

ЛИТЕРАТУРА

1. Фотіна, Т.І. Кампілобактеріоз птиці: монографія / Т.І. Фотіна, А.В. Березовський, О.І. Касяненко, Ю.Є. Дворська // Суми: СНАУ, 2010. – 140 с.
2. Інструкція з профілактики та ліквідації кампілобактеріозу птиці: № 1192/19930. – К., 14 жовтня 2011 року.
3. Профилактика кампилобактериоза среди людей: Санитарно-эпидемиологические правила: СП 3.1.7. 2816 – 10. – Москва: постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации, 2010.
4. Prevalence and numbers of *Campylobacter* on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 U.S. processing plants / M.E. Berrang [et. al.]. // *Journal of Food Protection*. – 2007. – Vol. 70. – P. 1556–1560.
5. Волинець Л.К. Харчові токсикоінфекції / Л.К. Волинець. – К.: Ветеринарна медицина. – 2003. – № 4. – С. 43–44.
6. Инструкция по клинической и лабораторной диагностике кампилобактериоза. – Вологда, 1991.

УДК 619:579.25:616-078:638.15

Черник М.И., кандидат ветеринарных наук
 Радюш И.С., кандидат ветеринарных наук
 Тяпша Ю.И., кандидат ветеринарных наук
 Дубаневич О.В., старший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск

ВЫДЕЛЕНИЕ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ДЕФОРМАЦИИ КРЫЛА ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*APIS MELLIFERA* L.) В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Резюме

Сложность диагностики вирусных инфекций пчёл обусловлена отсутствием культур клеток тканей пчелы медоносной, коллекций штаммов вирусов, патогенных для медоносных пчел, и тест-систем для молекулярно-генетической идентификации.

Из всех вирусов обнаруженных у медоносной пчелы *Apis mellifera* L., наибольшее распространение приобрел вирус деформации крыла. Впервые в Республике Беларусь сотрудниками РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского» выделен вирус деформации крыла из тканей пчелы медоносной с использованием первично-трипсинизированной культуры клеток фибробластов эмбрионов кур и проведена его молекулярно-генетическая идентификация.

Summary

The complexity of diagnosing viral infections of bees is due to the lack of cultures of honeybee cells, collections of strains of viruses pathogenic for honeybees and test systems for molecular genetic identification.

Of all the viruses found in the honeybee *Apis mellifera* L., the deformed wing virus has become the most common. For the first time in the Republic of Belarus, employees of the RUE «Institute of Experimental Veterinary Medicine named S.N. Vysheselsky» isolated a deformed wing virus from the tissues of a honeybee using a primary trypsinized culture of chicken embryo fibroblast cells and carried out its molecular genetic identification.

Поступила в редакцию 01.11.2018 г.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем пчеловодства всего мира в настоящее время являются вирусные заболевания пчёл. Из обнаруженных у медоносной пчелы *Apis mellif-*

era L. двадцати РНК-содержащих вирусов, которые в основном относятся к семействам *Dicistroviridae*, *Iflaviridae* и *Nodaviridae*, наибольшее распространение приобрел вирус деформации крыла – ВДК (defor-

med wing virus, DWV) [7].

Болезнь деформации крыла пчёл характеризуется появлением пчёл с уродливыми крыльями, одновременной гибелью куколок и молодых медоносных пчёл. Возбудитель болезни деформации крыла пчёл – довольно нестабильный икосаэдрический вирус диаметром 30 нм семейства *Iflaviridae*. В соответствии с *Baltimore Classification of Viruses*, ВДК относят к IV группе, или однокитевым РНК-вирусам, которые содержат одну одноцепочечную молекулу положительной (+) РНК [11].

Вирус культивируется в культурах клеток медоносной пчелы. Способность вируса деформации крыла пчёл к репродукции в культурах клеток млекопитающих и птиц изучена недостаточно.

Основными органами-мишенями ВДК служат репродуктивные органы и органы пищеварения пчел. Репликация вирусной РНК обнаружена в образцах биоматериала крыльев, головы, груди, ног, кишечника, в гемолимфе пчел. Вирусную РНК часто находят в телах нейронов, не исключают ее присутствия в глиальных клетках нервной ткани пчел. Сильную специфическую реакцию на ВДК регистрировали в цитоплазме и цитоплазматической мембране большинства клеток жирового тела пчелы [12].

ВДК возможно обнаружить на всех эмбриональных стадиях развития пчелы. В пчелиных семьях с явными признаками заболевания отмечают 100 % инфицированность взрослых рабочих пчел, 95 % – куколок, 80 % – личинок, 47 % – половозрелых трутней. Такая вариабельность вируса на разных стадиях развития пчелы, возможно, объясняется неодинаковой способностью к сопротивлению вирусной инфекции [12].

Болезнь деформации крыла пчёл часто протекает в латентной или субклинической форме. Появление клинических признаков у инфицированных куколок приводит либо к их гибели, либо к появлению взрослых особей с деформированными крыльями, укороченными брюшками, отсутствием пигментации. Такие пчелы становятся нежизнеспособными и, как правило, погибают. Пчелиные семьи, инфициро-

ванные ВДК, ослаблены из-за сильного сокращения продолжительности жизни рабочих пчел и гибели куколок. В погибших семьях обнаруживают большое количество рабочих пчел с деформированными крыльями. Количество рабочих пчел в улье с видимыми признаками ВДК может служить маркером последующей гибели семьи [1, 2, 7, 8, 13].

Известно, что ВДК отдалённо связан с пикорнавирусами человека [11], генетически тесно связан с вирусом *Varroa destructor-1* (VDV-1) [14]. Египетский пчелиный вирус (EBV) серологически связан с ВДК, однако он не вызывает известных симптомов у взрослых пчёл, куколок или личинок [14]. Отмечена высокая степень сходства ВДК и вируса, изолированного в Японии (*Kakugo*-вирус), именно этот изолят получил название «вирус деформации крыла» [13].

Несмотря на эволюционную близость с какуго вирусом (*Kakugo virus*), ВДК отличается от него по вирулентности, тропизму, клиническим проявлениям, географическому распределению.

Идентичность нуклеотидных последовательностей генома ВДК из разных географических районов составляет 98–99 % [9].

Согласно последним данным основным переносчиком ВДК служит клещ *Varroa destructor* [13], тесная ассоциация с клещом *V. destructor* способствовала его распространению в глобальных масштабах [7, 13].

Исследованиями разных коллективов ученых подтверждена большая распространенность ВДК у *Apis mellifera L.* в европейских странах. В Австрии и Франции при обследовании пасек ВДК найден в 91 и 97 % случаев, в Дании вирус выявлен на 57 % пасек; в Чехии – на 31 % [15]. Отмечено доминирование ВДК в большинстве регионов России и в Республике Азербайджан [7]. По данным Масленникова В.И. и др. (2018 г.) на территории Северного, Центрального и Южного федеральных округов европейской территории Российской Федерации выявлена тотальная (100 %) инфицированность пчёл вирусом

деформации крыла [5].

Некоторыми авторами отмечены сезонные различия в распространенности ВДК. Так, весной, летом, осенью инфицированность вирусом взрослых пчел составила 56, 66, 85 %, куколок – 16, 38, 54 % соответственно [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», в отделе болезней птиц, пчел и физико-химических исследований и в отделе молекулярной биологии.

Для выделения DWV мы отбирали живых взрослых рабочих медоносных пчел и куколок, которые имели клинические признаки болезни (рисунки 1, 2).



Рисунок 1. – Пчела с деформированными крыльями. Фото. Оригинал



Рисунок 2. – Пораженная вирусом деформации крыла куколка пчелы. Фото. Оригинал

Учитывая тот факт, что геномная РНК DWV в довольно большом количестве выявлена методом гибридизации *in-situ* в зрительных и усиковых нейронах мозга [2, 6, 8, 12], в крыльях, груди, ногах, гемолимфе и жировом теле, а также в репродуктивных

органах и органах пищеварения медоносных пчел [1], в качестве источника вирусного материала мы использовали голову, грудь, ноги и крылья пчел с клиническим проявлением болезни (рисунок 3).

С целью предотвращения бактериального обсеменения материала микроорганизмами находящимися в кишечнике пчел, а также для предотвращения воздействия ферментов на культуру клеток брюшко пораженных пчел удаляли асептически.



Рисунок 3. – Фрагменты тела пчел, используемые для выделения вируса. Фото. Оригинал

Исследуемый материал в течение 1 часа выдерживали в растворе Хенкса с добавлением антибиотиков в количестве 1000 ЕД бензилпенициллина натриевой соли и стрептомицина на 1 см³ среды, после чего промывали стерильной дистиллированной водой.

Гомогенизацию материала проводили механическим способом с добавлением питательной среды Игла и ГЛА, в соотношении 1:1 из расчета 1 см³ среды на четыре образца тканей насекомых или в соотношении 120:1 (по весу). Полученный гомогенизированный материал фильтровали через стерильный марлевый фильтр и использовали в дальнейшей работе в качестве нативного материала.

Полученный нативный материал разводили питательной средой Игла и ГЛА в соотношении 1:1 с содержанием 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) в 2 и 20 раз и использовали для заражения мо-

нослоя первично-трипсинизированной культуры фибробластов эмбрионов кур (ФЭК).

В качестве контроля, позволяющего отследить реакцию клеточной культуры на тканевой материал пчел, аналогичным образом готовили материал от заведомо здоровых пчел, отобранных из благополучной по данному заболеванию пасеки. Нативный материал разводили в 2 раза питательной средой Игла и ГЛА в соотношении 1:1 с содержанием 2 % ЭТС и использовали для заражения монослоя первично-трипсинизированной культуры ФЭК.

Получение первично-трипсинизированной культуры ФЭК осуществляли по общепринятой методике [3; 4, с. 100–101]. Для этого использовали развивающиеся куриные эмбрионы в возрасте 10 суток.

Культуральные матрасы со сформировавшимся полным монослоем ФЭК использовали для заражения вирусосодержащим материалом. Для этого сливали питательную среду, монослой клеток дважды промывали раствором Хенкса. В три матраса с культурой ФЭК вносили 1 см³ разведенного в 2 раза вирусосодержащего материала (группа № 1), в три матраса – 1 см³ вирусосодержащего материала, разведенного в 20 раз (группа № 2). Кроме этого, в три культуральных матраса с культурой ФЭК вносили 1 см³ разведенного в 2 раза материала, полученного от заведомо здоровых пчел (контроль) и в три матраса – 1 см³ поддерживающей питательной среды с содержанием 2 % ЭТС (контроль культуры клеток). После часа экспозиции в шейкер инкубаторе (Environmental Shaker-Incubator ES-20 (BIOSAN, EC)) (плюс 37 °C, 70 RPM) во все матрасы добавляли по 9 см³ поддерживающей питательной среды с содержанием 2 % ЭТС. Таким образом конечное разведение вирусосодержащего материала в зараженных матрасах группы № 1 составило 1:20, в опытной группе № 2 – 1:200, контроль материала от заведомо здоровых пчел – 1:20.

Культуральные матрасы помещали в термостат при температуре плюс 37 °C и ежедневно просматривали их под микроскопом (Eclipse TS 100F/TS 100F LED (Ni-

son, Япония)).

При поражении не менее 80 % монослоя зараженные матрасы подвергали однократному замораживанию – оттаиванию, после чего собирали вирусосодержащую жидкость и осветляли центрифугированием при 770 g в течение 30 мин.

Контроль стерильности исследуемого материала проводили, используя следующие питательные среды: МПБ, МПА, МППБ и среду Сабуро.

Идентификацию DWV проводили, используя полимеразно-цепную реакцию (ПЦР).

Для обнаружения вируса деформации крыла пчел использовали следующее оборудование и материалы:

а) приборы и расходные материалы: ламинар, бытовой холодильник, термостат, микротермостат «BIOSAN-CH100» (Латвия), амплификатор «С 1000 Thermal Cycler», BIO-RAD (США), центрифуги, паровые автоклавы, сухожаровые шкафы, микроцентрифуга высокоскоростная Jouan (Франция) (14000 об/мин), комплект автоматических пипеток «SOCOREX» (Швейцария) 0,1–2 мм³, 0,5–10 мм³, 20–200 мм³, 100–1000 мм³, 1–10 см³ и наконечники к ним (с фильтрами и без фильтров), пробирки типа «эппендорф» вместимостью 0,5 и 1,5 см³, вортекс «BIOSAN» (Латвия), пробирки для ПЦР 0,2 см³ для прибора «С 1000 Thermal Cycler», система для электрофореза «Consort», (Бельгия), Gel Doc XR и программа imageLab Software, BIO-RAD (США), весы RADWAG AS 220/X (Польша), система подготовки воды «Crystal B», ADRONA (Латвия), фильтрационная установка, весы аналитические.

б) реактивы: 5x ПЦР буфер для обратной транскриптазы (ГНУ «Институт биоорганической химии НАНБ»), рибонуклеазный ингибитор (Fermentas, Литва), Tag-полимераза с PCR буфером 10x (Праймтех), обратная транскриптаза (Fermentas, Литва), олигонуклеотиды (F-DWV, R-DWV), набор реагентов Supermix SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-RAD), 10x TE-буфер pH 8,0 (SIGMA), маркер молекулярного веса «GeneRuler 50

bp Ladder» (Fermentas, Литва), смесь дезокси-нуклеозидтрифосфатов (10 мМ) (Fermentas, Литва), агароза (Helicon, Россия), бромистый этидий (SIGMA, США), буфер для нанесения проб; стерильная деионизированная вода.

Для обнаружения генома вируса деформации крыла пчел была подобрана пара праймеров. Подбор праймеров осуществляли по базам данных национального центра биотехнологической информации – GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Множественное нуклеотидное выравнивание проводили с помощью программы AlignX. Специфичность подобранных праймеров проверяли программой BLAST. Были подобраны специфичные праймеры к гену полипротеина вируса деформации крыла пчел. Ориентировочные температуры плавления праймеров рассчитывали по формуле (1).

$$Tm = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T), \quad (1)$$

где

Tm – температура плавления;

G – гуанин;

C – цитозин;

A – аденин;

T – тимин.

Выделение РНК проводили российским набором «АмплиПрайм РИБО-сорб» согласно инструкции по его применению.

Амплификацию проводили по следующей схеме: 1 цикл: 3 мин – 95 °С; 30 циклов: 0,3 мин – 95 °С; 0,3 мин – 55 °С; 0,3 мин – 72 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Формирование плотного монослоя ФЭК происходило на вторые сутки после высева клеток в матрасы (рисунок 4).

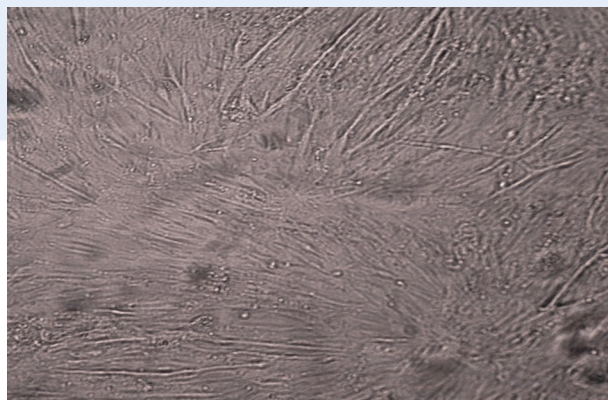


Рисунок 4. – Первично-трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (×100) Фото. Оригинал

Первые признаки предположительно ЦПД вируса наблюдались через 48–52 часа с момента заражения в виде округления клеток и появления в их цитоплазме мелкой зернистости (поражение монослоя составило не более 10 %), питательная среда оставалась прозрачной, ее цвет соответствовал цвету среды в контрольных матрасах – красный с желтоватым оттенком. Через 72 часа после заражения клеточного монослоя признаки отслоения клеток от субстрата отсутствовали, питательная среда во всех матрасах оставалась прозрачной, красного цвета с желтоватым оттенком, количество округлых клеток с мелкой зернисто-

стью в их цитоплазме составило около 20 %. Через 80 часов после заражения культуры ФЭК культуральная питательная среда в зараженных матрасах сохраняла свою прозрачность, но приобретала оттенок жженого сахара; в матрасах, в которые вносили материал от здоровых пчел, также наблюдали изменение цвета питательной среды, но менее интенсивно. В контрольных матрасах (контроль культуры клеток) питательная среда была прозрачная, красно-желтого цвета (рисунок 5). При микроскопическом исследовании монослоя во всех зараженных матрасах наблюдали следующие изменения: в монослое отмечали

небольшие «стерильные» участки (участки без клеток), которые были окружены клетками округлой формы (поражение монослоя составляло 30–40 %) (рисунок 6), клетки монослоя (80 %) содержали в своей цитоплазме мелкую зернистость.

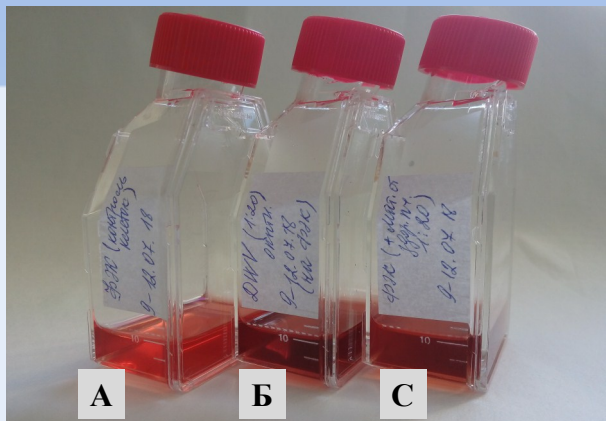


Рисунок 5. – Изменение цвета питательной среды (рН 7,2–7,4):
А – матрас с культурой ФЭК (контроль клеток); В – матрас, зараженный DWV с конечной концентрацией вируссодержащего материала 1:20;
С – матрас с культурой клеток, содержащий материал от заведомо здоровых пчел с конечной концентрацией 1:20

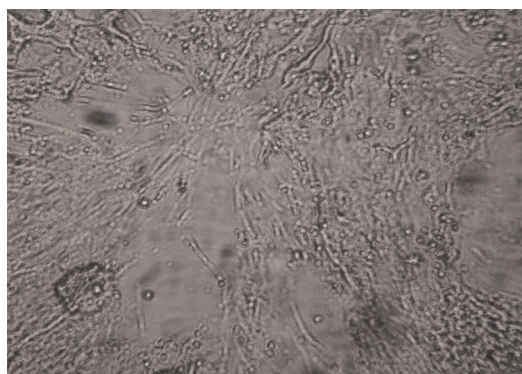


Рисунок 6. – Первично-трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (опытные матрасы) (×100) Фото. Оригинал

Через 96 часов с момента заражения наблюдалось поражение монослоя не менее 80 % с большими очагами отслоения клеток, в некоторых местах в виде пленочек, которые одним краем были прикреплены к субстрату (рисунок 7). Зараженные матрасы

подвергали замораживанию при температуре минус 20 °С.

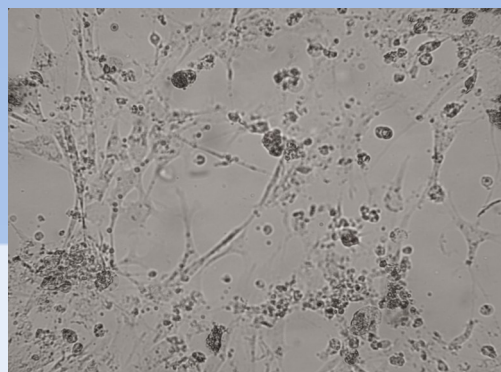


Рисунок 7. – Первично-трипсинизированная культура клеток фибробластов эмбрионов кур (опытные матрасы) (×100). Фото. Оригинал

В контрольных матрасах монослой оставался полным и ровным, без признаков клеточной дегенерации, питательная среда сохраняла свою прозрачность, однако, как уже отмечалось выше, в контрольных матрасах, в которые вносили материал от заведомо здоровых пчел, наблюдалось изменение цвета питательной среды.

Полученный в результате культивирования в первично-трипсинизированной культуре ФЭК материал признан стерильным: в течение 10 суток после посева исследуемого материала на питательные среды МПА, МПБ, МППБ (температура инкубации плюс 37 °С), а также на среду Сабу-ро (плюс (22±2) °С) роста микроорганизмов не наблюдалось.

Для идентификации выделенного вирусного материала методом ПЦР были подобраны праймеры к участку генома DWV, кодирующего структурный полипротеин и фланкирующие участок 2338–2495 штамма KY909333 [10] длиной 158 п.н. (рисунки 8, 9).

Длина прямого и обратного праймеров составила 21 нуклеотид, температура плавления плюс 62 °С, GC – содержание – 47,6 %.

При подборе праймеров учитывались следующие критерии: они не должны образовывать шпилек и димеров, не должны быть комплиментарны к вирусам и бактериям, циркулирующим у пчел.

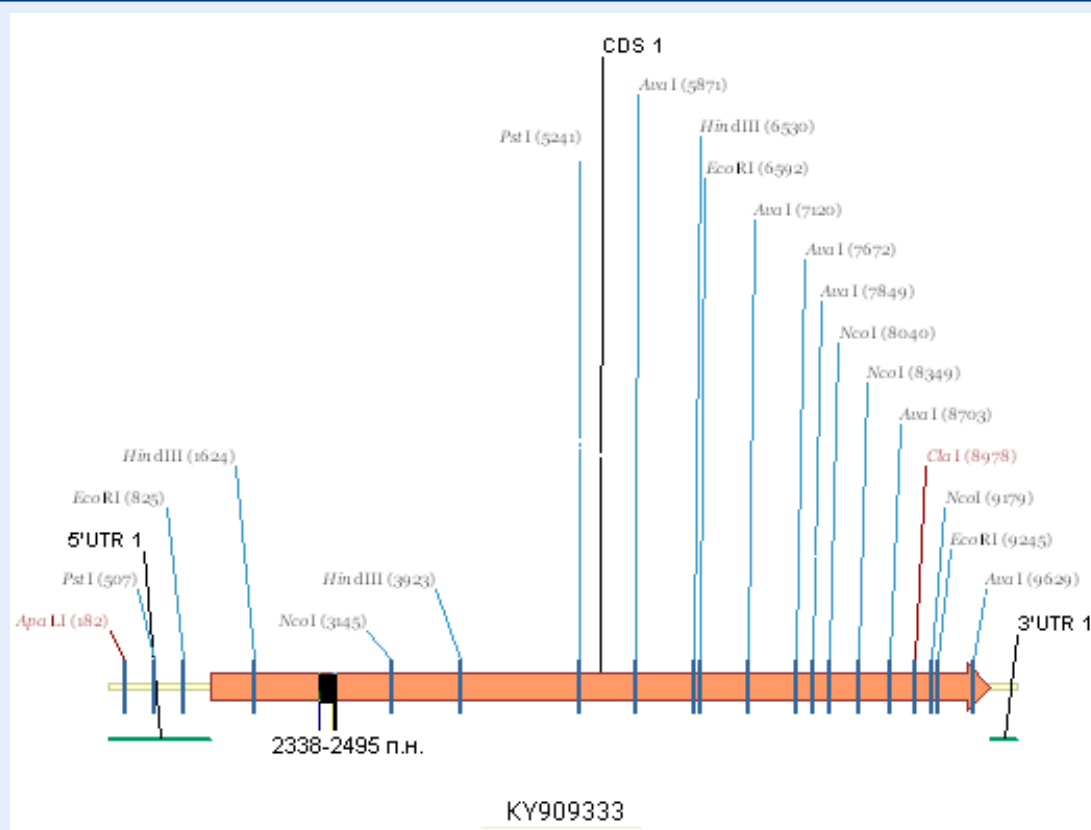


Рисунок 8. – Фрагмент генома изолята вируса деформации крыла, кодирующего структурный полипротеин, в позиции 2338-2495 п.н.

```

2301  CCATATAAGC ATGTTTATCC ATTTTACCG ACAAGAAATTG TGCCAGATTG GACTACTGGC ATTTTAGATA TGGGTGCTTT GAACATTCGT GTAATTGCTC
      GGTATATTCC TACAATAAGG TAAAAATGGC TGTTCCTAAC ACGGTCTAAC CTGATGACCG TAAAAATCTAT ACCCAGGAAA CTGTGAAGCA CATTAACGAG
2401  CCTTACGGAT GAGTGCCTACT GGTGCAACTA CCTGTAATGT CGTCGTGTTT ATTAATTAAT AAACAGCGCA GTTTACAGGG ACTTCTTCTG GTAAGTTTAA
      GGAATGCCTA CTCACGATGA CCACGTTGAT GGACATTACA GCAGCAGAAA TAAATTAATT TATTGTCGCT CAAATGTCCC TGAAGAAGAC CATTCAAAAAT
  
```

Рисунок 9. – Фрагмент генома штамма KY909333 длиной 158 п.н.

Подобранные последовательности праймеров дополнительно тестировали на специфичность в программе BLAST с последовательностями всех имеющихся полных геномов вирусов деформации крыла пчел (рисунки 10, 11) и проводили нуклеотидное выравнивание при помощи программы Align (рисунок 12).

Подобранные праймеры комплементарны к нуклеотидным последовательностям штаммов вирусов деформации крыла пчел (не менее чем к 50 штаммам), представленных в базе GeneBank – Национального института здоровья США EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории NSBI – Национального центра биотехнологической информации США.

Критерием точного и специфичного

обнаружения нуклеиновой кислоты искомого вируса считали, если олигонуклеотид на всей своей протяженности полностью комплементарен искомой части генома и не имеет ошибок, при этом показатели идентичности (Ident) на всей протяженности запроса (Query cover) программы BLAST праймера равны 100 %.

На рисунках 10 и 11 видна 100 % идентичность праймеров (Ident) на всей протяженности (Query cover). Также по результатам множественного выравнивания 18-ти нуклеотидных последовательностей, наиболее отличных между собой, с помощью программы Align мы подтвердили общие видоспецифические участки подобранных праймеров.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Deformed wing virus strain Liaoning-1, complete genome	42.1	204	100%	2e-06	100%	MF770715.1
☐	Deformed wing virus isolate Vespa crabro DWV PI 2016, complete genome	42.1	263	100%	2e-06	100%	KY909333.1
☐	Deformed wing virus isolate 85-DWV, complete genome	42.1	281	100%	2e-06	100%	KC373899.1
☐	Deformed wing virus strain Korea-2, complete genome	42.1	296	100%	2e-06	100%	JX878305.1
☐	Deformed wing virus strain Korea-1, complete genome	42.1	234	100%	2e-06	100%	JX878304.1
☐	Deformed wing virus strain SJ structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878286.1
☐	Deformed wing virus strain GR structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878285.1
☐	Deformed wing virus strain DG structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878284.1
☐	Deformed wing virus strain HS1 structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878281.1
☐	Deformed wing virus strain GS1 structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878280.1
☐	Deformed wing virus strain CA structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878279.1
☐	Deformed wing virus strain GN structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878277.1
☐	Deformed wing virus strain ES structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878275.1
☐	Deformed wing virus strain NW structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878274.1
☐	Deformed wing virus strain YD structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878273.1
☐	Deformed wing virus strain GW structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	JX878272.1
☐	Deformed wing virus isolate Chilensis A1, complete genome	42.1	234	100%	2e-06	100%	JQ413340.1
☐	Deformed wing virus clone 2kb-3end-No66-DWV polyprotein gene, partial cds	42.1	230	100%	2e-06	100%	HM162356.1
☐	Deformed wing virus clone 5end-6kb-No4-DWV polyprotein gene, partial cds	42.1	208	100%	2e-06	100%	HM162355.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY P1R1+ truncated structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903475.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 142 structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903474.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 126 truncated structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903473.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 120 structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903472.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 105 structural polyprotein-like gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903471.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 63 structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903470.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 61 truncated structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903469.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 20 structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903468.1

Рисунок 10. – Результаты тестирования прямого праймера F-DWV в программе BLAST

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Deformed wing virus strain Liaoning-1, complete genome	42.1	273	100%	2e-06	100%	MF770715.1
☐	Deformed wing virus isolate Vespa crabro DWV PI 2016, complete genome	42.1	257	100%	2e-06	100%	KY909333.1
☐	Deformed wing virus isolate 85-DWV, complete genome	42.1	226	100%	2e-06	100%	KC373899.1
☐	Deformed wing virus isolate DWV4 16.90.1 polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	KC138852.2
☐	Deformed wing virus isolate DWV3 24.51.17 polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	KC138854.1
☐	Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-Acc2 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721547.1
☐	Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-Acc1 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721546.1
☐	Deformed wing virus gene for polyprotein, partial cds, isolate: China-8 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721543.1
☐	Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-7 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721542.1
☐	Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-6 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721541.1
☐	Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-5 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721540.1
☐	Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-4 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721539.1
☐	Deformed wing virus VP3 gene for capsid protein VP3, partial cds, isolate: China-3 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721538.1
☐	Deformed wing virus gene for polyprotein, partial cds, isolate: China-2 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721537.1
☐	Deformed wing virus gene for polyprotein, partial cds, isolate: China-1 dwv	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	AB721536.1
☐	Deformed wing virus clone 2kb-3end-No66-DWV polyprotein gene, partial cds	42.1	195	100%	2e-06	100%	HM162356.1
☐	Deformed wing virus clone 5end-6kb-No4-DWV polyprotein gene, partial cds	42.1	165	100%	2e-06	100%	HM162355.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 126 truncated structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903473.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 120 structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903472.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 105 structural polyprotein-like gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903471.1
☐	Deformed wing virus isolate R4LY 20 structural polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GU903468.1
☐	Deformed wing virus isolate Warwick-2009 polyprotein gene, complete cds	42.1	228	100%	2e-06	100%	GU109335.1
☐	Deformed wing virus isolate AMDWV1-Russia polyprotein gene, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	GQ422786.1
☐	Deformed wing virus isolate 12-1D nonfunctional polyprotein gene, partial sequence	42.1	56.5	100%	2e-06	100%	EU779939.1
☐	Deformed wing virus isolate 7D nonfunctional polyprotein gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	EU779938.1
☐	Deformed wing virus isolate CANADA-2 polyprotein genes, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	DQ224311.2
☐	Deformed wing virus isolate CANADA-1 polyprotein genes, partial cds	42.1	42.1	100%	2e-06	100%	DQ224310.2

Рисунок 11 – Результаты тестирования обратного праймера в R-DWV в программе BLAST

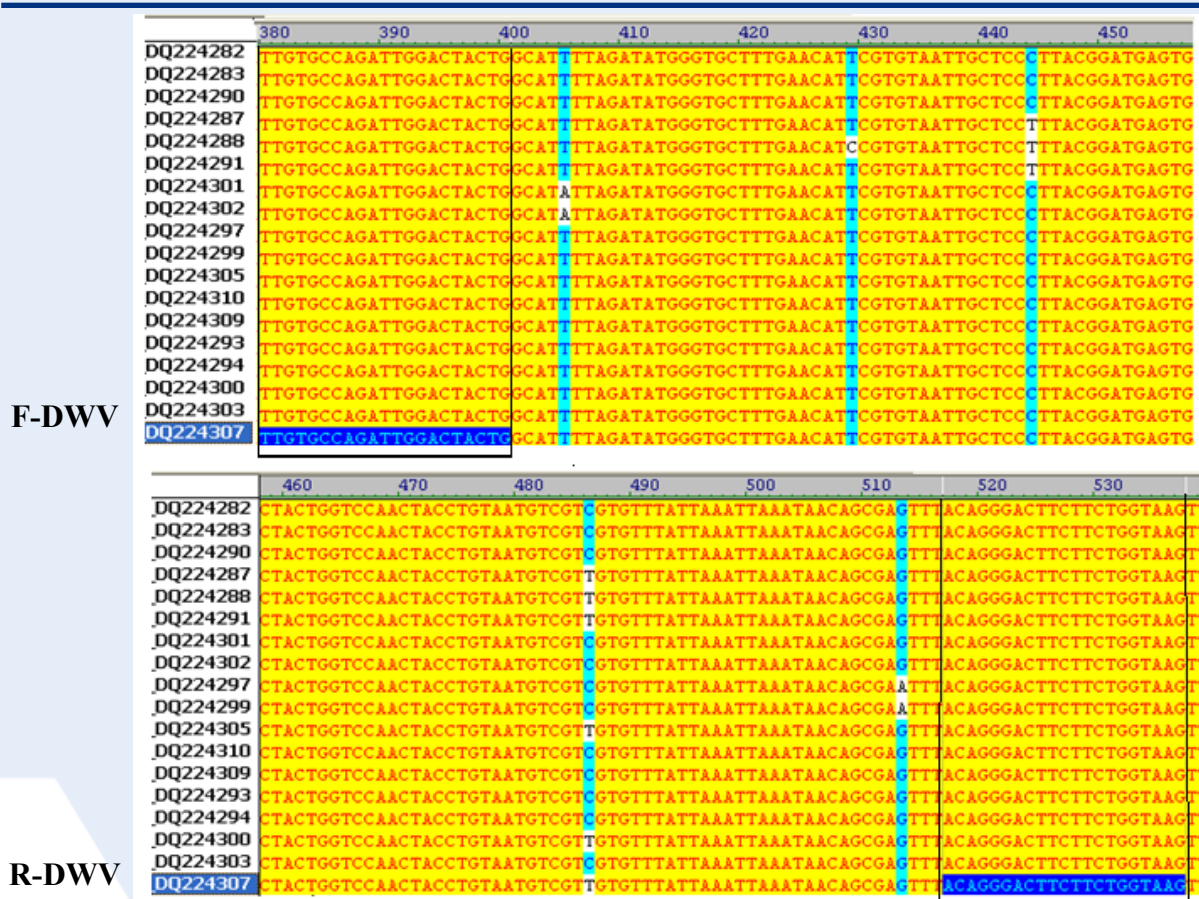


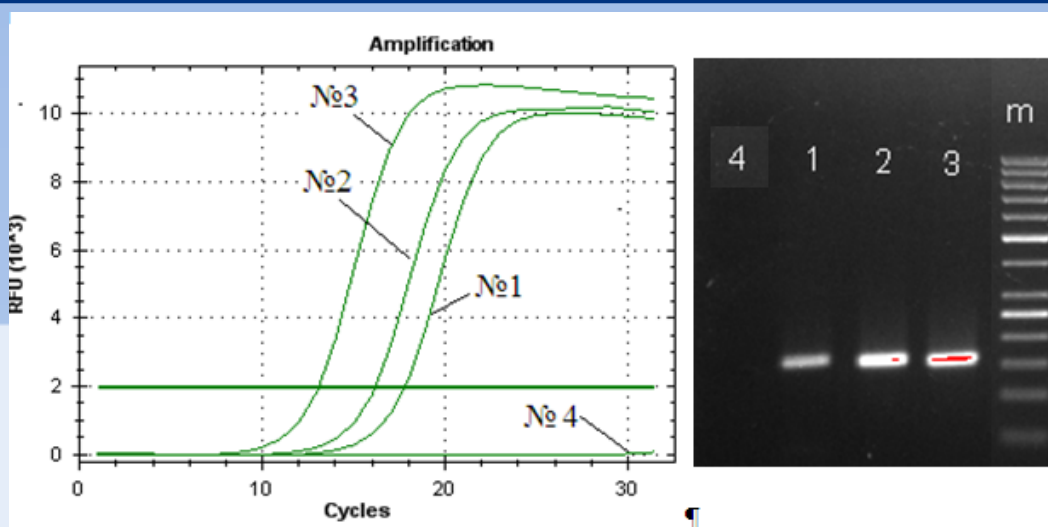
Рисунок 12. – Мультиплексный анализ прямого F-DWV и обратного R-DWV праймеров с помощью программы Align

Методом ПЦР провели исследование проб вирусосодержащего материала, полученного от пчел с признаками вирусной деформации крыльев до культивирования в культуре фибробластов развивающихся куриных эмбрионов (нативный материал), а также исследование проб вирусосодержащего материала после культивирования в культуре куриных фибробластов (группа № 1 и группа № 2).

В пробе № 1 флуоресцентный сигнал пересекал черту фонового уровня на 17,75 цикле, № 2 – 16,4 цикле, № 3 – 13,06 цикле. На рисунке 13 видна положительная динамика накопления вируса в культуре фибробластов из развивающихся куриных эмбрионов. Так, по сравнению с вирусным материалом, полученным непосредственно от пчел, в вирусном материале после культивирования в культуре фибробластов куриных эмбрионов наблюдалось увеличение концентрации вируса в 1,9 и 7,4 раза (зараженные матрасы группы № 1 и № 2 со-

ответственно). Это может говорить об успешной изоляции вируса в данной культуре клеток.

В дальнейшем наши исследования будут направлены на адаптацию изолята вируса деформации крыла пчел к культуре фибробластов из развивающихся эмбрионов кур, отработку методов определения титра вируса с использованием данной системы культивирования, изучение его биологических и физико-химических свойств с последующим депонированием штамма вируса в коллекции культур микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Полученный штамм DWV будет использован как стандарт для положительного контроля, с возможностью контроля вирусной нагрузки у пчел на пчелопасеках, в продуктах и материалах пчеловодства, а также при разработке средств лечения и профилактики вирусной деформации крыла у пчел.



№ 1 – разведение 1:200; № 2 – разведение 1:20; № 3 – нативный материал;
 № 4 – отрицательный контрольный образец

Рисунок 13. – Обнаружение продуктов амплификации проб исследуемых методом ПЦР для обнаружения РНК-вируса деформации крыла пчел

ВЫВОДЫ

1. Впервые Республике Беларусь изолирован вирус деформации крыла из тканей медоносной пчелы с использованием гетерологичной системы культивирования – первично-трипсинизированной культуры фибробластов эмбрионов кур.
2. Проведена молекулярно-генетиче-

ская идентификация выделенного вируса.

3. Проведен скрининг нуклеотидных последовательностей гена, структурного полипротеина, различных штаммов вируса деформации крыла пчел. Подобраны специфичные праймеры для детекции в ПЦР генома вируса деформации крыла пчел.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусные заболевания пчёл [Электронный ресурс] / Белорусское сельское хозяйство. – Режим доступа: <http://agriculture.by/articles/zhivotnovodstvo/virusnye-zabolevaniya-pchel>. – Дата доступа: 2.08.2018.
2. Вирусные заболевания пчёл [Электронный ресурс] / Пасека. – Режим доступа: <http://paseka.on.kg/topic/767-virusnie-zabolevaniya-pchel>. – Дата доступа: 2.08.2018.
3. Жавненко, В.М. Практикум по вирусологии: учеб. пособие / В.М. Жавненко, В.Н. Алешикевич, В.И. Науменков; под. ред. В.М. Жавненко. – Минск: Дизайн ПРО, 1998. – 144 с.
4. Ляски, З. Диагностика вирусных болезней животных = Diagnostyka Wirusologiczna Chorob Zwierzat: монография / З. Ляски; пер. с пол. Т.Г. Орлова, Я.С. Ляндесберг; ред. и предисл. В.Н. Сюрин. – М.: Колос, 1980. – 400 с.
5. В.И. Оценка вирусной и клещевой нагрузки на пчелиные семьи в России в связи с массовой гибелью пчел / В.И. Масленникова [и др.] // материалы XXII Международного конгресса «Апиславия»: , 9 – сент. / ЛАБ ПРИНТ. – М., 2018. – С. 67–68.
6. Состояние пчеловодства в России: проблемы и перспективы развития [Электронный ресурс] / Мир пчеловодства. – Режим доступа: www.apimworld.ru. – Дата доступа: 02.08.2018.
7. Спрыгин, А.В. Угрозы распространения вирусных инфекций у пчел (*Apis mellifera* L.) и роль клеща *Varroa Destructor* в развитии патологий / А.В. Спрыгин [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51, № 2. – С. 156–171.
8. De Miranda, J.R. Deformed wing virus / J.R. de Miranda, E. Genersch // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2010. – Vol. 103. – P. 48–61.
9. Berenyi, O. Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus / O. Berenyi [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73, № 11. – P. 3605–3611.

10. Complete Genome Sequence of Deformed Wing Virus Isolated from *Vespa crabro* in Italy [electronic resource] / PubMed. – Mode of access: www.ncbi.nlm.nih.gov. – Date of access: 6.08.2018.
11. Lanzi, G. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.) / G. Lanzi [et al.] // *J. Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 10. – P. 4998–5009.
12. Localization of deformed wing virus (DWV) in the brains of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus / K. S. Shah [et al.] // *Virology Journal.* – 2009. – P. 6–182.
13. Nielsen, S.L. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark / S.L. Nielsen, M. Nicolaisen, P. Kryger // *Apidologie.* – 2008. – Vol. 39. – P. 310–314.
14. Standard methods for virus research in *Apis mellifera* / de Miranda [et al.] // *Journal of Apicultural Research.* – 2013. – Vol. 52, № 4. – 57 p.
15. Tentcheva, D. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructum* populations in France / D. Tentcheva [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, № 12. – P. 7185–7191.
16. Yue, C. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honey bees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*) / C. Yue, E. Genersch // *Journal of General Virology.* – 2005. – Vol. 86. – P. 3419–3424.

УДК 619:579.843.95-078

Красникова Е.Л., научный сотрудник
 Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук
 Мальчик О.В., научный сотрудник
 Стрельченя И.И., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», г. Минск

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ MULTIPLEX ПЦР *PASTEURELLA MULTOCIDA* A, B, D ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СЕРОВАРИАНТОВ ПАСТЕРЕЛЛ

Резюме

В статье представлены данные по определению специфичности и чувствительности multiplex ПЦР тест-системы для диагностики *Pasteurella multocida* серовариантов A, B, D. Проведены исследования по изучению влияния неспецифической ДНК на амплифицируемость специфических продуктов, изучена взаимоспецифичность праймеров для серовариантов A, B, D, а также образование неспецифических фрагментов без и в присутствии специфической ДНК. Установлен порог выявляемости ДНК для каждого сероварианта *Pasteurella multocida* в мультиплекс системе.

Summary

Data on determination of specificity and sensitivity of multiplex PTsR of test system for diagnostics of *Pasteurella multocida* of serovariant of A, B, D are presented in article. Researches on studying of influence of nonspecific DNA on an amplifitsiruyemost of specific products are conducted, the mutually specificity of primers for serovariant of A, B, D and also formation of nespetsifichesy fragments without and in the presence of specific DNA is studied. The threshold of detectability of DNA for each *Pasteurella multocida* serovariant in a multiplex is established to system.

Поступила в редакцию 24.10.2018 г.

ВВЕДЕНИЕ

Пастереллез – заболевание животных и птиц, опасное и для людей, распространенное во всем мире. Экономический ущерб от пастереллеза складывается из потерь от падежа, вынужденного убоя больных животных и затрат на проведение оздо-

ровительных и профилактических мероприятий. Летальность при этой болезни составляет от 10 до 75 %.

Результаты исследований, проводимых в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», и анализ ветеринарной отчетности Главного