

**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

ПОДБОР СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ОРТОХАНТАВИРУСА ХАНТААН (HANTAVIRIDAE, BUNYAVIRALES)

Потт А.Б.¹, Иунихина О.В.^{1,2}, 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 описана система из 23 пар олигонуклеотидных праймеров для проведения полногеномного секвенирования ортохантавируса Хантаан и оптимальные режимы проведения ПЦР. Верификация специфичности праймеров и условий ПЦР осуществлялась на модели прототипного штамма Хантаан-76-118. Анализ продуктов амплификации показал, что выбранные системы праймеров характеризуются высокой специфичностью и могут быть использованы для последующего секвенирования штаммов ортохантавируса Хантаан, циркулирующих на территории Приморского края.

Ключевые слова: Хантаан, ортохантавирусы, секвенирование, праймеры, полимеразная цепная реакция, полноразмерный геном.

SELECTION OF A PRIMER SYSTEM FOR GENOME-WIDE SEQUENCING OF THE ORTHOHANTAVIRUS HANTAAN (HANTAVIRIDAE, BUNYAVIRALES)

Pott A.B.¹, Iunikhina O.V.^{1,2}, 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 system of 23 pairs of oligonucleotide primers for whole genome sequencing of Hantaan orthohantavirus and optimal modes of PCR. Verification of the specificity of primers and PCR conditions was carried out on the model of the prototype strain Hantaan-76-118. Analysis of the amplification products showed that the selected primer systems are characterized by high specificity and can be used for subsequent sequencing of Hantaan orthohantavirus strains circulating in Primorsky Krai.

Key words: Hantaan, orthohantaviruses, sequencing, primers, polymerase chain reaction, full-length genome.

Введение. Ортохантавирусы (Bunyavirales: Hantaviridae, Orthohantavirus) широко распространены во всем мире, поскольку их естественными хозяевами являются грызуны (Rodentia) – представители наиболее многочисленного отряда млекопитающих. С ортохантавирусами связаны две клинические формы заболеваний человека: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) в Евразии и хантавирусный кардиопульмонарный синдром в Новом Свете. В настоящее время, идентифицировано порядка 100 генотипов ортохантавирусов, из которых 22 связаны с заболеваниями людей [2, 5]. На территории Российской Федерации по результатам молекулярно-генетического анализа установлена циркуляция 7 ортохантавирусов, 4 из которых патогенны для человека: Пуумала (PUUV – Puumala virus), Добрава-Белград (DOBV – Dobrava-Belgrade virus) (европейская часть страны), Хантаан (HNTV – Hantaan virus) и Сеул (SEOV – Seoul virus) (Сибирь и Дальний Восток) [2]. В Дальневосточном Федеральном округе (в частности – в Приморском крае) заболеваемость ГЛПС определяют HNTV (генотипы Far East и Amur), основным

природным резервуаром которого являются лесные и полевые мыши (*Apodemus* spp.), и SEOV, циркулирующий в популяции серых крыс (*Rattus norvegicus*) [3].

Вирион ортохантавируса имеет округлую форму диаметром 90-130 нм [2, 6]. Геном представлен сегментированной одноцепочечной РНК отрицательной полярности. Генетические сегменты, обозначаемые как S (1600-1800 нуклеотидов), M (3600-3800) и L (6800-6900) кодируют, соответственно, нуклеокапсидный белок N, поверхностные гликопротеины G_n и G_c, а также вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу RdRp [5, 7]. Одним из критериев дифференциации видов ортохантавирусов является уровень различий в последовательностях M- и S-сегментов генома и их белковых продуктах: свыше 20 % для нуклеотидных и 6 % для аминокислотных последовательностей [5].

Выделенные на территории Дальнего Востока штаммы HNTV, относящиеся к генотипу Far East, имеют между собой незначительные генетические различия для M-, L- и S-сегментов в пределах 0-4,2 %, 0,6-3,5 % и 0-2,0 %, соответственно. Кроме того, варианты генотипа Far East имеют ряд характерных (маркёрных) аминокислотных замен [4], обнаружить которые возможно только при анализе полного генома.

Цель работы – разработать и верифицировать систему видоспецифичных праймеров для секвенирования полного генома HNTV.

Материалы и методы. Подбор видоспецифичных олигонуклеотидов проводили вручную на основе многократного выравнивания нуклеотидных последовательностей в программе MEGA 7 (PSU, США), используя последовательности S-, M- и L-сегментов генома прототипного штамма HNTV-76-118 (GenBank ID KT885049.1, KT885048.1, KT885047.1; генотип Far East). Каждый праймер проверяли на возможность образования вторичных шпильчатых структур, наличие палиндромов, процента CG-оснований и рассчитывали термодинамические свойства на сервере BlastN (NCBI, США). Синтез выбранных олигонуклеотидов осуществляла российская биотехнологическая компания «Евроген» (<https://evrogen.ru/>).

Верификация работоспособности разработанной системы праймеров проводилась с использованием прототипного штамма HNTV-76-118 из коллекции патогенных микроорганизмов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова Роспотребнадзора [1]. РНК вируса выделяли с использованием коммерческого набора реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИ", Москва), кДНК получали при помощи набора «Реверта-L» (ЦНИИ", Москва). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с «горячим стартом» проводили с использованием коммерческого набора БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×) (Биолабмикс, Новосибирск). Анализ полученных ПЦР-продуктов проводили методом электрофореза в 1,5 %-ом геле. Электрофорез проводили в буфере TBE (при напряжении 120 В и токе 80 мА). Полученные фрагменты нуклеиновых кислот визуализировали в УФ-свете.

Результаты исследования. Для полногеномного секвенирования ортохантавирусов были подобраны 23 пары видоспецифичных праймеров, длиной 16-20 пар нуклеотидов (S – 3 пары; M – 7 пар; L – 13 пар).

С целью оптимизации условий постановки ПЦР был проведен ряд предварительных экспериментов. Режим амплификации первоначально проводили согласно рекомендациям Lee с соавт. (2020) [8], однако температура отжига праймеров

в указанной схеме оказалась неподходящей для нашей системы праймеров. В последующих экспериментах для каждой группы праймеров нами была скорректирована температура отжига, количество реакционных циклов и необходимые концентрации кДНК и праймеров. В итоговом протоколе амплификации для всех праймеров: предварительная денатурация 95 °С × 1-3 мин × 1 цикл; денатурация 95 °С × 30 сек × 3 мин; отжиг 52 °С × 30 сек (S), 50 °С × 1 мин (M), 55 °С × 1 мин (L); элонгация 72 °С × 1-2 мин 35 циклов; финальная элонгация 72 °С × 5-10 мин × 1 цикл.

Анализ данных электрофореза показал, что для всех пар праймеров получены целевые ПЦР-продукты (около 600 п.н.), неспецифические продукты реакции отсутствуют. Результаты электрофореза систем олигонуклеотидов, подобранных для S и M сегментов представлены на рис. 1.

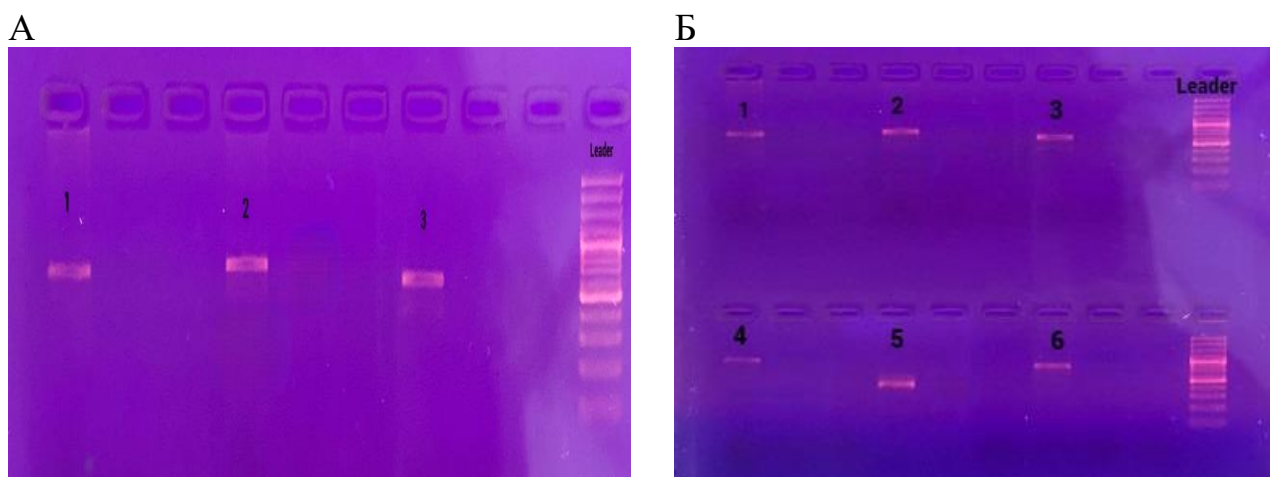


Рисунок 1- Результаты амплификации кДНК прототипного штамма HNTV-76-118: S-сегмент (А); М-сегмент (Б).

Выводы. Разработана и экспериментально апробирована на модели HNTV-76-118 система олигонуклеотидных праймеров ко всем трем сегментам генома ортохантавирусов. Полученные результаты свидетельствуют об успешном отжиге праймеров и показывают их специфичность к выбранным сайтам генома HNTV. Подобранные нами синтетические олигонуклеотидные последовательности можно использовать для последующего полногеномного секвенирования как методом Сенгера, так и с применением технологии нанопорового секвенирования.

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. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Ред.: Д.К. Львов. – М.: МИА, 2013. – 1200 с.
3. Слонова, Р.А. Эпидемиологическая и эпизоотологическая характеристика очагов с групповой заболеваемостью геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Приморском крае / Р.А. Слонова, Т.В. Кушнарера, О.В. Иунихина, И.Г. Максема, Г.Г. Компанец, Е.Л. Кушнарев, В.П. Борзов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. – № 3. – С. 10-13.
4. Яшина, Л.Н. Генетическое разнообразие хантавирусов в популяции грызунов и насекомых азиатской части России: специальность 03.01.03: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Яшина Людмила Николаевна; Кольцово, 2012. – 264 с.

5. 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.
6. McCormick, J. Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the Bunyaviridae / J. McCormick, E. Palmer, D. Sasso, M. Kiley // Lancet. – 1982. – N 3. – P. 765-768.
7. Schmaljohn, C. Coding strategy of the S-genome segment of Hantaan virus / C. Schmaljohn, G. Jennings, J. Hay, J. Dalrymple // Virology. – 1986. – V. 155. – P. 633-643.
8. Lee, G.-Y. Phylogeographic diversity and hybrid zone of Hantaan orthohantavirus collected in Gangwon Province, Republic of Korea / G.-Y. Lee, W.-K. Kim, K. Park // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2020. – V. 14. – N 10. – P. 1-18.

Сведения об авторах:

Потт Анастасия Борисовна – научный сотрудник; ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора; Россия, г. Владивосток, ул. Сельская, д. 1; тел.: 89247348265; ORCID: 0000-0002-1235-4960; pott_a.b@mail.ru

Иунихина Ольга Викторовна – кандидат медицинских наук; заведующая лабораторией зоонозных инфекций; ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Роспотребнадзора; Россия, 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; тел.: 89242383986; ORCID: 0000-0002-6723-582X; olga_iun@inbox.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

УДК 595.799:638.165.8

APIS CERANA – АБОРИГЕННАЯ ПЧЕЛА ЮГА ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

Пулинец Е. К., Дьяков А. В.

Приморская государственная сельскохозяйственная академия, Уссурийск, Россия

Аннотация. В статье приведено описание отличительных видовых особенностей *Apis cerana*. Дана характеристика ее биологических особенностей. Проанализировано устройство гнезда этой пчелы и устройство сотов. Приведен ботанический состав меда, собранного из гнезд *Apis cerana*.

Ключевые слова: *Apis cerana*, биологические особенности, ботанический состав меда строение гнезда.

APIS CERANA IS A NATIVE BEE OF THE SOUTH OF THE FAR EAST OF RUSSIA

Pulinets E. K., Dyakov A. V.

Primorsky State Agricultural Academy, Ussuriysk, Russia

Abstract. The article provides a description of the distinctive species features of *Apis cerana*. The characteristic of its biological features is given. The structure of the nest of this bee and the structure of combs are analyzed. The botanical composition of honey collected from *Apis cerana* nests is given.

Key words: *Apis cerana*, biological features, botanical composition of honey nest structure.