

Литература. 1. Бундина, Л. А. Зараженность лошадей Московского ипподрома гельминтозами и эффективность некоторых антгельминтных препаратов / Л. А. Бундина // *Ветеринария*. - 2002. - №7. - С. 35-38. 2. Смирнов, Д. А. Паразитофауна и меры борьбы с основными гельминтозами лошадей в Центральном районе Нечерноземной зоны РФ / Д. А. Смирнов // *Дисс. ... канд. вет. наук*. - Иваново, 2003.-26 с. 3. Ятусевич, А. И. Трихонематидозы лошадей в Республике Беларусь и меры борьбы с ними / А. И. Ятусевич, М. П. Синяков // *Вет.медицина Беларуси*. - 2004. -№ 6/1. - С. 31-33. 4. Андреев, М. В. Паразитофауна лошадей в Республике Саха и меры борьбы с ними / М. В. Андреев, М. Ш. Акбаев // *Ветеринария*. - 2001. - № 11. - С. 38-41. 5. Кадыров, Н. Т. Эпизоотология важнейших гельминтозов лошадей в условиях северного Казахстана / Н. Т. Кадыров, С. А. Аубактров // *Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана*. - 1979. - № 12. - С. 153-155. 6. Кадыров, Н.Т. Опыт борьбы с паразитами лошадей / Н. Т. Кадыров, С. А. Аубактров, Б. К. Ибраев // *Ветеринария*. - 1991. - № 10. - С. 42-44. 7. Кадыров, Н. Т. Эффективность антипаразитарных препаратов при паразитозах лошадей / Н. Т. Кадыров [и др.] // *Ветеринария*. - 1997. - № 10. - С. 37-39.

УДК 578.522

ИНФИЦИРОВАНИЕ ПЛЕМЕННЫХ ПАСЕК ПЧЕЛ *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L. И *APIS MELLIFERA CAUCASICA* РНК-СОДЕРЖАЩИМИ ВИРУСАМИ ПРИ ИНФЕСТАЦИИ КЛЕЩОМ *VARROA DESTRUCTOR*

^а Калашников А.Е., ^б Бурмистрова Л.А., ^в Королев А.В.,
****Ханбекова Е.М., Гладырь Е.А.

^аВсероссийский институт животноводства имени Академика Л.К. Эрнста, г. Дубровицы, Россия,

^бИнститут пчеловодства, г. Рыбное, Рязанская область, Россия,

^вМосковская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, г. Москва, Россия,

****НПО «Золотой улей», г. Баку, Азербайджан

Введение. На территории Беларуси распространены темные лесные пчелы нескольких подвидов, карпатские пчелы и пчелы импортируемых коммерческих южных пород (кавказской, карники и карпатской), производимых в России. Одна из главных причин массовой гибели пчел в настоящее время (и в последние 50-60 лет) - это клещевая инвазия. Проблемы с обнаружением опасных для пчеловодства ретровирусов пчел давно известны в США и Европе, а также в России и актуальны для Беларуси, в т. ч. вследствие распространения клеща *Varroa destructor*.

Применение биоинформационных технологий и технологий анализа необходимы для создания диагностикумов нового поколения. Создание таких тестов требует как нового подхода к расчетам их се-

лективной части, так и подбора реагентов. Представленный пример позволяет пойти более эффективным путем при выявлении ретровирусов и анализе их геномов.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена на базе Лаборатории молекулярной генетики животных ВИЖ (N=329 особей взрослых пчел инфицированных пасек с клещевым поражением Рязанской области и Республики Азербайджан). Выделение ДНК из взрослых пчел производили при помощи набора ДНК сорб-В (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), реакцию обратной транскрипции - при помощи набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) с количеством фермента 50 ед/реакция. Концентрацию РНК и ДНК измеряли на спектрофотометре Amersham Bioscience (Швеция). Амплификацию осуществляли при помощи qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) (New England Biolabs, Англия). Детекцию флуоресценции SYBR осуществляли на амплификаторе CFXtouch (Bio-Rad, США). Среднее значение относительного количества РНК-вируса и провирусной ДНК рассчитывали по (K.J. Livak, T.D. Schmittgen, 2001).

Результаты исследований. Для эффективной борьбы с инфекцией необходимо разрабатывать современные методы диагностики. В настоящее время активно развиваются информационные технологии, которые позволяют решать ряд важных задач в области генетики: анализе гомологии известных нуклеотидных и белковых последовательностей, выявлении статичных и областей высокой кинетики мутаций, проведения термодинамического и факторного анализа, позволяющих подбирать специфические олигонуклеотиды и флуоресцентные зонды к заданным областям генома вирусов.

Выбранная нами модель исследования представляла вирусы пчел KBV (*Kashmir bee virus*, Кашмирский вирус), ABPV (*Acute bee paralysis virus*, вирус острого паралича), CBPV (*Chronic bee paralysis virus*, вирус хронического паралича), DWV (*Deformed bee virus*, вирус деформации крыла), SBV (*Sacbrood bee virus*, вирус мешотчатого расплода), IAPV (*Israel acute paralysis virus*, вирус Израильского паралича), BQCV (*Black queen cell virus*, вирус черных маточников), SPV (*Slow paralysis virus*, вирус медленного паралича), заболевания, которыми вызывает высококонтагиозную инфекцию, протекающую в скрытой форме (O Berenuy *et al*, 2006, J.R. DeMiranda, E. Genersch, 2010).

Проведен масштабный метагеномный поиск и анализ нуклеотидных последовательностей вирусов (N>650 НП) в программе Ugene 1.11.3i, с использованием алгоритмов ClustalXii и Muscleii. Отличие представленного метода в том, что нуклеотидные последовательности фильтровали согласно максимальному различию по географическому происхождению изолятов, а также по максимальной генетической подразделенности. Для каждого вируса были определены области с низкой степенью кинетики мутаций, для которых был осуществлен дизайн праймеров с использованием

алгоритма Primer 3ii, образование вторичных структур и димеров проверяли при помощи UnaFoldii. Для статичных областей осуществлен дизайн праймеров с использованием алгоритма Primer 3iii. Образование вторичных структур и димеров проверены при помощи UnaFoldi.

Специфичность вариантов олигонуклеотидов проверена по разработанной нами системе подсчета очков совпадений в системе BLAST. Для синтеза и сборки ПЦР выбраны лучшие из представленных 35 вариантов. Аналитическая чувствительность тестов представляла разведение до 1024 раз (конечная концентрация 0,07 мкг/мкл). Концентрация образцов ДНК после выделения была 196-1544, а РНК 38-1344 мкг/мл.

Тесты оказались эффективнее разработанных ранее для выявления вирусов пчел, которые выявляли от 20-85% положительных особей (M. Berenyi *et al*, 2006, А.Е. Калашников и др., 2014, И.Г. Удина и др., 2010). Средняя частота встречаемости провирусной ДНК и РНК составила >75 и >80% соответственно.

Распределение количества НК в семьях пчел было отличным для образцов провирусной ДНК и РНК в достаточно широком диапазоне от $6.41 \pm 2.23 \cdot 10^{-6}$ до 1.27 ± 0.63 отн. единиц. Степень встраивания РНК-вируса в геномную ДНК хозяина составляет соотношение с геномной ДНК 10^{-3} - 10^{-5} и минимально, по сравнению с концентрациями РНК в тканях пчелы тех же особей.

Заключение. Таким образом, в настоящем исследовании проверен новый универсальный способ реализации метагеномного анализа существующих последовательностей ретровирусов пчел в виде единой базы данных с выявлением областей низкой кинетики мутаций, по которым были подобраны специфические праймеры для выявления соответствующих вирусов. Показана высокая эффективность созданных тестов, а также проведено модельное исследование нативных семей пчел на пасеках с количественным определением содержания вируса, которое было большим в случае выявления активной формы вируса.

Литература. 1. Berenyi, O. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries / O. Berenyi [et al.]. // *Appl. Envir. Microbiology*. - 2006. - V. 72. - N. 4. - P. 2414-2420. 2. DeMiranda, J.R. Deformed wing virus / J. R. DeMiranda, E. Genersch // *J. Intertebr. Patology*. - 2010. - V. 103. - N. 1. - P. 48-61. 3. Livak, K. J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR data / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. - 2001. - V. 25. - P. 402-408. 4. Калашников А. Е. Эпидемиологическое состояние некоторых пасек при инфицировании семей пчел РНК-содержащими вирусами / А. Е. Калашников, И. Г. Удина // *VetPharma. Pharm Animals*. - 2014. - V. 1. - С. 80-84. 5. Удина, И.Г. Обнаружение вируса деформации крыла у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на пасеках в Московской области методом ОТ-ПЦР / И. Г. Удина [и др.] // *Вопросы вирусологии*. - 2010. - №. 5. - С. 37-40.