

## КУЛЬТИВУВАННЯ ХЛАМІДІЙ НА РІЗНИХ КЛІТИННИХ КУЛЬТУРАХ

Данілова І. С.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної  
і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

*У роботі наведені дані щодо культивування ембріонального штаму хламідії «Лисячий» на перещеплюваних культурах клітин легенів ембріону корови (ЛЕК) та коронарних судин теляти (КСТ). Проведена мікроскопія препаратів із зараженими хламідіями культурами клітин на покривних скельцях за методами Стемпа та Романовського-Гімза. Охарактеризовано цитопатичну дію на перещеплюваних культурах клітин. Розмноження в різних культурах підтверджено дослідженнями в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР).*

Проблема хламідіозу сільськогосподарських тварин останнім часом набуває все більшої гостроти. Це захворювання завдає суттєвих економічних збитків перш за все, через недоодержання молодняка та високу його летальність (50-70 %) і втрату репродуктивної здатності маточного поголів'я. Останнє має особливо тяжкі наслідки для племінних господарств, оскільки зводиться нанівець багаторічна селекційна робота і такі господарства втрачають статус племінних [1].

Хламідіоз – небезпечна контагіозна хвороба сільськогосподарських, диких та домашніх тварин. Збудник хвороби – облигатний внутрішнь-оклітинний мікроорганізм, який відносять до дрібних бактерій родини Chlamydiaceae, яка поділяється на два роди: Chlamydia і Chlamydophila. На хламідіоз хворіють також собаки, коти, хутрові звірі, лабораторні тварини (кролі, морські свинки, білі миші, щури) [2, 5].

Питому вагу хламідіозів у патології тварин визначає необхідність розробки і удосконалення методів діагностики даних захворювань [3]. Вирішальне значення у виявленні хламідійних інфекцій мають методи їх лабораторної діагностики.

Прогрес вірусологічних знань став можливим у результаті широкого використання клітинних культур. Методи культивування клітин дозволяють вивчати морфологію і цитогенетику нормальних та дегенерованих клітин, а також досліджувати фізіологічні та біохімічні процеси, які властиві живим організмам, в умовах, найбільш близьких до природних [4, 6].

Виявлення та ідентифікація хламідій, культивування їх та накопичення великої кількості хламідійного матеріалу для виробництва вакцин, вивчення взаємовідносин між хламідією і клітиною – всі ці питання вирішують з використанням методу клітинних культур.

Дивлячись на це, можна сказати, що немає практично жодної галузі експериментальної біології, де б не використовували цей метод.

Культивування хламідій здійснюється за вірусним типом. При цьому використовують чутливі клітинні системи, які включають: організм лабораторних тварин, курячих ембріонів та культури клітин. Найбільш при-

датною моделлю для первинного виділення, послідуєчого культивування хламідій, вивчення їх біологічних властивостей, удосконалення старих і розробки нових методів діагностики є курячі ембріони [8]. Однак цей метод недостатньо точний для кількісних і деяких біохімічних досліджень. Для цієї мети найбільш зручним методом є культивування хламідій на культурах клітин.

Виділення хламідій на культурі клітин, оброблених різними метаболітами, є одним з найкращих методів лабораторної діагностики хламідіозу. До теперішнього часу «золотим стандартом», який був запропонований К. Т. Ripa and P. A. Mardon, який полягає в ізоляції і прямому виявленні хламідій у біологічних зразках, вважають чутливими до них клітинні культури [7]. Цінність культурального методу складається з того, що на сьогодні є єдиним способом, який дозволяє визначити життєздатність збудника, вибрати антибактеріальний препарат для лікування і оцінити ефективність терапії. Тому розширення спектру клітинних ліній, які забезпечують високу репродуктивну активність збудників хламідіозів людини і тварин є важливою задачею.

Метою нашої роботи було культивування ембріонального штаму хламідій «Лисячий» та охарактеризувати прояв цитопатичної дії на перещеплюваних культурах клітин ЛЕК та КСТ. За допомогою світлової мікроскопії виявити елементарні та ретикулярні тільця хламідій шляхом фарбування препаратів за методами Стемпа та Романовського-Гімза.

**Матеріали і методи.** В роботі використовували перещеплювані культури клітин ЛЕК та КСТ. Було проведено пасажування ембріонального штаму хламідій «Лисячий» на перещеплюваній культурі клітин ЛЕК в кількості 7 пасажів та на КСТ — 5 пасажів. Попередньо культури клітин було досліджено на наявність ДНК та РНК мікоплазм, хламідій, вірусів інфекційного ринотрахеїту, вірусної діареї та лейкозу шляхом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Для досліджень взято штаму хламідій «Лисячий», який нам було надано для роботи доктором ветеринарних наук, професором, заслуженим діячем науки і техніки АР Крим Ковальовим В. Л.. Цей штаму був виділений та постійно підтримувався на 7-денних розвинених курячих ембріонах, шляхом зараження їх в жовтковий міхур.

Перещеплювані культури клітин вирощували у пеніцилінових флаконах зі скельцями з додаванням 10 % нативної сироватки крові великої рогатої худоби і культивували їх за температури 37°C. На наступну добу всі флакони зі скельцями проглядали під мікроскопом, з неповним моношаром культури клітин — вибраковували. А з останніх ростове середовище видаляли, промивали поживним культуральним середовищем Ігла та вносили по 0,5см<sup>3</sup>, на кожен флакон, суспензії хламідій з жовткових міхурів на фізіологічному розчині з рН — 7,2 у співвідношенні 1:1. Залишали у термостаті на 2 години за температури 37°C для адсорбції хламідій на клітинах. Для контролю на відсутність росту бактеріальної та грибової мікрофлори робили висіви на МПА, МПБ та середовище Сабуро (ДСТУ 4483). Потім додавали підтримуюче середовище, в якості якого використовували живильне середовище Ігла в кількості 1,5 см<sup>3</sup>.

Кожен день флакони зі скельцями проглядали під мікроскопом. Через три доби після зараження скельця виймали, фіксували метиловим спиртом і фарбували за методом Стемпа та Романовського-Гімза, а рідину використовували як вихідний матеріал для дослідження в ПЛР. Ізоляцію сумарної ДНК проводили за допомогою комерційного набору для екстракції ДНК «ДНК-сорб В». Реакцію ампліфікації проводили за допомогою базових наборів АмпліСенс (Російська Федерація) та системи праймерів СНОМР\_191/371.

Електрофоретичний аналіз проведений за допомогою набору для електрофорезу виробництва НВО «Нарвак», Російська Федерація. Концентрація агарози в гелі 1 %, при 120 В.

Моношар культур клітин фарбували фуксином Циля в розведенні 1:10 та проглядали під мікроскопом (об'єктив ІЧ10).

Флакони зі скельцями лише з підтримуючим середовищем Ігла були контрольними.

**Результати досліджень.** Про репродукцію хламідій у культурі клітин оцінювали за цитопатичною дією, яку виявляли мікроскопічно і характеризували шляхом морфологічних змін клітин. Хламідії, які звільнилися при руйнуванні одних клітин, інфікували інші клітини, які через деякий час також гинули. В результаті чого замість суцільного клітинного моношару залишалися лише окремі клітинні острівки.

Зміни в заражених культурах клітин враховували шляхом перегляду флаконів зі скельцями під малим збільшенням мікроскопу. При аналізі цитопатичної дії відмічали:

- 1) інтенсивність цитопатичних змін;
- 2) швидкість прояву ЦПД;
- 3) зміни рН середовища.

При культивуванні ембріонального штаму хламідій «Лисячий» на перещеплених культурах клітин ЛЕК та КСТ ми відмічали значну вакуолізацію цитоплазми клітин. Ці вакуолі містили мілкі кокоподібні структури, а саме – хламідії. Ці вакуолі були дещо збільшені стосовно нормальних клітин.

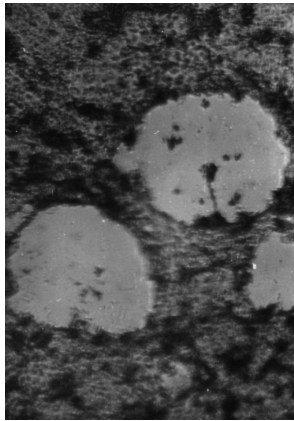
При світловій мікроскопії препаратів за методом Романовського-Гімза відмічалась повна деструкція цитоплазми клітин. Остання являла собою гігантську вакуоль, яка була заповнена хламідіями. Ядро відтіснялося на периферію клітин. Крім цього відмічали утворення симпластів. Скупчення вакуолей супроводжувалося формуванням структур із розташованих поруч клітин і ядер. За формою і розмірами вакуолі були різними. Частина з них заповнена мікроорганізмами, а частина – не заповнена. Ядро не завжди зміщено на периферію клітини. Іноді воно розташовувалося в центрі симпласту. При фарбуванні препаратів на культурах клітин ЛЕК та КСТ за методом Романовського-Гімза на фіолетовому фоні виявляли червоні хламідії, які були розташовані як поодинокі, так і купками. При фарбуванні за методом Стемпа – на зеленому фоні клітин знаходили червоні хламідії.

Після появи цитопатичної дії культуральну рідину, яка містила хламідії, заморожували за температури мінус 10°C та залишали до наступ-

ного пасажу. Перед зараженням цю рідину наполовину розморожували за кімнатної температури, зливали у флакон та використовували для подальших досліджень.

В 3 пасажі цитопатичну дію на культурі клітин ЛЕК реєстрували вже через 24 години, тоді як в 1 та 2 пасажах ЦПД проявлялася через 48-60 годин, яка супроводжувалась округленням та відділенням клітин від скла, частковим руйнуванням моношару.

Виражена цитопатична дія хламідій на культурі клітин КСТ проявлялась в 3 пасажі через 48 годин, а в 1 та 2 пасажах через 72-80 годин і супроводжувалась дифузною зернистістю і округленням клітин, відділенням їх від скла і утворенням у моношарі вакуолей, заповнених хламідіями (рис. 1).



**Рис 1.** Характер цитопатичної дії хламідій у моношарі клітин, пофарбованих фуксином Циля.

На рисунку видно, утворення бляшок різного розміру та навколо них скопчення мертвих клітин, які пофарбовано у більш темний колір.

Цитопатична дія на культурі клітин ЛЕК проявлялася в першому пасажі через 48-60 годин після зараження. Моношар поступово руйнувався, а саме відбувалися некротичні зміни у ядрах клітин. Клітини округлялися і відокремлювалися від скла і утворювали в моношарі пусті зони, які були оточені дегенеруючими клітинами. Клітини ставали зернистими, зморщеними та при невеликому взбавуванні легко відокремлювалися від скла. А в третьому пасажі вже через 24 години формувалися пусті зони в клітинному моношарі, тобто проявлялася цитопатична дія.

Протягом досліджень ми враховували зміну рН середовища. При культивуванні ембріонального штаму хламідій «Лисячий» рН середовища змінилася у кислоту сторону лише у першому пасажі, а в подальшому культуральна рідина залишалася насичено червоного кольору та прозорою.

При культивуванні ембріонального штаму хламідій «Лисячий» на культурі клітин КСТ цитопатична дія проявлялася у третьому пасажі через 72 години після зараження, а в четвертому пасажі вже через 24 години. Про це свідчать дані таблиці 1.

**Таблиця 1** — Визначення чутливості хламідій, залежно від часу їх культивування в різних культурах клітин

<i>Культура клітин</i>	<i>Час культивування, годин</i>	<i>Пасаж</i>	<i>ЦПД</i>	<i>Культура клітин</i>	<i>Час культивування, годин</i>	<i>Пасаж</i>	<i>ЦПД</i>
ЛЕК	24	I	-	КСТ	24	I	-
		II	-			II	-
		III	+			III	-
		IV	+			IV	+
		V	+			V	+
	48	I	-		48	I	-
		II	+			II	-
		III	+			III	+
		IV	+			IV	+
		V	+			V	+
	72	I	+		72	I	+
		II	+			II	+
		III	+			III	+
		IV	+			IV	+
		V	+			V	+

У контрольних флаконах зі скельцями впродовж всього досліду клітинний моношар залишався суцільним, ядра клітин і самі клітини мали правильну форму. Культуральне середовище залишалось прозорим, клітини міцно прикріплені до скла і при невеликому взбобтуванні не відокремлювалися від нього.

Для підтвердження результатів була поставлена полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) на наявність ДНК хламідій у культуральній рідині в лабораторії епізоотології та молекулярної діагностики ННЦ «ЛЕКВМ».

**Висновки.** Описана репродукція штаму хламідій «Лисячий» в перешеплюваних культурах клітин ЛЕК та КСТ, яка супроводжувалась різним ступенем ЦПД у вигляді загибелі й злущування округлих клітин та формування окремих бляшок у моношарі клітин. Специфічність ураження перешеплюваних культур клітин ЛЕК та КСТ хламідіями підтверджено також у ПЛР.

### Список літератури

1. Стегній, Б., Бабкін, А., Ксьонз, І. Індикація ДНК хламідій у препаратах біологічної промисловості методом // Вет. медицина України . — 2002. — № 11. — С. 19-22. 2. Бортничук, В. А. Хламидиоз свиней — К.: Урожай, 1991 — 191с. 3. Терских, И. И. Орнитоз и другие хламидийные инфекции — М.: Медицина, 1979 — 229 с. 4. Хазипов, Н.З., Гафаров, Х.З. Хламидиозы сельскохозяйственных животных — М.: Колос, 1984 — 223с. 5. Верхивовський, О. М., Абрамов, А.В. та інші. Настанова із лабораторної діагностики хламідійних інфекцій сільськогосподарських тварин — 2006 р. — 44 с. 6. Laboratory diagnosis of infection diseases. Principles and practice. V. II. Viral, rickettsial and chlamydial diseases / Publ. Health Foundation, Berkeley; Ed.: Lennette E.H., Halonen P., Murphy F.A. — New York (USA): Springer — Verlag New York Inc. — 1988. — 961 p. 7. Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis / S.J. Rasmussen, L. Eckmann, A.J. Quayle, L. Shen et al. // J. Clin. Invest. — 1997. — V. 99. — P. 77-87. 8. Караваяев, Ю., Мельник, Н., Соколов, М. Хламидийные инфекции животных // Животноводство России. — 2005. — №3. — С.33-35.

## CULTIVATION OF CHLAMYDIA ON DIFFERENT CELL CULTURES

Danilova I. S.

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

*Data of cultivation of embryo culture of Chlamydia «Fox» on cell cultures of lungs to embryo of cow (LEC) and coronal vessel of calf (CVT) are presented in the paper. Microscopy of preparations is conducted with infected cell cultures Chlamydia on intermediary glasses by the methods of Stemp and Romanovsky-Gimza. Cytopathic action on cell cultures of LEC and CVT is described. Reproduction in different cultures is confirmed by the researchers in chain reaction.*