

## ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ДЕФОРМАЦИИ КРЫЛА ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*APIS MELLIFERA L.*)

ЧЕРНИК М.И., РАДЮШ И.С., ГУРИНОВИЧ О.Л., КЛИМКО Т.И.

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

*В статье приводятся данные по выделению вируса деформации крыла из тканей пчелы медоносной с использованием первично-трипсинизированной культуры фибробластов эмбрионов кур.*

**Ключевые слова:** вирус деформации крыла, первично-трипсинизированная культура фибробластов эмбрионов кур, выделение вируса.

## FEATURES OF CULTIVATION DEFORMED WING VIRUS OF HONEYBEES (*APIS MELLIFERA L.*)

CHERNIK M.I., RADZIUSH I.S., GURINOVICH O.L., KLIMKO T.I.

RUE “Institute of Experimental Veterinary Medicine named S.N. Vyshelesky”,  
Minsk, Republic of Belarus

*The article presents data on the isolation of the deformed wing virus from the tissues of a honey bee using a primary trypsinized cell culture of fibroblasts of chicken embryos.*

**Keywords:** deformed wing virus, primary trypsinized chicken embryonic fibroblast cell culture, virus isolation.

### Введение.

Из обнаруженных у медоносной пчелы *Apis mellifera L.* более двадцати РНК-содержащих вирусов, которые в основном относятся к семействам *Dicistroviridae*, *Iflaviridae* и *Nodaviridae* наибольшее распространение приобрел вирус деформации крыла – ВДК (deformed wing virus, DWV).

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 однонитевым РНК-вирусам, которые содержат одну одноцепочечную молекулу положительной (+)РНК [2].

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 различная степень инфицирования на разных стадиях развития пчелы, возможно, объясняется неодинаковой способностью к сопротивлению вирусной инфекции [3].

Согласно последних данных основным переносчиком ВДК служит клещ *Varroa destructor*, тесная ассоциация вируса с клещом *V. destructor* способствовала его распространению в глобальных масштабах [4].

Исследованиями разных коллективов учёных подтверждена большая распространённость ВДК у *Apis mellifera L.* в европейских странах. В Австрии и Франции при обследовании пчел ВДК найден в 91 и 97 % случаев, в Дании вирус выявлен на 57 % пчел; в Чехии на 31 % [6]. Отмечено доминирование ВДК в большинстве регионов России и в Республике Азербайджан. По данным Масленникова В. И. и др. на территории Северного, Центрального и Южного федеральных округов европейской территории Российской Федерации выявлена тотальная (100%) инфицированность пчёл вирусом деформации крыла.

Некоторыми авторами отмечены сезонные различия в распространённости ВДК. Так, весной, летом, осенью инфицированность вирусом взрослых пчёл составила 56, 66, 85 %, куколок – 16, 38, 54 % соответственно [4].

Вирус культивируется в культурах клеток медоносной пчелы. Способность вируса деформации крыла пчёл к репродукции в культурах клеток млекопитающих и птиц изучена недостаточно. Ущерб наносимый ВДК огромный, отсутствие специфических способов лечения и профилактики, требует тщательного изучения биологических свойств вируса. Получение культуры клеток пчелы медоносной – трудоёмкий процесс, кроме того, для культивирования культуры клеток пчёл требуются специальные питательные среды, которые как правило завозятся из-за рубежа.

В связи с этим **целью** исследований явилось выделение вируса деформации крыла из тканей пчелы медоносной и изучение его способности к репродукции в первично-трипсинизированной культуре фибробластов эмбрионов кур.

#### **Материалы и методы исследований.**

Работа проводилась на базе РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», в отделе болезней птиц и пчёл.

Для выделения DWV мы отбирали живых взрослых рабочих медоносных пчел и куколок, которые имели клинические признаки болезни

Учитывая тот факт, что геномная РНК DWV в довольно большом количестве выявлена методом гибридизации *in-situ* в зрительных и усиковых нейронах мозга [3, 5], в крыльях, груди, ногах, гемолимфе и жировом теле, а также в репродуктивных органах и органах пищеварения медоносных пчёл, в качестве источника вирусного материала мы использовали голову, грудь, ноги и крылья пчёл с клиническим проявлением болезни.

Исследуемый материал в течение 1 часа выдерживали в растворе Хенкса с добавлением антибиотиков: бензилпенициллина натриевой соли и стрептомицина (1000 ЕД на 1 см<sup>3</sup> среды), после чего промывали стерильной дистиллированной водой.

Гомогенизацию материала проводили механическим способом с добавлением питательной среды Игла и ГЛА, в соотношении 1:1 из расчёта 1 см<sup>3</sup> 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 монослоя 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. 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 см<sup>3</sup> разведенного в 2 раза вирусосодержащего материала (группа № 1), в три матраса – 1 см<sup>3</sup> вирусосодержащего материала, разведенного в 20 раз (группа № 2). Кроме этого в три культуральных матраса с культурой ФЭК вносили 1 см<sup>3</sup> разведенного в 2 раза материала, полученного от заведомо здоровых пчёл (контроль) и в три матраса – 1 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> поддерживающей питательной среды с содержанием 2% ЭТС, таким образом конечное разведение вирусосодержащего материала в заражённых матрасах группы №1 составило 1:20, в опытной группе №2 – 1:200, контроль материала от заведомо здоровых пчёл – 1:20.

Культуральные матрасы помещали в термостат при температуре плюс 37°C и ежедневно просматривали их под микроскопом (Eclipse TS 100F/TS 100F LED (Nicon, Япония)).

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

#### **Результаты исследований.**

Формирование плотного монослоя ФЭК происходило на вторые сутки после высева клеток в матрасы. Первые признаки предположительного 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, её 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 зернистостью 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-жёлтого цвета. При микроскопическом исследовании монослоя во всех заражённых матрасах наблюдали следующие изменения: в монослое отмечали небольшие «стерильные» участки (участки без клеток), которые были окружены клетками округлой формы (поражение монослоя составляло 30–40%), клетки монослоя (80%) содержали в своей цитоплазме мелкую зернистость.

Через 96 часов с момента заражения наблюдалось поражение монослоя не менее 80% с большими очагами отслоения клеток, в некоторых местах в виде плёночек, которые одним краем были прикреплены к субстрату. Заражённые матрасы подвергали замораживанию при температуре минус 20°C.

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 пчёл, наблюдалось изменение цвета питательной среды.

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

Методом ПЦР было проведено исследование проб вирусосодержащего материала, полученного от пчёл с признаками вирусной деформации крыльев до культивирования в культуре ФЭК (нативный материал), а также исследование проб вирусосодержащего материала после культивирования в культуре куриных фибробластов.

Так, по сравнению с вирусным материалом, полученным непосредственно от пчёл, в вирусном материале после культивирования в культуре ФЭК наблюдалось увеличение концентрации вируса в 1,9 и 7,4 раза. Это говорит об успешной изоляции вируса в данной культуре клеток.

В дальнейшем наши исследования будут направлены на адаптацию изолята вируса деформации крыла пчёл 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.

### **Заключение.**

1. С использованием гетерологичной системы культивирования – первично-трипсинизированной культуры фибробластов эмбрионов кур изолирован вирус деформации крыла из тканей медоносной пчелы.

2. ЦПД вируса в культуре ФЭК проявлялось в виде округления клеток и появления в их цитоплазме мелкой зернистости, образовании «стерильных» участков клеток и очагов отслоения клеток, изменением цвета питательной среды в цвет жжёного сахара.

3. Выделенный штамм ВДК может быть использован как стандарт для положительного контроля, с возможностью контроля вирусной нагрузки у пчёл на пчелопасеках, в продуктах и материалах пчеловодства, а также при разработке средств лечения и профилактики болезни деформации крыла у пчёл.

### *Литература*

1. De Miranda, J. R. Deformed wing virus / J. R. de Miranda, E. Genersch // *Journal of Invertebrate Pathology*. – 2010. – Vol. 103. – P. 48–61.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. Standard methods for virus research in *Apis mellifera* / de Miranda [et. al.] // *Journal of Apicultural Research*. – 2013. – Vol. 52, № 4. – 57 p.

6. Tentcheva, D. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructormite* populations in France / D. Tentcheva [et. al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, № 12. – P. 7185–7191.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ УРОВНЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АНТИТЕЛ В ЖЕЛТКАХ КУР, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ВАКЦИНОЙ «ТЕТРАВИР - 4» И «ЭНТЕРОВАК -5 »**

### **ШАПУЛАТОВА З.Ж.**

Самаркандский государственный университет ветеринарной медицины, животноводства и биотехнологий, г. Самарканд, Республика Узбекистан

*В статье приведены результаты научных исследований по разработке ветеринарного препарата на основе трансовариальных иммуноглобулинов для специфической профилактики и лечения вирусных респираторных, вирусно-бактериальных желудочно-кишечных инфекций телят. Приведены результаты определения антител к вирусам – возбудителям пневмоэнтеритов телят в яичных иммуноглобулинах от кур, иммунизированных вакциной «Тетравир - 4» и «Энтеровак -5».*

**Ключевые слова:** вирус, телята, куры, желток, РНГА, иммуноглобулин, антитела, трансовариальный, желток, пневмоэнтериты.

## **RESULTS OF STUDYING THE LEVEL OF ANTI-VIRAL ANTIBODIES IN THE YOLKS OF CHICKS IMMUNIZED WITH THE VACCINE “TETRAVIR-4” AND “ENTEROVAC-5”**

### **SHAPULATOVA Z. J.**

Samarkand State University of Veterinary Medicine, Animal Husbandry and Biotechnology, Samarkand, Republic of Uzbekistan