

УДК [638.154.2-076:577.2.08](477)

## ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ХВОРОБ БДЖІЛ В УКРАЇНІ ЗА ВИКОРИСТАННЯ ПЛР

Маслій І. Г., Беліба Л. П., Десятникова О. В., Рудова Н. Г.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,  
м. Харків, Україна, e-mail: matmas@ukr.net

Матковська С. Г.

Харківська Державна зооветеринарна академія, м. Харків, Україна

Проведено моніторингові дослідження вірусних захворювань бджіл в Україні за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та узагальнено результати проти епізоотологічного (клінічного) методу.

**Ключові слова:** бджоли, ПЛР, віруси гострого, хронічного вірусного паралічу, деформації крила, мішечкуватого розплоду

Медоносна бджола є об'єктом, який все своє життя постійно підпадає під вплив найпростіших і багатоклітинних паразитів, а також мікроорганізмів (грибів, бактерій, вірусів).

Що стосується вірусів комах, то в даний час описано понад 20 вірусів, виділених з медоносною бджолою. Одна з особливостей вірусів комах – їх здатність зберігатися в організмі господаря у латентному стані протягом багатьох генерацій. При цьому вірус не викликає видимих симптомів хвороб. Однак він може бути активований будь-яким внутрішнім або зовнішнім фактором, що призводить до прискореного синтезу, накопичення у організмі та розвитку клініки захворювання [1–3].

Діагностика вірусів бджіл досить складна. По-перше, через відсутність специфічних ознак їх не можна діагностувати за клінікою. Такі прояви, як «розкрилиця», сіпання крил і лапок, збільшення, затвердіння, почорніння черевця, втрата волосків на ньому можуть виникати і за інших хвороб. По-друге, перебіг захворювання в латентній формі не дозволяє поставити діагноз вчасно і правильно. По-третє, практично не розроблений вірусологічний метод дослідження, а саме, культивування ентомопатогенних вірусів *in vitro* аналогічно вірусам тварин і птахів, внаслідок чого вони мало вивчені.

Світова практика свідчить про те, що в лабораторних умовах ідентифікувати збудників вірусів бджіл можна тільки за допомогою електронно-мікроскопічного методу дослідження та біологічної проби [4, 5] або використовуючи серологічні (імунодифузії) і високо специфічну (полімеразна ланцюгова – ПЛР) реакції. Методи молекулярно-генетичного аналізу дуже широко застосовуються в багатьох країнах світу з метою діагностики вірусних хвороб бджіл [6–15].

В Україні такі дослідження проводяться вперше.

**Метою роботи** було проведення моніторингових досліджень вірусних захворювань бджіл в Україні за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та узагальнення результатів в порівнянні з епізоотологічних методом.

**Матеріали та методи.** Дослідження за наявності ураження ентомопатогенними вірусами сімей бджіл проводили у період 2014–2016 рр. (порівнювали результати за перші півріччя) з використанням загальноприйнятих в епізоотології методів [16]. Патологічний матеріал відбирали з тих сімей бджіл, у яких в процесі епізоотологічного обстеження реєстрували підозрілі клінічні ознаки. Таких бджіл, ще живих, личинок та лялечок у кількості до 10–50 штук, збирали і направляли до лабораторії, де їх використовували для дослідження у ПЛР. Тару, в якій транспортували або зберігали проби, опечатували для недопущення поширення збудників у навколишньому середовищі. Відібрані проби зберігали в умовах морозильної камери побутового холодильника за температури мінус 18 °С.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили в спеціалізованій лабораторії ННЦ «ІЕКВМ». Для молекулярно-генетичних досліджень в пробірки відбирали по 3 імаго бджіл або 2 личинки/лялечки з кожного зразка. Підготовку матеріалу для дослідження проводили наступним чином: 300 мкг (3 бджоли або 2 личинки/лялечки) розтирали з невеликою кількістю стерильного піску. Гомогенат тканин переносили в пробірки типу Епендорф, об'ємом 1,5 см<sup>3</sup>. РНК вірусів екстрагували з проби сухих тканин сорбентним методом після попередньої обробки протеїназою К (0,1 % розчин, 6 °С, 24 год.). к ДНК отримували із зразків РНК шляхом зворотної транскрипції з використанням комерційних наборів. Зворотну транскрипцію проводили за допомогою набору GenPak®RT-PCRCore ТОВ «Лабораторія Ізоген», Москва, Російська Федерація. Ампліфікацію здійснювали з використанням базових наборів. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою набору GenPak®PCR-Core ТОВ «Лабораторія Ізоген», Москва, Російська Федерація. Системи праймерів ABPV\_F/R, CBPV\_F/R, DWV\_F / R, SBV\_F/R були обрані завдяки співробітнику лабораторії хвороб бджіл Національного інституту ветеринарії (Piwet, м Pulawy, Польща) Sylwii Kasprzak [17].

Характеристики праймерів наведені в таблиці 1.

Електрофоретичний аналіз проводили за допомогою набору для електрофорезу виробництва фірми Amresco, США. Концентрація агарози у гелі – 1,5 %, напруга – 120 В. Облік реакції здійснювали шляхом аналізу електрофоретичних продуктів ампліфікації в УФ-світлі за довжиною хвилі 320 нм.

Таблиця 1 – Характеристики праймерів

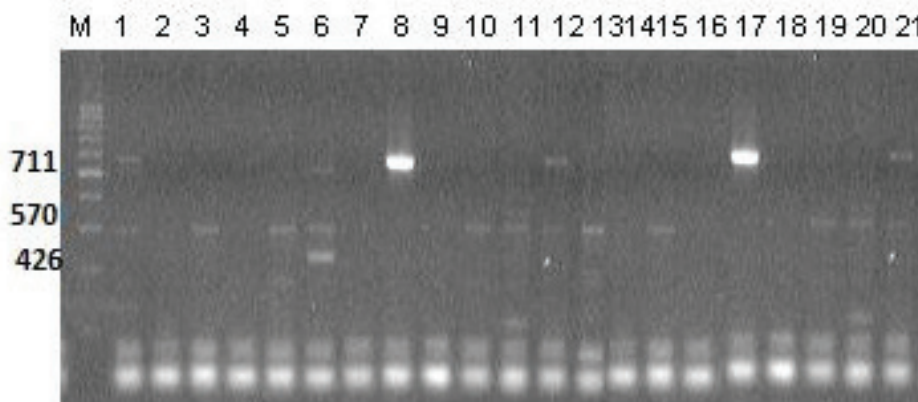
№ з/ч	Послідовності праймерів	Т відпа-лу, °С	Довжина амплікону, п.н.	Посилання
1	ABPV-F: ttatgtgtccagagactgtatcca	55 °С	900	Tentcheva et al., (2004)
	ABPV-R: gctcctattgctcgggttttcggt			
2	CBPV-F: tcagacaccgaatctgattattg	55 °С	570	Ribiere et al. (2002)
	CBPV-R: actactagaaactcgtcgtctcg			
3	DWV-F: atcagcgcttagtgaggaa	55 °С	711	Chen Y. et al. (2004)
	DWV-R: tcgacaattttcggacatca			
4	SBV-F: ggatgaaaggaaattaccag	55 C	426	Tentcheva et al., 2004
	SBV-R: ccactaggtgatccacact			

Отримані результати документували фотографуванням гелів з використанням світлофільтру або комп'ютерних систем з цифровими відеокамерами. стільки ж на етапі постановки ПЛР для виявлення джерела контамінації.

**Результати досліджень.** Усього на дослідження надійшло 162 проби патологічного матеріалу з 17 областей України. Зокрема, протягом першого півріччя 2014 року зі підозрою на вірусні хвороби імаго бджіл надійшло 56 зразків. Матеріал був доставлений з пасік, розташованих у Вінницькій, Волинській, Донецькій, Запорізькій, Луганській Львівській, Полтавській, Сумській, Харківській, Херсонській та Чернігівській областях. Протягом першого півріччя 2015 року надійшло 60 зразків з пасік Донецької, Дніпропетровської, Київської, Запорізької, Одеської, Харківської, Черкаської та Чернігівської області. За перше півріччя 2016 року було отримано 40 зразків патологічного матеріалу, який надійшов із Запорізької, Дніпропетровської, Сумської, Харківської, Чернігівської обл.

Так, за результатами дослідження у ПЛР із 162 проб патологічного матеріалу позитивними виявилися 51. У 2014 році із 56 проб, що надійшли в лабораторію із сімей бджіл з клінічними ознаками вірозів, 15 зразків виявилися позитивними. Зокрема, вірус гострого паралічу був виявлений в 4 зразках, хронічного – 3, деформації крила – 1, мішечкуватого розплоду – 7. У 2015 році за клінічними ознаками попередньо встановлено діагноз на вірози у 60 сім'ях, з них позитивними у ПЛР виявилися – 9. Зокрема, позитивними щодо вірусів гострого і хронічного паралічу бджіл та деформації крила були – 3 (по одному зразку), мішечкуватого розплоду – 6. У 2016 році було зареєстровано 46 позитивних випадків клінічного прояву вірозів, при цьому генетичний матеріал вірусів виявлено молекулярно-генетичними дослідженнями в 27 пробах, а саме: хронічного паралічу бджіл – у 10 зразках, деформації крила – 3, мішечкуватого розплоду – 14.

Результати досліджень з візуалізації продуктів ПЛР вибірково представлені на рисунках 1 – 3.



**Рис. 1.** Гель-електрофорез продуктів ПЛР ентомопатогенних вірусів. Позитивні: DWV – №№ 1, 8, 17, 21; SBV – №№ 1, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 15, 19, 20, 21.

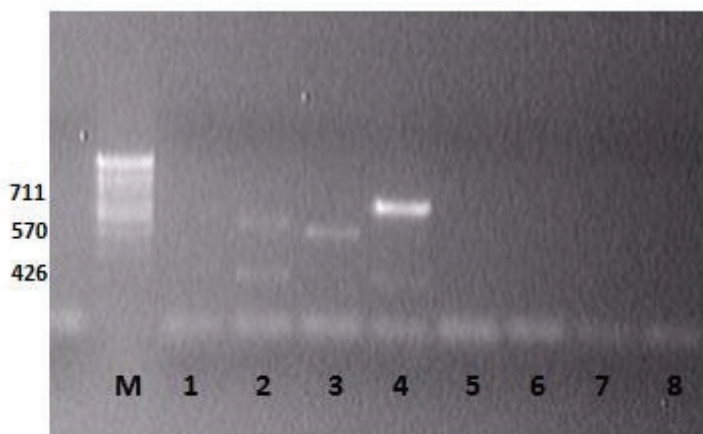


Рис. 2. Гель-електрофорез продуктів ПЛР ентомопатогенних вірусів. Позитивні CBPV – № 4; SBV – №№ 2, 4; DWV – № 3.

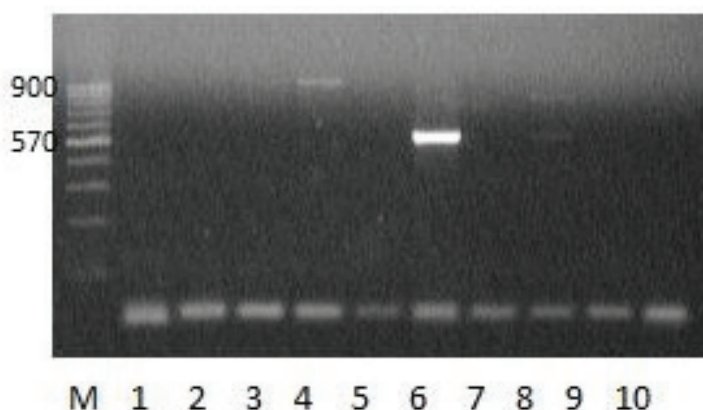


Рис. 3. Гель-електрофорез продуктів ПЛР ентомопатогенних вірусів. Позитивні ABPV – № 4, 8; DWV – № 6, 8.

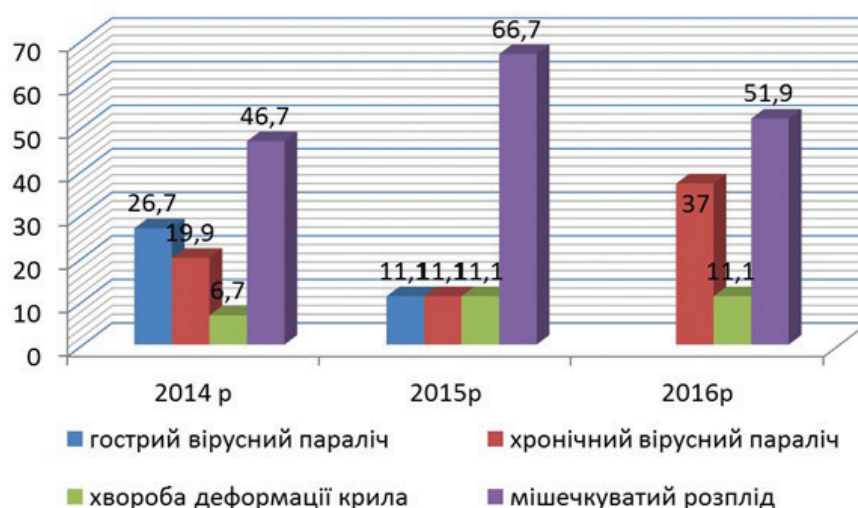
Узагальнені дані епізоотологічного моніторингу вірусів бджіл наведені в таблиці 2.

Таблиця 2 – Узагальнені результати досліджень

Роки	2014	2015	2016	Всього за 2014–2016 рр.
Всього надійшло з клінічними ознаками:	56	60	46	162
З них позитивних: гострий параліч	4	1	–	5
Хронічний параліч	3	1	10	14
Хвороба деформації крила	1	1	3	5
Мішечкуватий розплід	7	6	14	27
Всього позитивних	15	9	27	51

Як видно з даних таблиці 2, із 162 проб позитивними у ПЛР виявились тільки 51, що становить 31,5 %. Це підтверджує складність встановлення діагнозу на вірусні захворювання бджіл за клінічними ознаками. Аналізуючи отримані результати по роках, необхідно відмітити, що найменшу кількість позитивних випадків ураження бджіл вірусними агентами за результатами ПЛР реєстрували в 2015 році – у 5,6 % випадків, найбільшу – у 2016 році – 16,7 %.

Результати визначення питомої ваги кожного з досліджуваних вірусів у структурі вірусів наведені на діаграмі 1.



Діаграма 1 – Питома вага вірозів у структурі захворювань по роках, %

Так, за визначенням питомої ваги вірозів встановлено, що найбільш поширеними у 2014 році були гострий параліч (26,7 %) і мішечкуватий розплід (46,7 %), у 2015 — мішечкуватий розплід (66,7 %), у 2016 р. – хронічний параліч (37,0 %) і мішечкуватий розплід (51,9 %).

Аналізуючи отримані результати, можна стверджувати що несприятливі умови навколишнього середовища і нестача корму викликають активізацію і посилення розмноження вірусів. В Україні у першому півріччі 2016 року спостерігали екстремальні погодні умови. Тривалі періоди дощів і похолодань створили ситуацію, за якої бджоли не змогли природним шляхом отримати достатньо корму. У цьому році було зареєстровано максимальну кількість випадків захворювання бджіл вірусними хворобами (27) із найменшої кількості проб, що надійшли для дослідження (46).

**Висновки.** Діагноз на вірози бджіл за використання ПЛР проти епізоотологічного (клінічного) методу дослідження підтвердився лише у 31,5 % випадків.

Несприятливі умови навколишнього середовища і нестача корму викликають активізацію і посилення розмноження вірусів. У 2016 році було зареєстровано максимальну кількість випадків захворювання бджіл вірусними хворобами (27 проб) із найменшої кількості проб, що надійшли для дослідження (46 проб) і підтверджено діагноз обома методами досліджень.

#### Список літератури

1. Гробов О. Ф. Вірози пчёл [Text] / О. Ф. Гробов, Ю. М. Батуев, Н. В. Кузьмичева, Е. В. Сичанок // Пчеловодство, 2008. – №№ 7, 8, 9, 10.
2. Ribiere M. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection / M. Ribiere, C. Triboulot, L. Mathieu // Received 29 May 2001; revised 24 January 2002; accepted 12 March 2002.
3. Маслій І. Г. Епізоотична ситуація щодо основних небезпечних хвороб бджіл в Україні / І. Г. Маслій, С. М. Немкова, Л. П. Ступак, О. В. Десятникова // IV Lubelska konferencja pszczelarska aktualnie problemy nowoczesnego pszczelarstwa Pszczela Wola 8-10 lutego 2013 S. 113 – 118.
4. Батуев, Ю. М. Идентификация вирусов пчел методами молекулярно-генетического анализа [Text] / Ю. М. Батуев, И. И. Горячева // Пчеловодство, № 7, 2010. – С. 16 –18.
5. Маслій І. Г., Порівняльні моніторингові дослідження вірозів бджіл шляхом епізоотологічного обстеження та біологічної проби / І. Г. Маслій, С. М. Немкова, О. В. Десятникова, С. Г. Матковська // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2016.– Вип. 102. – С. 98–103.
6. Батуев, Ю. М. ПЦР в диагностике вирусных болезней пчёл [Text] / Ю. М. Батуев, Н. Ф. Ломакина, И. И. Горячева // Молекулярная диагностика. 2010, – Том II. – Раздел 8. – Ветеринария С. – 59–62.
7. Ball, B.V., An introduction to viruses and techniques for their identification and characterisation [Text] / B.V. Ball // CIHEAM - Options Mediterraneennes, 1992. – P. 69–80.
8. Bailey, L., Two More Small RNA Viruses from Honey Bees and Further Observations on Sacbrood and AcuteBee-Paralysis Viruses [Text] / L. Bailey, R. D. Woods // J. gen. ViroL., 1977, V. 37. – P. 175–182.
9. Bailey, R. G. Milne The Multiplication Regions and Interaction of Acute and Chronic Bee-paralysis Viruses in Adult Honey Bees [Text] / L. Bailey, R. G. Milne // J. gen. Virol., 1969, №4. – P. 9–14.
10. Berenyi, O., Bakonyi T., Derakhshifar I., Koglbberger H., and Nowotry N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries [Text] / O. Berenyi, T. Bakonyi, I. Derakhshifar, H. Koglbberger, and N. Nowotry // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72. – No 4. – P. 2414–2420.
11. Benjeddou, M., Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR [Text] / M. Benjeddou, N. Leat, M. Allsopp, S. Davison, // Appl. Environ. Microbiol. 2001, Vol. N 67, P. 2384–2387.
12. Chen, Y. P., Pettis J. S., Collins A., and Feldlaufer M. F. Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses [Text] / Y. P. Chen, J. S. Pettis, A. Collins, M. F. Feldlaufer // Applied and environmental microbiology. - 2006. – Vol. 72. – N 1. – P. 606-611.
13. Evans, J. D., Genetic Evidence for Coinfection of Honey Bees by Acute Bee Paralysis and Kashmir Bee Viruses1 [Text] / J. D. Evans // Journal of Invertebrate Pathology 2001. – V. 78. – P. 189–193.

14. Lanzi, G., Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.) [Text] / G. Lanzi, J. R. de Miranda, M. B. Boniotti, C. E. Cameron, A. Lavazza, L. Capucci, S. M. Camazine // J. of virol., 2006. – Vol. 80. – №. 10. – P. 4998–5009.
15. Olivier, V., Molecular characterisation and phylogenetic analysis of Chronic bee paralysis virus, a honey bee virus [Text] / V. Olivier, P. Blanchard, S. Chaouch, P. Lallemand, F. Schurr, O. Celle, E. Dubois, N. Tordo, R. Thiéry, R. Houlgatte, M. Ribière // Virus Res. 2008. – Vol. Mar; 132(1-2) – P. 59 – 68.
16. Бакулов, И. А. Руководство по общей эпизоотологии [Текст] / И. А. Бакулов, А. Д. Третьяков. – М.: Колос, 1979. – 424 с.
17. Kasprzak S. Incidents of chronic bee paralysis virus (CBPV) in the samples sent from apiaries in 2005 / S. Kasprzak, G. Topolska, A. Hartwig // Przypadki chronicznego paralizu pszczol w materiale nadsylnym z pasiek w 2005 r. – lek. wet. - SGGW Warszawa, Poland.

#### DIAGNOSIS OF VIRAL DISEASES BEES IN UKRAINE FOR USE PCR

**Masliy I. G., Beliba L., Desiatnikova O., Rudova N.**

*National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine*

**Matkovskaya S.**

*Kharkiv State Veterinary Academy, Kharkiv, Ukraine*

*The aim of the work. Conducting monitoring studies of viral diseases of bees in Ukraine by polymerase chain reaction and generalization of results against epizootic method.*

*Materials and methods. The study was conducted during the 2014–2016 biennium (comparing results for the first half) using conventional methods and in Epizootology in PCR.*

*The results of research. Total examined 162 samples of pathological material from 17 regions of Ukraine. In particular, during the first half of 2014 with suspected viral disease of adult bees received 56 samples. In the first half of 2015 – 60, and the first half of 2016 was obtained 40 samples of pathological material.*

*Thus, the results of PCR studies in 162 samples of pathological material, 51 were positive, accounting for 31.5%. This confirms that the clinical signs for the diagnosis of viral diseases of bees is very difficult. The lowest number of positive cases of lesions bees viral agents by PCR results were recorded in 2015 – 5.6% of cases, the largest - in 2016 – 16.7%. Found that the most common in 2014 were acute paralysis (26.7%) and sacbrood (46.7%) in 2015 - sacbrood (66.7%) in 2016 - a chronic paralysis (37.0%) and sacbrood (51.9%).*

*Found that adverse environmental conditions and lack of food causes activation of viral replication and amplification. In Ukraine, in the first half of 2016 was observed extreme weather conditions. This was the maximum number of registered cases of bee viral diseases (27) with the smallest number of samples received for research (46).*

*Conclusions:*

*1. Diagnosis viral diseases of bees for using PCR to epizootic (clinical) research method was confirmed only in 31.5% of cases.*

*2. Adverse environmental conditions and lack of food causes activation of viral replication and amplification. In 2016 was registered the maximum number of cases of bee viral diseases (27 samples) with the least number of samples received for research (46 samples) and confirmed the diagnosis of both methods of research.*

**Keywords:** *bees, PCR, virus acute, chronic viral paralysis, deformation wings sacbrood*