

ших полный курс специфической профилактики вертикальной трансмиссии, положительные результаты исследования на наличие ДНК ВИЧ-1 в крови были установлены у 17 человек ($1,28 \pm 0,95\%$). В группе детей, которые получили неполный курс специфической профилактики этот показатель составлял $14,38 \pm 4,45\%$, а в группе детей, которые вообще не получали специфической профилактики, показатель частоты передачи ВИЧ от матери к ребенку был высоким и составлял $36,36 \pm 10,25\%$.

Выводы. Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что низкий уровень инфицирования ВИЧ детей, получивших полный курс специфической профилактики, подтверждает высокую эффективность введенных в Украине профилактических мероприятий по предупреждению вертикальной трансмиссии ВИЧ от матери к ребенку. В то же время, стоит отметить, что согласно полученных нами данных, дети, которые не

получали специфическую профилактику вертикальной трансмиссии ВИЧ или получили неполный курс профилактики, составляют основную группу риска инфицирования ВИЧ от матери во время беременности и родов.

1. Развитие эпидемии СПИДа. Декабрь 2009 г. 95 стр. 2. Онищенко Г.Г. Противодействие эпидемии ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии. //Журн. микробиол. – 2009. – №1. – С.16-21. 3. Деметрива Л.А., Голиусов А.Т. Особенности эпидемии ВИЧ-инфекции в Восточной Европе и Центральной Азии на современном этапе. //Журн. микробиол. – 2010. – №2. – С.32-34. 4. ВІЛ-інфекція в Україні. Інформаційний бюлетень. // К., 2011. – №37. – 89 стор. 5. Гармонізований звіт України про досягнутий прогрес у здійсненні національних заходів у відповідь на епідемію СНІДу. 2012 рік.// Київ, 2012. – 240 стор. 6. European Collaborative Study. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. //Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol.50. – P.458-465. 7. United to the End AIDS: achieving the targets the 2011 Political Declaration. United Nations General Assembly. A/66/757. 2 April 2012.

Надійшла до редколегії 27.04.12

Ю. Калашян, А. Чернец, В. Лукица, Л. Проданюк, Н. Калашян, В. Полищук, И. Будзанивская

ВИРУС ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ В МОЛДОВЕ

В коллекционном саду яблони Института садоводства, виноградарства и пищевых технологий в Кишиневе (Республика Молдова) отобран изолят вируса ямчатости древесины и успешно перенесен на растения индикатора Nicotiana occidentalis 37B. Приготовлена поликлональная антисыворотка для идентификации вируса в различных тканях пораженных деревьев иммунологическими методами ELISA и ISEM. Изучена распространенность этого вируса в насаждениях яблони Республики. Методом ОТ-ПЦР отобраны изоляты для последующего проведения сиквенса и фелогенетического анализа.

In apples' collection garden of Institute of Horticulture, Viticulture and food technologies in Kishinev (Republic of Moldova) Apple Stem Pitting Virus were isolated and successfully transmitted on the indicator-plants Nicotiana occidentalis 37B. The poly-clonal antiserum was obtained for identification of the virus in different tissues of affected trees by serological methods ELISA and ISEM. The spread of the virus among apple's plantations of Republic were observed. According to the RT-PCR data virus isolates for further sequence and phylogenetic analysis were selected.

Ямчатость древесины яблони (ASPV) впервые описана в 1954 году в США (8), а вирусная природа доказана в 1956 году после передачи возбудителя прививкой на здоровые растения древесных индикаторов (5). В настоящее время заболевание встречается во всех странах, где культивируют яблоню. До недавнего времени этиология ASPV не была изучена. К вирусным заболеваниям его относили на основании вызываемых им симптомов и диагностику проводили в полевых опытах на древесных индикаторах. В 1986 году возбудитель ASPV был успешно перенесен на растения индикатора Nicotiana occidentalis 37B (9). В 1990 году японским исследователям удалось повторить перенос ASPV с деревьев яблони с симптомами ямчатости на табак N. occidentalis 37B, приготовить антисыворотку к нему и на основании результатов последующих исследований показать, что ВЯДЯ является новым видом вируса с удлинённой морфологией частиц (6).

Согласно последней классификации, ASPV отнесен к роду Foveavirus семейства Flexiviridae.

В Молдове ASPV впервые обнаружен и описан в 1969 году (2). Установлено, что после вируса хлоротической пятнистости листьев яблони ASPV наиболее часто встречаемый на семечковых культурах (1).

В 1994 году в Институте плодородства в Кишиневе был выделен изолят ASPV из яблони, перенесен на индикатор N. occidentalis 37B и приготовлена антисыворотка с титром 1/2000. Однако приготовленные на ее основе диагностикумы выявляли исследуемый вирус методом иммуноферментного анализа только в тканях

лепестков, ограничивая сроки тестирования растительных образцов.

Исходя из сказанного нам предстояло:

- приготовить антисыворотку для ELISA диагностики исследуемого вируса в течение года;
- изучить распространенность ASPV в насаждениях яблони Молдовы;
- методом полимеразной цепной реакции отобрать изоляты ASPV для последующего сиквенирования и филогенетического анализа.

Для получения диагностической антисыворотки к ВЯДЯ нами были протестированы сортообразцы яблони из коллекционного сада института садоводства на зараженность исследуемым вирусом. Тестирование проводили методом иммуносорбентной электронной микроскопии (ISEM) антисывороткой любезно предоставленной доктором Янасе (Япония) в период цветения с использованием тканей лепестков. Отбор изолята проводился по результатам количественного выявления вирусных частиц в сканируемых препаратах. По этим параметрам было отобрано 5 образцов 1-9-63, 1-15-33, 1-17-13, 1-17-63 и 3-32-11. Полученные результаты были подтверждены повторным тестированием этих же сортообразцов с использованием, кроме лепестков, экстракта коры молодых побегов и отрастающих листьев. Для механического переноса ВЯДЯ на индикатор N. occidentalis 37B были использованы ткани лепестков. Растения индикатора заражали в стадии 3-4 настоящих листьев при температуре 22-25°C. Экстрагирующие смеси готовили на основе 3-х буферных смесей (таблица 1). Перед заражением листья индикатора опудривали карборундом.

Таблица 1. Влияние буферных растворов на перенос ВЯДЯ на индикатор N/occidentalis 37B

№ п/п	Наименование буферных смесей	Исследуемые изоляты				
		1-9-63	1-15-33	1-17-13	1-17-63	3-32-11
1	0,05M pH 7,5 HEPES	-	-	-	-	-
2	0,02M pH 7,8 Tris-HCl	-	-	-	-	-
3	0,05 M pH 7,8 K/Na phospat buffer +0,1% sodium sulfat, +0,1% sodium sulfite, +0,1% thioglycerol	-	-	-	-	+

Из таблицы видно, что положительный результат был получен только в варианте № 3 с использованием в качестве источника инфекции лепестки образца 3-32-11. На 27-29 день после заражения на отрастающих листьях некоторых растений, появились симптомы в

виде просветления жилок 2 и 3 порядка (Рис.1), Результаты же переносов с использованием инокулюмов остальных образцов оказались отрицательными, в том числе изолята 3-32-11 в вариантах 1 и 2.

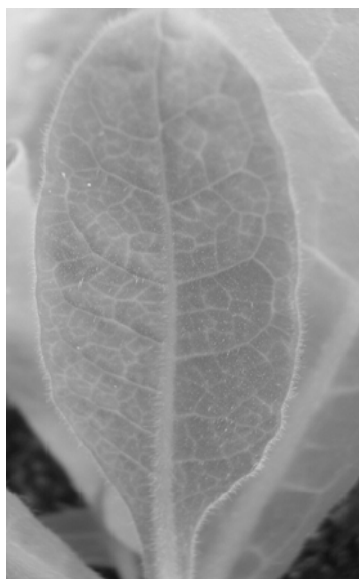


Рис 1. Просветление жилок на индикаторе *N. occidentalis* 37В вызываемое ASPV

Листья с симптомами просветления жилок были использованы для последующего пассажа с целью размножения вируса в тканях индикатора. Пассаж вируса проводили с помощью фосфатного буфера без добавок, а инфицированные растения индикатора выращивали в условиях короткого дня с целью максимального накопления вируса в зараженных тканях. На 12-14 день после заражения на отрастающих молодых листьях появлялись описанные выше симптомы, которые и использовали для очистки ВЯДЯ. Свежесорванные листья с симптомами гомогенизировали в 0,02M pH 7,0 Na фосфатном буфере с добавлением 0,1% тиоглицерола в соотношении 1:4 и процеживали через 4 слоя марли. Полученный экстракт центрифугировали 10 мин при 5 000g. В надосадочную жидкость (НЖ) добавляли гидратированный фосфат кальция при осторожном

перемешивании в течение 30 мин. Затем суспензию центрифугировали 10 мин при 5 000g. НЖ центрифугировали над 5 мл 20% сахарозы в течение 90 мин при 120 000g в роторе Ti 45 BECKMAN. Осадок суспендировали в 0,01M pH 8,0 фосфатном буфере содержащем 0,5% TritonX-100 и центрифугировали 10 мин при 5 000g. НЖ наслаивали на 30% сахарозную подушку и центрифугировали 90 мин при 100 000 g в том же роторе. Полученный осадок суспендировали в 0,01M боратном-HCl буфере содержащем 0,5% мочевины в течение ночи. Затем суспензию центрифугировали в градиенте плотности сахарозы (10-40) 180 мин при 80 000 g в роторе SW 28 BECKMAN. Вирусную зону диализовали против фосфатного буфера в течение ночи. Чистоту препарата проверяли с помощью спектрофотометра "SPECOL 1500" (Рис. 2).

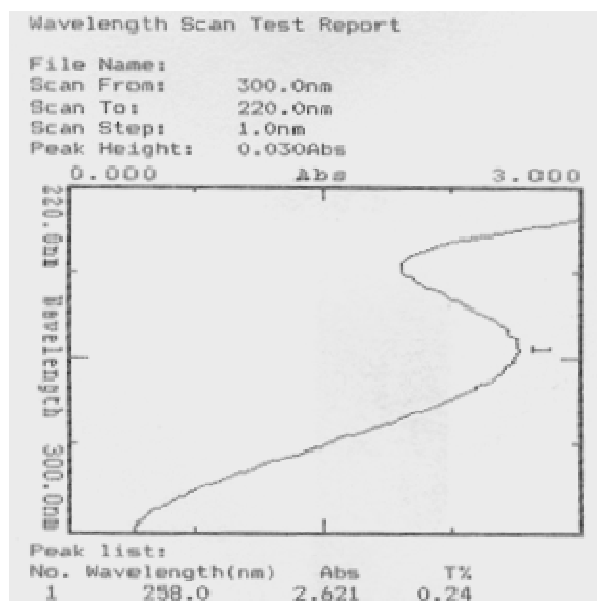


Рис 2. Спектрограмма очищенного препарата ASPV

Для получения антисыворотки был проведен короткий цикл иммунизаций кроликов – подкожно с полным адьювантом Фрейнда, внутримышечно с неполным адьювантом Фрейнда и внутривенно. Активность антител в крови подопытных кроликов определяли методом ISEM. На 22 день после первой иммунизации титр антисыворотки составлял 1:2000. Через 4 недели активность антисыворотки стала падать. После двух реиммунизаций активность антител была восстановлена и сохранялась до 127 дня после первой иммунизации.

Диагностические наборы для ELISA готовили из сывороток, полученных на 90 и более дней после первой иммунизации. Фракцию иммуноглобулина IgG выделяли методом аффинной хроматографии с использованием протеина A-sepharosaCL 4B фирмы "SERVA" (3). Конъюгат готовили по описанному в литературе методу (4) с использованием в качестве маркера щелочную фосфатазу. В результате проведенных исследований было установлено, что для надежного выявления ВЯДЯ необходимо микроплату сенсibilизировать иммуноглобулином в концентрации 0,75 мкг/мл. Оптимальное разведение конъюгата должно составлять 1:1000 – 1:1500.

В 2011 году нами были проведены исследования по изучению распространенности ВЯДЯ в насаждениях яблони в Молдове. Общая площадь обследованных сортов составила 75 га. В процессе обследований рандомизировано отбирали пробы для лабораторного ис-

следования. Тестирование проводили методом ISEM с использованием антисыворотки нашего производства. Всего было тестировано 805 образцов, из которых 122 были заражены ВЯДЯ, что составляет 14,1%. Установлено также, что ВЯДЯ в пораженных образцах встречается вместе с двумя другими латентными вирусами – хлоротической пятнистости листьев (CLSV) и борозчатости древесины (ASGV). Все три вируса в природе не имеют переносчиков и распространяются только при их вегетативном размножении. Как показали результаты, исследуемый вирус, как и 2 остальных вируса, наиболее часто выявлялись в деревьях возрастом 20 и более лет, чем в молодых насаждениях, что может быть связано с общей тенденцией закладки садов оздоровленным посадочным материалом.

Проведены исследования по изучению выделенных в процессе обследования изолятов ASPV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Тотальную РНК выделяли с помощью специального набора фирмы "Quagen". Для проведения реакции использовали коммерческий сет фирмы "Invitrogen SuperStrip" с парой праймеров, подобранных Menzel (7). Полученные в результате ПЦР фрагменты были фракционированы методом электрофореза в 2% агарозном геле. Результаты электрофореза визуализировали и регистрировали в ультрафиолете (Рис. 3).

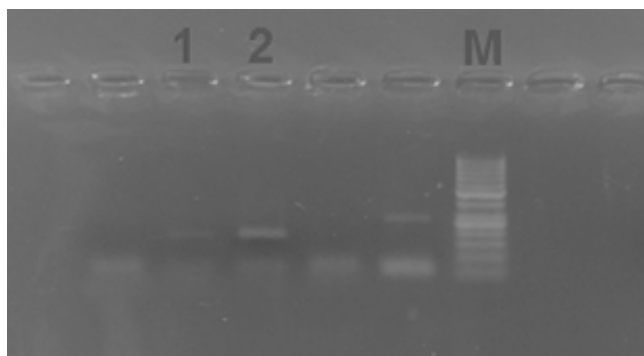


Рис.3. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР: М-маркер молекулярных масс 100 б/п; 1, 2-образца ASPV

Выделенные в результате РТ-ПЦР фрагменты будут использованы в дальнейших исследованиях с целью сиквинирования и проведения филогенетического анализа родства изолятов ASPV.

1. Бивол, Т.Ф. Латентные вирусы яблони и их изучение в Молдавской ССР. Вирусные болезни плодово-ягодных культур и винограда в Молдавии. Выпуск 1. Кишинев, с. 32-65. 1973. 2. Вердеревская, Т. Д., Рудь, Г.Я. Вирусные заболевания плодовых культур и винограда и пути решения проблемы создания свободных от вирусов насаждений. Доклады семинара ФАО стран Средиземноморья по защите плодовых и винограда от вредителей и болезней. – М., с. 11-18. 1969. 3. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. Vol.34, No.3, p.475-483. 1977. 4. Clark M.F., Bar-Joseph M.

Enzyme immunosorbent assay in plant virology. In: Methods in Virology (Eds. K.Maramorosch, A.Kaprowski), N.Y.:Academic Press. p 51-85. 1984. 5. Guengerich, H.W., and Millikan, D.F. Transmission of the stem pitting factor in apple. Plant Dis. Rep. 40:934-938. 1956. 6. Koganezawa, H., and Yanase, H. A New Type of Elongated Virus Isolated from Apple Trees Containing the Stem Pitting Agent. Plant Dis. 74:610-614. 1990. 7. Menzel, W., Jelkmann, W., Mais, E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant m RNA as internal control. Journal of Virological Methods 99:81-92. 2002. 8. Smith, W.W. Occurrence of "stem pitting" and necrosis in some body stocks of apple trees. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 63:101-113. 1954. 9. van der Meer, F.A. Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear // Acta Hortic. 193;73-74.1986.

Надійшла до редколегії 28.04.12