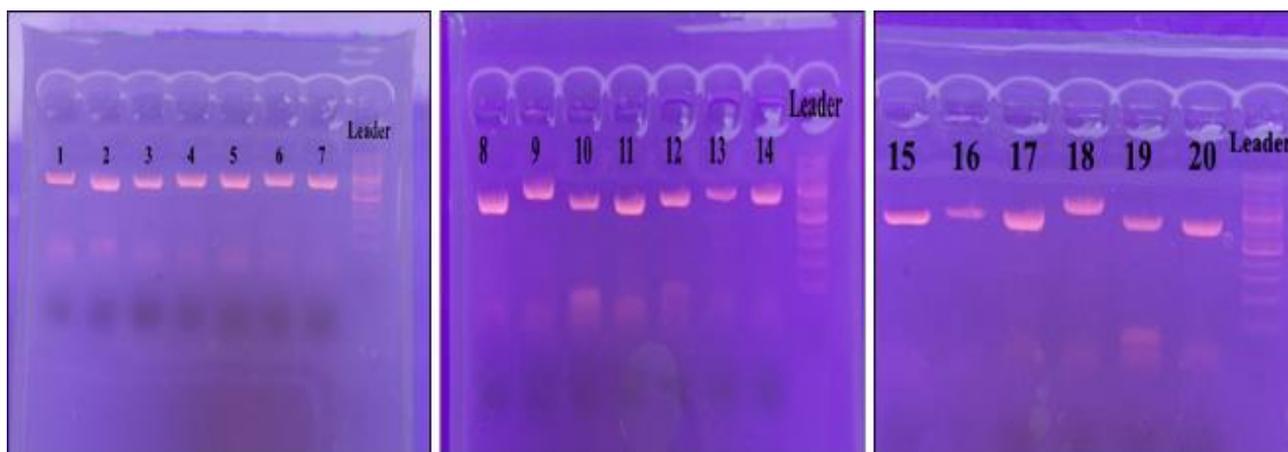


Рисунок 1. Результаты амплификации кДНК штамма *Primoeye-124* по оптимизированной схеме с разработанной системой из 20 пар праймеров для полногеномного секвенирования ВКЭ.

Выводы. Результаты экспериментов свидетельствуют об успешном отжиге праймеров и показывают их специфичность к геному ВКЭ. Подобранные нами синтетические олигонуклеотидные последовательности могут быть использованы в качестве праймеров для полногеномного секвенирования ВКЭ.

Список источников

1. Запорожец, Т.С. 80 лет на страже биологической безопасности у восточных рубежей России // Т.С. Запорожец, Н.Н. Беседнова, А.В. Калинин, Л.М. Сомова, М.Ю. Щелканов // Здоровье населения и среда обитания. – 2021. – № 5. – С. 5-15.
2. Злобин, В.И. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита: монография / В.И. Злобин, С. И. Беликов, Ю.П. Джигоев, Т.В. Демина, И.В. Козлова. – Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. – 271 с.
3. Кучерук, В.В. Клещевой энцефалит / В.В. Кучерук, Л.М. Иванова, В.М. Неронов // В кн.: География природно-очаговых болезней в связи с задачами их профилактики. – М., 1969. – С. 171-217.
4. Львов, Д.К. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории российской федерации / Д.К. Львов, П.Г. Дерябин, В.А. Аристова и др. – М.: НПТМ МЗ РФ, 2001. – 192 с.
5. Микрюкова, Т.П. Молекулярно-генетическая оценка возбудителей клещевых инфекций и их переносчиков в природных очагах Западной Сибири и Северо-Восточного региона Европейской части России: специальность 03.01.03: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Микрюкова Тамара Петровна; Кольцово, 2012. – 133 с.
6. Плетнев, А.Г. Нуклеотидная последовательность генома и полная аминокислотная последовательность полипротеина вируса клещевого энцефалита / А.Г. Плетнев, В.Ф. Ямщиков, В.М. Блинов // Биоорганическая Химия. – 1989. – Т. 15. – № 11. – С. 1504-1521.
7. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Ред.: Д.К. Львов. – М.: МИА, 2013. – 1200 с.
8. Щелканов, М.Ю. Историография термина «природный очаг» / М.Ю. Щелканов, В.А. Аристова, В.М. Чумаков, Д.К. Львов // В сб.: Новые и возвращающиеся инфекции в системе биобезопасности Российской Федерации. Учебно-методическое пособие. – М.: Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, 2014. – С. 21-32.
9. Brinton, M.A. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA / M.A. Brinton, J.H. Disposito // Virology. – 1988. – V. 162. – N 2. – P. 290-299.
10. Casati, S. Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting Ixodes ricinus ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern) / S. Casati, L. Gern, J. Piffaretti // General Virology. – 2006. – V. 87. – P. 2235-2241.
11. Lvov, D.K. Zoonotic viruses of Northern Eurasia: Taxonomy and ecology / D.K. Lvov, M.Yu. Shchelkanov, S.V. Alkhovsky, P.G. Deryabin. – Amsterdam: Academic Press, 2015. – 452 p.

Сведения об авторах:

Лубова Валерия Александровна – научный сотрудник; ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора; Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; тел.: 89990407108; ORCID: 0000-0002-4290-6164; valeri_priority@mail.ru

Белов Юрий Александрович – младший научный сотрудник; руководитель Центра молекулярной диагностики; ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора; Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; ассистент 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; тел.: 89046292257; ORCID: 0000-0001-8313-5610; bornley@yandex.ru

Шутикова Анна Леонидовна – кандидат медицинских наук; заведующий лабораторией трансмиссивных инфекций; ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора; Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; тел.: 89146939928; ORCID: 0000-0002-6803-0439; shutikova79@mail.ru

Щелканов Михаил Юрьевич – доктор биологических наук; директор ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора; Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; заведующий лабораторией вирусологии ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук; Россия, г. Владивосток, пр-т Столетия Владивостоку, 159/1; заведующий кафедрой 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; тел.: 89245297109; ORCID: 0000-0001-8610-7623; adorob@mail.ru