

УДК 576.858

ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ ТА ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА ІРИДОВІРУС КОМАРА *Aedes flavescens*

Рудь Ю.П.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, Київ, 01033, Володимирська 60
e-mail: rudziknew@ukr.net

Надійшла до редакції 09.02.2010

Досліджено вплив на інфекційність іридовірусу комара (MIV) *Aedes flavescens* органічних розчинників, температури, рН, ультрафіолетового та електромагнітного випромінювання. Встановлено, що MIV чутливий до хлороформу, але стійкий до дії ефіру. Інфекційність MIV знижується при рН 3.0 і 11.0 та під дією ультрафіолетового випромінювання, а при температурі 60 °С протягом 30 хв іридовірус комара інактивується. Електромагнітне випромінювання та температура 45 °С не впливали на інфекційність вірусу.

Ключові слова: іридовірус комара, фізичні та хімічні фактори, інфекційний титр.

ВСУП

Іридовіруси кровосисних комарів широко розповсюджені в природних водоймах України і є регуляторами чисельності цих комах. Це великі, ДНК-вмісні, ікосаедричні, цитоплазматичні віруси, що уражують комарів родів *Aedes*, *Culex*, *Culiseta*. Діаметр віріонів становить 180-200 нм. На відміну від інших іридовірусів, *Mosquito iridescent virus* (MIV) характеризується високою видовою специфічністю та політропністю по відношенню до тканин господаря [1].

Для розуміння сутності процесів взаємодії вірусів з клітиною та розробки практичних засобів по боротьбі з вірусними інфекціями велике значення мають дослідження впливу фізико-хімічних факторів на віруси *in vitro*. Вплив деяких фізичних та хімічних факторів на іридовіруси було вивчено на моделях вірусів з родів *Iridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Ranavirus* та *Megalocytivirus*[2-5]. Іридовіруси комарів, що належать до роду *Chloriridovirus*, в цьому плані вивчені недостатньо.

Для практичного використання вірусів з метою регулювання чисельності кровосисних комарів необхідні дані про стійкість цих вірусів до факторів довкілля. Вивчення фізико-хімічних властивостей іридовірусу комара *Aedes flavescens* дасть змогу оцінити потенціал його розповсюдження між різними видами і типами хазяїв. Відповіді на питання наскільки швидко вірус втрачає свою інфекційність в довкіллі та чи є він термолабільним необхідні для встановлення таксономічного положення іридовірусу комара в родині *Iridoviridae*. Тому метою даної роботи було дослідити вплив на іридовірус комара

органічних розчинників, температури, рН, ультрафіолетового та електромагнітного випромінювання.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

MIV. В роботі використовували іридовірус комара *Aedes flavescens* виділений нами в Київській області. MIV культивували в личинках великої вошиної молі *Galleria mellonella*. Личинки інфікували вірусомісним матеріалом та інкубували при температурі 20-22 °С. Через 14 днів з личинок виділяли MIV.

Очистка MIV. Для виділення та очистки вірусу з інфікованих личинок великої вошиної молі готували гомогенат. Низькошвидкісне центрифугування гомогенату проводили при 5000 об/хв протягом 5 хв на центрифугі К-24. Надосадову рідину нашаровували на 30% розчин сахарози (5 мл сахарози ХЧ, на 0,05 М трис-НСІ буфері рН 7,2) і центрифугували при 20000 об/хв протягом 40 хв на ультрацентрифугі Beckman L5-50В в роторі SW-40. Характерний блакитний осад свідчив про наявність віріонів MIV. Осад ресуспендували у мінімальній кількості 0,05 М трис-НСІ буфера (рН-7,2) і освітляли на центрифугі К-24 при 5000 об/хв протягом 5 хв. Очистку іридовірусу комара проводили в градієнті щільності сахарози (10 – 50 %) на ультрацентрифугі Beckman L5-50В в роторі SW-40 при 20000 об/хв протягом 40 хв. Інфекційний титр іридовірусу комара в культурі личинок *Galleria mellonella* визначали за загальноприйнятими методами [6]. Інфекційний титр MIV в личинках *Galleria mellonella* становив 2×10^7 ID₅₀ мл⁻¹. Концентрацію білку в вірусомісному препараті визначали за мікрометодом Лоурі на

спектрофотометрі JENWAY 6305 [7]. Концентрація білку становила 1,7 мг/мл.

Електронна мікроскопія. Електронно-мікроскопічні дослідження очищеної вірусної суспензії проводили на сітках з коллодієвими плівками-підкладками. Вірус контрастували 2 %-им розчином уранілацетату та вивчали на електронному мікроскопі EM-125.

Хімічні фактори. Для дослідження впливу органічних розчинників та рН на інфекційність іридовіруса комара використовували хлороформ, ефір, цитратний буфер 0,1М рН=3,0 та NaOH 0,1М рН=11,0. Суміш вірусної суспензії та відповідного реагента ретельно перемішували та інкубували протягом 1 год при температурі 25 °С. У випадку з хлороформом вірусну суспензію після інкубації центрифугували 20 хв при 3000 об/хв на центрифугі К-24, а для інокуляції використовували верхню водну фазу. Ефір відкачували вакуумним насосом.

УФ. Для дослідження УФ-випромінювання на інфекційність МІВ в стерильні чашки Петрі вносили по 5 мл вірусної суспензії та витримували під джерелом УФ-випромінювання на відстані 10 см протягом 30 хв.

Електромагнітне опромінення. Опромінювали іридовірус комара *Aedes flavescens* у в скляних флакончиках, що містили 100 мл вірусомісної суспензії. Як джерело мікрохвильового випромінювання була використана стандартна побутова мікрохвильова піч, яка працює на магнетроні з частотою генерації $\nu = 2450$ МГц, що відповідає діапазону частот деяких антропогенних джерел (довжина хвилі випромінювання $\lambda \cong 12$ см). Час опромінення становив 10, 14 та 17 секунд при потужності 750 Вт. Температуру вірусної суспензії вимірювали до та після опромінення. При

опроміненні протягом 10 с температура піднялася до 39 °С, при 14 с – до 42,7 °С, а при 17 с – до 47,6 °С. Дозу поглиненої радіації D визначали за формулою $D = c(t_2 - t_1)$, де $c = 4,2$ Дж/г•°С – питома теплоємність води, а $t_2 - t_1$ – різниця кінцевої та початкової температур (тобто, після та до опромінення). Таким чином, дози становили 50,6 Дж/г при опроміненні протягом 10 с, 69 Дж/г при 14 с та 92 Дж/г при 17 с.

Температура. Для дослідження впливу температури на інфекційність іридовіруса комара вірусомісну суспензію прогрівали при температурі 45 °С та 60 °С протягом 30 хв.

З кожного зразка дослідного та контрольного матеріалу робили 10-кратні розведення в стерильній дистильованій воді. Перед інфікуванням в інокулят додавали антибіотики пеніцилін (100 од/мл) та стрептоміцин (100 мкг/мл) і витримували 2 год при температурі 27 °С. Матеріалом з кожного розведення інфікували личинки великої вошиної молі. Інфіковані личинки інкубували в стерильних чашках Петрі при кімнатній температурі. Через 14 днів визначали наявність вірусу в кожній личинці методом блакитних осадів. Інфекційний титр іридовіруса комара визначали за загальноприйнятими методами [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали результати електронно-мікроскопічних досліджень віріони іридовіруса комара *Aedes flavescens* мають зовнішню ліпідну оболонку та внутрішню ліпідну мембрану. Між ліпідними оболонками локалізується білковий капсид. Віріони мають гексагональну форму, їх діаметр складає 200 ± 5 нм. На рис. 1 представлено електронно-мікроскопічні дослідження іридовіруса комара *Aedes flavescens*.

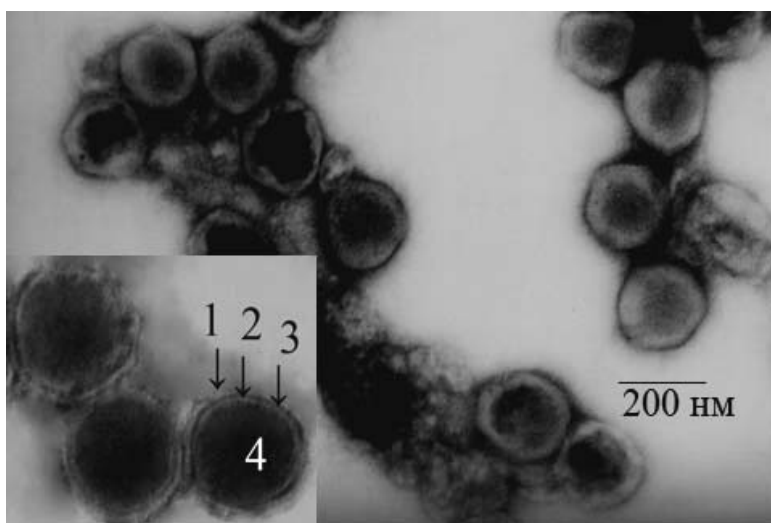


Рис.1. Іридовіруса комара *Aedes flavescens*: 1 – зовнішня ліпідна оболонка, 2 – білковий капсид, 3 – внутрішня ліпідна мембрана, 4 – нуклеопротеїд ($\times 20000$).

Інфекційність віріонів МІВ *Aedes flavescens* знижувалась при збільшенні температури. Так при температурі 30 °С протягом 4 год інфекційний титр вірусу не змінювався порівняно з контролем. При

температурі 45 °С протягом 30 хв інфекційність МІВ *Aedes flavescens* знижувалась всього на $0,75 \lg ID_{50}$, а експозиція вірусу при температурі 60 °С фактично його інактивувала (табл.1). Деякі представники

родини *Iridoviridae* є термолабільними вірусами, до того ж вони довгий час зберігається у воді, що можливо обумовлено складною ультраструктурою їх оболонки. Температурна інактивація всіх іридовірусів відбувається впродовж 30-60 хв при температурі 55-60 °С [8]. Отримані нами дані узгоджуються з літературними.

УФ та електромагнітне випромінювання по різному впливали на інфекційний титр іридовірусу комара. Так, УФ-опромінювання знижувало інфекційний титр майже вдвічі, тоді як електромагнітні коливання при досліджуваній потужності не впливали на інфекційність MIV (табл.1). Відомо, що мішенню для УФ є ДНК вірусу, яка під дією випромінювання незворотно денатурує. Мікрохвильова радіація на

біологічні об'єкти має сукупний ефект – температурний та радіаційний. Температурний ефект полягає в локальних перегрівках або різкому збільшенні температури за короткий проміжок часу, що може призводити до порушення життєвоважливих функцій. Було показано [9], що смертність піддослідних організмів зростає зі збільшенням поглинутої дози опромінювання. Оскільки віруси - це облигатні внутрішньоклітинні паразити субмікроскопічного розміру, а поглинута доза опромінювання характеризувалась збільшенням температури, яка не перевищувала температуру інактивації вірусу, нами було показано що електромагнітні коливання при досліджуваній потужності не впливали на інфекційність вірусу (табл. 1).

Таблиця 1.

Вплив температури, ультрафіолетового та електромагнітного опромінювання на інфекційність іридовірусу комара *Aedes flavescens*.

Фактор впливу	Час експозиції	Доза та температура	Інфекційний титр, lg ID ₅₀
УФ	30 хв		3,36
Електромагнітне опромінювання	10 с	50,6 Дж/г, 39 °С	6,83
	14 с	69,0 Дж/г, 42,7 °С	6,83
	17 с	92,0 Дж/г, 47,6 °С	6,63
Температура	4 год	30 °С	7,0
	30 хв	45 °С	6,25
	30 хв	60 °С	1,38
Контроль			7,0

Таблиця 2.

Вплив органічних розчинників та рН на інфекційність іридовірусу комара *Aedes flavescens*.

Фактор впливу	Концентрація	Час експозиції та температура	Інфекційний титр, lg ID ₅₀
Хлороформ	50%	1 год, 25 °С	4,14
Ефір	50%	1 год, 25 °С	7,0
NaOH, рН 11,0	0,1 М	1 год, 25 °С	3,0
Цитратний буфер, рН 3,0	0,1 М	1 год, 25 °С	1,48
Контроль		1 год, 25 °С	7,0

На відміну від іридовірусів хребетних, які є чутливими до дії ефіру, іридовірус комара *Aedes flavescens* виявився стійким до дії цього розчинника. Інфекційний титр іридовірусу комара *Aedes flavescens* становив 10⁷ ID₅₀ мл⁻¹. Стійкість іридовірусів комах до дії ефіру можна пояснити складною будовою оболонки віріонів. Так, внутрішня ліпідна мембрана, що відповідає за стабільність вірусів у водному середовищі знаходиться під білковим капсидом та зовнішньою ліпідною оболонкою. Стійкість іридовірусів комах до ефіру також може бути обумовлена високим (27%) вмістом фосфатидилінозитола, який є кислим фосfolіпідом і ефіром повністю не екстрагується.

При обробці вірусної суспензії хлороформом інфекційний титр іридовірусу комара *Aedes flavescens* порівняно з контролем знижувався на 3 порядки і становив 2×10^{4,14} ID₅₀ мл⁻¹.

Представники родини *Iridoviridae* характеризуються різним ступенем чутливості до органічних розчинників. Якщо більшість іридовірусів

чутливі до хлороформу, то наприклад *Sericesthis iridescent virus* (PIV-2) стійкий як до ефіру, так і до хлороформу [10].

Спільним для всіх іридовірусів є їх чутливість до кислого та лужного середовища. Так інфекційність іридовірусу комара *Aedes flavescens* різко знижувалась при рН 3,0 та 11,0. Результати впливу хімічних речовин, їх концентрацій та тривалість експозиції представлено в таблиці 2.

В даний час в багатьох вірусологічних лабораторіях світу проводиться вивчення фізико-хімічних властивостей іридовірусів та аналіз послідовностей їх ДНК. Дані про фізико-хімічні характеристики іридовірусу комара *Aedes flavescens* можуть знадобитися при вивченні ролі компонентів вірусної оболонки в процесі взаємодії з клітиною та можливо обґрунтують різну ступінь чутливості іридовірусів хребетних та безхребетних до фізико-хімічних факторів довкілля.

Література

1. Бучацкий Л.П. Иридовирусы. – Киев: Вища школа. Изд-во при Киев. ун-те, 1981. – 120 с.
2. Martinez G., Christian P., Marina C., Williams T. Sensitivity of Invertebrate iridescent virus 6 to organic solvents, detergents, enzymes and temperature treatment // *Virus Res.* – 2003. – 91. – P. 249-254.
3. Walker D.P., Hill B.J. Studies on the culture, assay of infectivity and some *in vitro* properties of lymphocystis virus // *J. gen. Virol.* - 1980. - 51. – P. 385-395.
4. Qin Q.W., Chang S.F., Ngoh-Lim G.H., et. al. Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina* // *Dis. Aquat. Org.* - 2003. – Vol 53. – P. 1-9.
5. He J.G., Zeng K., Weng S.P., Chan S.M. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) // *Aquaculture.* - 2002. – P. 11-24.
6. Reed L., Muench H. A. simple method of estimating fifty percent endpoints // *Am. J. Hy.* - 1938. – 27. – P. 493-497.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, №1. – P. 265 – 275.
8. Chinchar V. G., Essbauer S., He J. G., Hyatt A., Miyazaki T., Seligy V. Williams T. Family Iridoviridae. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Edited by Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A. San Diego: Elsevier/Academic Press. – 2005. – P. 150–162.
9. Григор'єва О.О., Вакуленко О.В. Вплив мікрохвильового опромінення на деякі гідробіоти // *Біополімери і клітина.* – 2004. – Т. 20, № 4. – С. 347-350.
10. Wrigley N. G. An electron microscope study of the structure of *Sericesthis* Iridescent Virus // *J. Gen. Virol.* – 1969. - Vol 5. – P. 123-134.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ИРИДОВИРУС КОМАРА *Aedes flavescens***Рудь Ю.П.**

Исследовано влияние на инфекционность иридовируса комара (MIV) *Aedes flavescens* органических растворителей, температуры, pH, ультрафиолетового и электромагнитного излучения. Показано, что MIV чувствительный к хлороформу, но стойкий к действию эфира. Инфекционность MIV снижается при pH 3.0 и 11.0 и под действием ультрафиолетового излучения, а при температуре 60 °C на протяжении 30 мин иридовирус комара инактивируется. Электромагнитное излучение и температура 45 °C не влияли на инфекционность вируса.

Ключевые слова: иридовирус комара, физические и химические факторы, инфекционний титр.

EFFECT OF PHYSICAL AND CHEMICAL FACTORS ON MOSQUITO IRIDESCENT VIRUS *Aedes flavescens***Rud Y.P.**

The sensitivity of Mosquito iridescent virus (MIV) *Aedes flavescens* to organic solvents, pH, heat treatment, UW and electromagnetic radiation was assayed by injection of inoculum into larvae of *Galleria mellonella*. MIV was sensitive to chloroform but not sensitive to ether. Sensitivity was detected following treatment by pH 3.0 and 11.0 and UW radiation. Viral activity was reduced by heating to 60 °C for 30 min. No sensitivity was detected to electromagnetic radiation and heating to 45 °C for 30 min.

Key words: Mosquito iridovirus, physical and chemical factors, viral activity.