

**ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ДЕФОРМАЦИИ
КРЫЛА ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*APIS MELLIFERA* L.)
В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЭМБРИОНОВ КУР**

М. И. Черник, И. С. Радюш

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь, e-mail: bievm@tut.by*

Аннотация. Впервые в Республике Беларусь сотрудники РУП «Институт экспериментальной ветеринарной медицины им. С. Н. Вышелесского» выделили вирус деформированного крыла из тканей медоносной пчелы с использованием первичной трипсинизированной культуры фибробластных клеток куриного эмбриона и провели его молекулярно-генетическую идентификацию.

Ключевые слова: медоносная пчела, *Apis mellifera* L., вирус деформации крыла, deformed wing virus, болезнь деформации крыла пчёл, Беларусь.

Введение. Среди РНК-содержащих вирусов, обнаруженных у медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.), наибольшее распространение получил вирус деформации крыла – ВДК (deformed wing virus, DWV) [1] – икосаэдрический РНК-содержащий вирус диаметром 30 нм, семейства *Iflaviridae* [2], который культивируется в культурах клеток медоносной пчелы. Способность вируса к репродукции в культурах клеток млекопитающих и птиц изучена недостаточно.

Болезнь деформации крыла пчёл характеризуется появлением пчёл с уродливыми деформированными крыльями, укороченными брюшками, отсутствием пигментации, гибелью куколок и молодых медоносных пчёл. Количество рабочих пчел в улье с видимыми признаками ВДК может служить маркером последующей гибели семьи [1, 3]. В пчелиных семьях с явными признаками заболевания отмечают 100%-ную инфицированность взрослых рабочих пчел, 95%-ную – куколок, 80%-ную – личинок, 47%-ную – половозрелых трутней [4].

Основным переносчиком ВДК служит клещ *Varroa destructor* [3], что способствует распространению вируса в глобальных масштабах: ВДК широко распространен у *Apis mellifera* L. в европейских странах [1, 3], в том числе и в Республике Беларусь.

Материалы и методы. Целью нашей работы было выделение вируса деформации крыла из организма пчел с явными клиническими признаками и определение способности вируса к репродукции в культуре клеток птиц.

В качестве источника вирусного материала мы использовали голову, грудь, ноги и крылья взрослых рабочих медоносных пчел и куколок. Исследуемый материал подготавливали по общепринятой методике. Полученный материал использовали для заражения монослоя первичной культуры фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) по 1 см³. В качестве поддерживающей питательной среды использовали среду (9 см³ на матрас) Игла и ГЛА (1:1) с 2 % ЭТС. В качестве контроля использовали аналогичным образом приготовленный материал от заведомо здоровых пчел, отобранных из благополучной по данному заболеванию пасеке, а также контроль культуры клеток.

Матрасы культивировали при температуре плюс 37 °С, 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, проводили контроль стерильности исследуемого материала.

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

Результаты исследований. Через 48–52 часа с момента заражения в зараженных матрасах наблюдалось округление клеток с появлением в их цитоплазме мелкой зернистости (поражение монослоя 10 %), питательная среда оставалась прозрачной, ее цвет соответствовал цвету среды в контрольных матрасах – красный с желтоватым оттенком. 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. При микроскопическом исследовании монослоя во всех зараженных матрасах отмечали неболь-

шие участки без клеток, окруженные клетками округлой формы (поражение монослоя 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 контрольных матрасах монослоем оставался полным и ровным, без признаков клеточной дегенерации.

Полученный в результате культивирования в культуре ФЭК материал признан стерильным (отсутствие роста микроорганизмов на МПА, МПБ, МППБ, Сабуро).

Методом ПЦР проведена идентификация вируса, а также установлена положительная динамика накопления вируса в культуре ФЭК. 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 раза. Это может говорить о том, что для изоляции и культивирования вируса деформации крыла пчел может быть использована культура фибробластов из развивающихся эмбрионов кур.

Литература

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

АСКОСФЕРОЗ ПЧЕЛ и МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ASCOSPHAERA APIS

М. И. Черник, Ю. И. Тяпша, О. В. Дубаневич, О. Л. Гуринович

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселеского»,
г. Минск, Республика Беларусь, e-mail: chernict@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты исследований по молекулярно-генетической детекции генома *Ascospaera apis* и разработке ПЦР-диагностики аскосфероза пчел.

Ключевые слова: аскосфероз пчел, ПЦР-диагностика, геном *Ascospaera apis*, Беларусь.

Введение. Благодаря хорошей приспособляемости к различным условиям внешней среды микроскопические грибы успешно выдерживают конкуренцию с другими микроорганизмами и часто вытесняют их в жизненной борьбе с того или иного субстрата.

Из основных микозов, патогенных для пчел, значительное распространение получил аскосфероз (перицистомикоз, перицистоз, известковый расплод, меловый расплод, сухой гнилец). АСКОСФЕРОЗ ПЧЕЛ (*Ascospaerosis*) – инфекционная болезнь пчелиных семей, вызываемая грибом *Ascospaera apis*, характеризующаяся поражением трутневых, пчелиных личинок и куколок, в редких случаях поражаются маточные личинки. К заражению возбудителем *Ascospaera apis* чувствительны яйца, личинки и куколки, однако в лабораторных условиях воспроизвести заражение яиц и куколок не удалось.

С. Ф. Спилтор в 1955 г. определил для гриба новый род – *Ascospaera*. В настоящее время *Ascospaera apis* относят к классу *Ascomycetes* (сумчатые), подкласс *Protoascomycetes* (голосумчатые), семейство *Ascospaeraceae*, род *Ascospaera*, вид *Ascospaera apis*.

Мицелий гриба *Ascospaera apis* септированный, многоядерный, ветвистый, достигает длины 600 мкм, толщины – 3–8 мкм. При одинаковых условиях развития размеры гиф могут варьировать. Мицелий имеет поры внутри перегородок между гифами, поэтому внутренняя протоплазма имеет