

**ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ЗБУДНИКІВ ХЛАМІДІОЗІВ НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАНІЙ ЛІНІЇ КЛІТИН McCoу З ВИКОРИСТАННЯМ АМІНОКИСЛОТ**

**Гончаренко В.В., Джораєва С.К., Кучма І.Ю., Гайдучок І.Г., Мельник А.Л., Пилигін С.В., Волянський А.Ю., Волков Т.О., Ляхман С.М., Первомайська О.Е.**

ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України», м. Харків

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України», м. Харків

Серед проблем, що виникли за останні роки перед медициною в Україні, актуальним визнане завдання організації епідеміологічного моніторингу за збудниками, що циркулюють на території країни. Проблема хламідійних інфекцій визнається однією із пріоритетних у галузі охорони здоров'я. За поширеністю та спектром патології вона посідає провідне місце серед захворювань, що передаються статевим шляхом [1]. На фоні високої частоти виявлення хламідій, непатогномонічності хламідійної інфекції, схильності до персистентного існування в організмі, особливу значущість набувають діагностичні методи, спрямовані на встановлення етіологічного фактору захворювання, тісно пов'язані з виділенням патогенного агенту та подальшим вивченням його біологічних властивостей. Важко переоцінити значення виділення чистих культур цього мікроорганізму [2, 3].

Неперевершеною перевагою культурального методу є виділення тільки живих форм мікроорганізму. Ця властивість відмінно відрізняє цей метод від будь-яких інших. Виділення збудника у перещеплюваних клітинних лініях є переважним методом вибору при встановленні етіологічного діагнозу при складних формах захворювання. Культуральний метод вважається оптимальним для контролю виживаності пацієнтів, оскільки молекулярні методи через свою високу чутливість можуть давати хибно позитивні результати. Крім того, цей метод є незамінним при дослідженнях біологічних властивостей мікроорганізму, що дозволяє створювати моделі взаємодії між клітиною та паразитом, що в свою чергу сприяє розкриттю механізмів персистенції інфекції, випробуванню нових протихламідійних препаратів

Методологічні основи вивчення біології хламідій базуються на здібності цих мікроорганізмів до облигатного внутрішньоклітинного паразитування, тому для первинного виділення лабораторних штамів хламідій використовують різноманітні лінії перещеплюваних клітинних культур: McCoу – клітини синовіальної оболонки людини, L 929 – трансформовані мишачі фібробласти, HeLa – клітини карциноми шийки матки, Her-2 – клітини карциноми гортані людини та ін. Ці клітинні популяції не тільки чутливі до проникнення хламідій, але й дозволяють їм активно розмножуватися [4].

За традиційною методикою виділення збудника у перещеплюваних клітинних культурах, до збагаченого ембріональною телячою сироваткою та глюкозою ростового середовища 199 додають циклогексимід – інгібітор ібілкового синтезу еукаріотних клітин, який уповільнює метаболізм цих клітин і, таким чином, непрямо стимулює розмноження хламідій [5,6]. Але навіть у невеликих дозах, циклогексимід спричиняє цитотоксичну дію на клітини моношару, яка виявляється у вакуолізації цитоплазми клітин, наявності клітин з виростами цитоплазми та ін., що в свою чергу ускладнює підрахунок отриманих результатів. Крім того, головним недоліком цього поживного середовища є низька концентрація L-цистеїну-HCl та L-триптофану – амінокислот, які є важливими та незамінними для хламідій, особливо у період їх інтенсивного росту і розмноження. Важливо зауважити, що L-триптофан входить до складу головного білка зовнішньої мембрани хламідій, який завжди знаходиться на поверхні хламідій, відповідаючи за процес прикріплення хламідій до клітин та виконуючи функцію порину [7].

У лабораторії хламідіозів ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України» є наробітки щодо використання L-цистеїну-HCl у якості метаболіту, що покращує процес виділення збудника хламідіозів у перещеплюваних клітинних лініях, завдяки активізації та прискоренню метаболізму мікроорганізму [8].

Тому метою нашого дослідження було обрано підбір оптимальних концентрацій L-цистеїну-HCl, та L-цистеїну-HCl у поєднанні з L-триптофаном у поживному середовищі для поліпшення процесу діагностичного виділення та накопичення біомаси збудника у наступних пасажах на перещеплюваній клітинній лінії McCoу.

**Матеріали та об'єкт дослідження.** У роботі використовували клітинну лінію McCoу, оскільки хламідії, які виділяють з різних типів біологічного матеріалу, мають тропізм до цієї клітинної культури [3].

У якості біологічного матеріалу була використана синовіальна рідина хворого Д., який знаходився на стаціонарному лікуванні у ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України» з приводу хвороби Рейтера та тест-штам *S.trachomatis* UGC, отриманий у лабораторії хламідіозів ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України», який попередньо пасивувався на перещеплюваній клітинній культурі McCoу. Культивування проводили за стандартною методикою: в стерильні плоскодонні пробірки діаметром 14 мм з накривними скельцями засівали по 1 мл клітинної суспензії лінії McCoу ( $1 \times 10^5$  клітин/мл) на ростовому середовищі 199 з 3 % вмістом ембріональної телячої сироватки, 5 % розчину глюкози, гентаміцину 100 мкг/мл та амфотеріцину В 2,5 мкг/мл, після чого поміщали на 24 години у термостат при 35-37 °С для формування моношару. Після формування моношару, із пробірок з добовою клітинною культурою видаляли ростове середовище, розподіляли по 500 мкл біологічного матеріалу на кожну пробірку та центрифугували протягом години при 3000 об/хв (2400g) у центрифугу з горизонтальним ротором, інкубували у термостаті при 35-37 °С протягом 2 годин. Після інкубації у термостаті, з пробірок видаляли збагачене ростове середовище та змінювали його на поживне.

Для експерименту пробірки з біологічним матеріалом були розподілені на 3 групи:

— у першій контрольній групі поживне середовище складалося з середовища 199 – до 90 %, ETC – 5%, розчину глюкози – 5 %, циклогексиміду – 1,0 мкг/мл, гентаміцину – 100 мкг/мл та амфотеріцину В – 2,5 мкг/мл;

— у другій дослідній групі пробірок після центрифугування до поживного середовища додавали L-цистеїн-HCl у концентрації 2,5 мг/л: який попередньо розчиняли у стерильному фізіологічному розчині *ex tempore* в асептичних умовах та додавали до поживного середовища.

— у третій дослідній групі пробірок після центрифугування до поживного середовища додатково додавали L-цистеїн-HCl у концентрації 2,5 мг/л разом з L-триптофаном у кількості 20 мг/л, розчинені попередньо у фізіологічному розчині *ex tempore* в асептичних умовах.

Усі групи пробірок інкубували в термостаті за 35-37 °С впродовж 48-72 годин, після чого з пробірок видаляли накривні скельця, забарвлювали за методом ПФ та Мая-Грюнвальда-Гімзи.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Було проведено культивування синовіальної рідини від хворого Д., який знаходився на стаціонарному лікуванні у ДУ «Інститут дерматології та венерології АМН України» з приводу хвороби Рейтера та тест – штаму *S. Trachomatis* UGC. Біологічні зразки культивувались упродовж 3 пасажів на перещеплюваній клітинній культурі McCoу у стандартному поживному середовищі, стандартному середовищі з додатковим внесенням 2,5 мг/л L-цистеїну-HCl та

стандартному середовищі з додатковим внесенням 2,5 мг/л L-цистеїну-НСІ та 20 мг/л L-триптофану. Дані проведених досліджень наведені у таблицях 1-2.

**Таблиця 1** – Накопичення біомаси збудника при культивуванні еталонного штаму Ugc у стандартному поживному середовищі та середовищах з амінокислотами

Тип поживного середовища	Кількість інфікованих збудником клітин (підрахунок на 500 клітин)	$n_{cp}$	%	P
Стандартне	$n_1=185$ $n_2=168$ $n_3=172$	175±11	35,0	P<0,001
Стандартне з L-цистеїном-НСІ	$n_1=362$ $n_2=348$ $n_3=315$	342±24	68,4	P<0,05
Стандартне з L-цистеїном-НСІ та L-триптофаном	$n_1=438$ $n_2=425$ $n_3=432$	431±10	86,2	

**Таблиця 2** – Накопичення біомаси збудника при культивуванні синовіальної рідини у стандартному поживному середовищі та середовищах з амінокислотами упродовж 3 пасажів

Тип поживного середовища	Кількість інфікованих збудником клітин (підрахунок на 500 клітин)	$n_{cp}$	%	P
стандартне	$n_1=158$ $n_2=167$ $n_3=161$	162±8	32,4	P<0,001
Стандартне з L-цистеїном-НСІ	$n_1=324$ $n_2=302$ $n_3=308$	311±8	62,2	P<0,02
Стандартне з L-цистеїном-НСІ та L-триптофаном	$n_1=402$ $n_2=378$ $n_3=387$	389±17	77,8	

Як видно з таблиці 1, кількість клітин, які мали включення збудника, була максимальною – 86,2 % – при культивуванні – тест-штаму *S. Trachomatis* UGC у поживному середовищі з L-цистеїном-НСІ та L-триптофаном. При використанні поживного середовища з додатковим внесенням L-цистеїну-НСІ, кількість клітин моношару, що містили морфологічні структури збудника, склала 68,4 %. У випадку застосування стандартного поживного середовища кількість інфікованих збудником клітин дорівнювала 35,0 %.

Дані таблиці 2 свідчать, що застосування L-цистеїну-НСІ у поєднанні з L-триптофаном для культивування збудника, виділеного з синовіальної рідини, також виявилось досить ефективним прийомом: кількість клітин, що містили морфологічні структури збудника, становила 77,8 %. Кількість клітин, які мали включення збудника при стандартному культивуванні, дорівнювало 32,4 %, при культивуванні з L-цистеїном-НСІ – 62,2 %.

Таким чином, встановлено, що додаткове внесення цих амінокислот до поживного середовища має позитивний ефект не тільки на процес підтримання у перещеплюваній культурі клітин виділеного штаму, а й на первинне діагностичне виділення збудника з біологічного матеріалу. Кількість клітин, що мали включення збудника виросло у 2,5 рази для тест-штаму *S. trachomatis* UGC, та у 2,4 рази для синовіальної рідини.

Внесення циклогексими́ду до поживного середовища, в якому проводиться діагностичне виділення збудника, є загальноприйнятим прийомом, але ця речовина виявляє досить токсичну дію на моношар клітин, яка виявляється у дегенеративних змінах у клітинах. Оскільки стан клітин моношару, у якому проводиться діагностичне виділення збудника, має вирішальне значення, нами постійно проводяться дослідження, направлені на пом'якшення цитотоксичного впливу циклогексими́ду на моношар клітин. У процесі проведення експерименту був відзначений позитивний вплив застосування L-цистеїну-НСІ та L-триптофану на стан клітинної культури. Кількість клітин, які мали дегенеративні зміни, викликані циклогексими́дом, зменшилась з 78,6% до 59%. Дані цього спостереження наведені у таблиці 3.

**Таблиця 3** – Зниження цитотоксичної дії циклогексими́ду при наявності у поживному середовищі L-цистеїну-НСІ та L-триптофану

Тип поживного середовища	Кількість інфікованих збудником клітин (підрахунок на 500 клітин)	$n_{cp}$	%	P
Стандартне	$n_1=370$ $n_2=412$ $n_3=397$	393±29	78,5	P<0,05
Стандартне з L-цистеїном-НСІ та L-триптофаном	$n_1=280$ $n_2=294$ $n_3=310$	295±15	59,0	

## **Розділ 8. Патологія тварин, клінічна біохімія, якість і безпека тваринницької продукції**

Таким чином, Найбільш оптимальним прийомом для виділення збудника та накопичення його біомаси виявилось застосування поживного середовища з вмістом 2,5 мг/л L-цистеїну-НСІ у поєднанні з L-триптофаном у концентрації 20 мг/л. Кількість клітин, що містили морфологічні структури збудника, становила 86,2% до тест-штаму *S. Trachomatis* UGC, що у 2,5 разів більше, ніж при стандартному культивуванні. Кількість клітин, що містили включення збудника, для синовіальної рідини становила 77,8 %, що у 2,4 разів більше, ніж при стандартному культивуванні.

Внесення L-цистеїну-НСІ у концентрації 2,5мг/л до поживного середовища упродовж 3 пасажів збільшило кількість клітин, що мали включення збудника до 68,4% для тест-штаму *S. Trachomatis* UGC та до 62,2 % для синовіальної рідини .

Застосування запропонованого нами прийому (L-цистеїну-НСІ разом з L-триптофаном) дозволило знизити кількість клітин, що мали дегенеративні зміни, обумовлені застосуванням циклогексїмїду, з 78,6 % до 59 %. Поліпшений стан клітинної культури в свою чергу сприяє кращому розвитку збудника та спрощує процес підрахунку клітин, які містять морфологічні структури збудника.

### *Список літератури*

1. Мавров, И.И. Актуальные медико-социальные проблемы хламидийной инфекции // Дерматология и венерология. – 2001. – №1 (11). – С. 37-41. 2. Сельнікова, О.П., Поліщук, О.І., Колтукова, Н.В. Музей патогенних для людини мікроорганізмів: Принципи формування та перспективи розвитку// Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях. Роботи співробітників Музею патогенних для людини мікроорганізмів. – К. – 2000. – Вип. 1. – С. 4-17. 3. Black, С.М. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections // Clin. microbiol. Rev. – 1997. – Vol.10. – №1. – Р. 160-184. 4. Herbrink, P., Zuyderwijn-Zwinkels, M., Wagenwoort, J. Comparison of different culture media for isolation of Chlamydia trachomatis by cell culture on HeLa cells // Eur.J.Clin. Microbiol Infect Dis. – 1991. – № 10. – Р. 655-659. 5. Кутова, В.В., Джораєва, С.К. Досвід виділення хламідій у культурі клітин //Дерматология та венерология. – 2004. – №2 (24). – С. 81-84. 6. Шаткин, А.А., Бескина, С.Р., Мартынова, В.Р. Усовершенствование метода культивирования гальпроний (хламидий) в культуре клеток // Журн.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1981. – №1. – С. 24-28. 7. Мавров, Г.І. Хламідійні інфекції: біологія збудників, патогенез, клініка, діагностика, лікування та профілактика. Монографія. – К., 2005. – 524 с. Рос.мовою. 8. Кутова, В.В. Некоторые особенности использования L-цистеина для стимуляции размножения хламидий в культуре клеток.// Журн. дерматологии. и венерологии. – 2000. – №1(11). – С. 33-35.

### **CULTIVATION PECULIARITIES OF CLAMIDIOSIS AGENTS ON THE CELL LINE McCoy WITH AMINOACID APPLICATION**

**Goncharenko V.V., Dzhorayeva S.K., Kuchma I.Yu., Gayduchok I.G., Mel'nik A.L., Pilugin S.V., Volyansky A.Yu., Volkov T.O., Lahman S.M., Pervomays'ka O.E.**

*SE "Institute of dermatology and venerology AMS of Ukraine", Kharkiv,*

*SE "Institute of microbiology and immunology AMS of Ukraine named after I.I. Mechnikov", Kharkiv*

*It was described the methodological approaches, which was used for the diagnostic chlamydiosis isolation and accumulation of its biomass in cell culture McCoy with using of L-cysteine-hydrochloride and L-tryptophan.*

УДК 636.09:616.99:636.4

## **ПОШИРЕННЯ ІЗОСПОРОЗНОЇ ТА ЕЙМЕРІОЗНОЇ ІНВАЗІЙ СВИНЕЙ У ГОСПОДАРСТВАХ ТЕРНОПІЛЬСЬКОЇ ОБЛАСТІ**

**Данко М.М.**

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, м. Львів*

Важливою проблемою свинарства є діареї у новонароджених та відлучених поросят, що є причиною значних втрат серед молодняку свиней. Патогенними чинниками діареї у поросят можуть бути віруси, бактерії, а також найпростіші. Серед останніх значна роль належить кокцидіям родів *Isospora* та *Eimeria*.

Установлено, що збудник *I. suis* є патогеном, який успішно конкурує в кишечнику поросят-сисунів з бактеріями та вірусами. Driesen [1], досліджуючи понад 1000 проб фекалій за діареї поросят, виявив ооцисти *I. suis* у 53 % поросят-сисунів, натомість збудники *E. coli* та ротавірусних інфекцій лише у 18,2 % та 16,9 % поросят. Привертає увагу той факт, що майже у 2/3 поросят, уражених *I. suis*, цей автор не виявив інших патогенів, і лише у 1/3 поросят реєстрував *E. coli* та ротавіруси.

Аналогічні результати отримали Wieler [2], досліджуючи поросят дво- та тритижневого віку за ізоспорозної та Koudela [3], обстежуючи відлучених поросят – за еймеріозної інвазії.

З огляду на значне поширення кишкових кокцидіозів у свинарських господарствах сусідніх з Україною держав: Польщі [4], Угорщині [5], Словаччині [6] і відсутність будь-яких даних щодо епізоотологічної ситуації з ізоспорозу та еймеріозу у західних областях нашої країни, проведення досліджень з даної проблеми є важливим та актуальним.

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проведені в 6 свинарських господарствах Тернопільської області впродовж 2010 року. Копроскопічні обстеження свиней різних статевих-вікових груп здійснювали флотаційним методом з насиченим розчином аміачної селітри. Ідентифікацію кокцидій проводили після культивування ооцист у 2 % розчині двохромовокислого калію до завершення їх споруючості [4].

**Результати досліджень.** У результаті проведених досліджень 1690 проб фекалій установлено, що екстенсивність ізоспорозної інвазії свиней у господарствах Тернопільської області складала 12,2 % (табл. 1). Найвища екстенсивність виявлена у поросят-сисунів – 46,3 %. Поросята-відлучники були уражені на 0,8 %, свиноматки – на 1,2 %. Відгодівельні підсвинки та ремонтний молодняк, а також кнури були вільними від інвазії *I. suis*.

Ооцисти еймерій виявлено у 560, або у 33,1 % досліджених проб. Найвища екстенсивність еймеріозної інвазії встановлена у поросят-відлучників віком 2-4 місяці – 51,0 %. Інвазованість відгодівельних підсвинків та ремонтного молодняку складала 41,3 %, свиноматок – 40,0 %. В обстежених кнурів та поросят віком до 2-х екстенсивність інвазії була найнижчою – 13,9 % та 1,8 % відповідно.

Аналіз результатів дослідження свиней в окремих господарствах області наведено в таблиці 2. На фермах, де утримується більше 100 свиноматок, екстенсивність ізоспорозної інвазії у поросят до 2-місячного віку складала (47,3-48,4) %, у середніх за поголів'ям господарствах 50-100 свиноматок – (42,9-43,5) %, у малих господарствах до 50-ти свиноматок – (23,1-27,8) %.