УДК: 619:616.981

ВІДПРАЦЮВАННЯ ОПТИМАЛЬНИХ РЕЖИМІВ КУЛЬТИВУВАННЯ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ ХЛАМІДІЇ НА ПЕРЕЩЕПЛЮВАЛЬНИХ ЛІНІЯХ КУЛЬТУР КЛІТИН

Н. П. Ненич

Чернігівська обласна лабораторія ветеринарної медицини

Наведені дані про ефективність культивування ембріональної хламідії в культурі тканин (нирки сірійського хом'яка, сайги, ембріона свині). Найкращий ріст хламідій виявлено на клітинах нирки сайги.

Ключові слова: ХЛАМІДІЇ, КУЛЬТИВУВАННЯ, КУЛЬТУРА НИРОК, КУР'ЯЧІ ЕМБРІОНИ

Хламідіоз — одна з найпоширеніших інфекційних хвороб, для якої характерні поліморфізм клінічних ознак, хронічний перебіг і соціальна небезпека. Описані захворювання на хламідіоз 20-ти видів тварин та 130-ти видів птиці практично у всіх частинах світу. Природна чутливість людей досягає 100 % [6]. До 1963 року хламідії розглядались як атипові віруси [3]. Подальші дослідження показали подібність хламідій з бактеріями, особливо з рикетсіями: вони містять ДНК і РНК; розмножуються шляхом поділу; чутливі до сульфаніламідів та антибіотиків; грамнегативні; мають клітинну стінку. Але між хламідіями і рикетсіями існують певні відмінності, у хламідій не виявлений власний енергетичний метаболізм і відсутня система переносу електролітів, яка є у рикетсій [1, 7, 10]. Хламідії є облігатними внутрішньоклітинними бактеріями (розмір 250–300 нм). При первинному інфікуванні вони уражають епітелій бар'єрних систем організму. Раніше хламідій називали гальпровіями або бедсоніями, а з 1980 р. збудників хламідійних інфекцій почали зараховувати до родини *Chlamydiaceae*. На основі філогенетичного аналізу 16S та 23S рРНК генів встановлені відмінності між видами хламідій (таб. 1), що грунтуються на філогенетичних, морфологічних і екологічних характеристиках [9, 11].

Таблиця 1

Порядок родини хламідій

Порядок Chlamydiales				
Родина Chlamydiaceae		Родина Parachlamydiaceae	Родина Simkaniaceae	Родина Waddliaceae
Рід Chlamydia	Род lamydophila	Рід Parachlamydia	Род Simkania	Род Waddlia
C.muridarum *C.trachomatis* *C.suis*	*C.abortus* *C.felis* *C.caviae* *C.pecorum* *C.pneumoniae* *C.psittaci*	*P.acanthamoebae*	*S.negevensis*	*W.chondrophila*

Chlamydia trachomatis, яка була відкрита раніше за інших хламідій (Prowazek S., 1907), є найбільш вивченим представником порядку Chlamydiales. На сьогодні C.trachomatis розглядається як найбільш розповсюджений бактеріальний збудник захворювань, що передаються статевим шляхом. За даними ВОЗ (1996), кількість випадків інфекції, що викликає C.trachomatis в світі, щорічно становить близько 90 млн [12].

В Україні епізоотична ситуація з хламідіозу тварин остаточно не з'ясована, оскільки до 2007 року на цю інфекцію обласні лабораторії ветеринарної медицини дослідження проводили лише в окремих випадках і на недостатньому методичному рівні через відсутність діагностикумів. Районні лабораторії ветеринарної медицини взагалі лабораторних досліджень на хламідіоз не проводять. Проте, за даними окремих авторів, хламідійна інфекція широко розповсюджена у південних регіонах країни [2, 4, 5].

У 1972 році вивчення хламідіозів було включено до програми досліджень Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ). Ця програма передбачає вивчення етіології, діагностики, поширення, лікування і профілактики хламідіозів тварин і людей.

У зв'язку з сказаним вище, виготовлення якісних, принципово нових вакцин проти хламідіозу має на сьогодні велике значення, оскільки економічна ефективність культивування ембріональної хламідії в культурі клітин значно вища порівняно з культивуванням на курячих ембріонах за рахунок зниження витрат на вихідні матеріали, інтенсифікації виробничого процесу та ін.

Метою нашої роботи було відпрацювання технології культивування ембріональної хламідії в різних культурах клітин.

Матеріали і методи

У роботі використали перещеплювальні культури:

1. Перещеплювальна лінія клітин нирки новонародженого сірійського хом'ячка ВНК 21/13 модальний клас становлять клітини, які містять 36 хромосом (21 %). Клітина фібробластоподібна.

2. Перещеплювальна лінія клітин нирки сайги ПС модальний клас становлять клітини, які містять 48 хромосом (32 %). Клітини мають стабільний каріотип. Клітина полігональної форми з чіткими межами і округлим ядром з 3–5 ядрами, цитоплазма не вакуолізована.

3. Перещеплювальна лінія клітин нирки ембріону свині (версенізована) СПЕВ. Гереройдна популяція з набором хромосом від 26 до 94. Моношар складається з прозорих дрібнозернистих епітеліоподібних клітин.

Маточну культуру клітин зберігали при 196^0 в рідкому азоті. Маточну культуру в ампулах отримуємо у ДНКІБШМ.

Власні дослідження

Відповідно до робочої програми було проведено підбір оптимального субстрату (культур клітин) для культивування ембріональної хламідії. Для цього було використано такі культури клітин: ПС, СПЕВ, ВНК-21/13.

Проводили відпрацювання оптимальних режимів культивування ембріональної хламідії шляхом зараження перерахованих вище культур клітин таким чином:

1) 5 пробірок (ПС) — заражали хламідією в розведенні 10^{-1}, в дозі 1см^3;
5 пробірок (ПС) — заражали хламідією в розведенні 10^{-2}, в дозі 1 см^3;
5 пробірок (ПС) — заражали хламідією в розведенні 10^{-3}, в дозі 1 см^3.

2) 5 пробірок (СПЕВ) — заражали хламідією в розведенні 10^{-1}, в дозі 1 см^3;
5 пробірок (СПЕВ) — заражали хламідією в розведенні 10^{-2}, в дозі 1 см^3;
5 пробірок (СПЕВ) — заражали хламідією в розведенні 10^{-3}, в дозі 1 см^3.

3) 5 пробірок (ВНК-21/13) — заражали хламідією в розведенні 10^{-1}, в дозі 1 см^3;
5 пробірок(ВНК-21/13) — заражали хламідією в розведенні 10^{-2}, в дозі 1 см^3;
5 пробірок(ВНК-21/13) заражали хламідією в розведенні 10^{-3}, в дозі 1 см^3.

4) 5 пробірок (2 — ПС, 2 — ВНК-21/13, 1 — СПЕВ) — контроль (для спостереження за зміною зовнішнього вигляду незараженої культури клітин).

Основні дані у таблиці2.

Таблиця 2

Схема зараження культур клітин хламідією

Культура клітин	Кількість пробірок, яку заражали в дозі 1 см^3			Контроль
	Розведення 10^{-1}	Розведення 10^{-2}	Розведення 10^{-3}	
ПС	5	5	5	2
СПЕВ	5	5	5	1
ВНК-21/13	5	5	5	2

Культури клітин з хламідією та контрольні зразки поміщали на 2 години в термостат. Після цього зливали поживне середовище, заливали підтримувальним середовищем і культивували в термостаті протягом 3 днів при t –37 ºС. Кожний день проводили мікроскопію моношару культури клітин, спостерігаючи за його видозміною під впливом хламідії та порівнюючи з контролем. Проводили злив матеріалу та подальше пасажування за тим же методом до 5 пасажу.

Після зливу 5-го пасажу проводили зараження 7-добових курячих ембріонів в дозі 0,2 $см^3$ в жовтковий мішок за загальноприйнятою методикою, по 5 ембріонів на кожне розведення з кожної культури клітин. Ембріони інкубували в інкубаторі протягом 12 днів. Перші 5 днів констатували їх неспецифічну загибель, 6–7 днів — специфічну. Титрування на ембріонах дозволило встановити титр хламідії, який становить 4 log БТО 50/мл на ПС, 3 - на ВНК-21/13, 1 — на СПЕВ. В подальшому з метою підвищення титру проводили зараження лише ПС та ВНК-21/13, оскільки на СПЕВ були отримані незадовільні результати. Після проведення повторних 3-х пасажів (до 10) та титрування на курячих ембріонах отримали такі титри: ПС — 5 log БТО 50/мл, ВНК-21/13 — 2 log БТО 50/мл, після цього провели ще три пасажі. Отримали той самий титр.

Повторне зараження культур клітин (ПС та ВНК-21/13), починаючи з першого пасажу матеріалом з нативної хламідії проводили до 7-го пасажу. Після титрування на курячих ембріонах отримали наступні результати: титр на ПС — 4 1og БТО 50/мл, на ВНК-21/13 — 1.

Як поживне середовище для вирощування культури клітин використовували синтетичне стандартне середовище 199 без антибіотика, з додаванням сироватки крові в кількості 10 % від загального об'єму.

Як підтримувальне середовище використовували середовище 199 без антибіотика та без додавання сироватки крові. Після 8–10-ти пасажів культуру клітин переміщують до кріобанку. При необхідності використовується для подальшого пасажування.

Висновоки

Проведено пасажування хламідії на різних культурах клітин, її титрування на курячих ембріонах, в результаті чого отримані такі результати: найвищим був титр хламідії на культурі клітин ПС-4 1og БТО 50/мл, дещо нижчий на ВНК-21/13 2–3 log БТО 5О/мл, низький на СПЕВ — 1–0 log БТО 50/мл після перших 7 пасажів. При подальшому пасажуванні титр поступово знижувався.

N. P. Nenych

THE ELABORATION OF OPTIMAL REGIME OF EMBRIO CHLAMIDIA CULTIVATION ON TISSUE CULTURES

S u m m a r y

The data about the effectiveness of culturing of embryonic Chlamydia in tissue culture (kidney of Syrian hamster, sage, pig embryo). The best Chlamydia growth was shown on cells of sayge kidney.

Chernigiv regional laboratory of veterinary medecine

1. Инфекционная патология животных. Под редакц. А. Я. Самуйленко, В. Н. Сюрин, Е. С. Воронин. — Москва, 2003. — Том V. — 208 с.

2. *Медвідь О. О.* Розповсюдження хламідіозної інфекції та вивчення ізолятів хламідій, виділенних від овець// Вет.мед.: Міжвідомчий темат. наук. зб. — Х., 2004. — Вып. 84. — С.479–483.

3. *Мошковский Ш. Д.* Природа вирусов и их место в системе живого // Вести. АМН СССР. — 1963. — № 1. — 37–39.

4..Зоонозные хламидиозы в Южном регионе Украины. / Нехороших З. Н., Малікова М. В., Бощенко Ю. А., и др // Аграрний вісник Причорномор'я. — Одеса, 2002. — С. 25–32.

5. Розповсюдження та клінічний прояв хламідіозів у тварин. / Павленко М. С. та ін. // Тваринництво України. — 1998. — № 7. — С. 14–15.

6. *Ремезов А. П., Неверов В. А., Семенов Н. В.* Хламидийные инфекции (клиника, диагностика, лечение). — СПб. — 1995. — 43 с.

7. *Хазипов Н. З., Равилов А. З.* Хламидиозы сельскохозяйственных животных. — М., 1984. — 224с.

8. *Эйдельштейн И. А.* Фундаментальные изменения в классификации хламидий и родственных им микроорганизмов порядка Chlamydiales // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. — 1999. — Том 1, № 1. — С. 5–11.

9. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam.nov. and Simkaniaceae fam.nov.,each containing one mono typic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. / Everett K. D. E.et al. //Inter. J. Syst. Bacterial. — 1999. — V.49. — P. 415–440.

10. *Moulder J. W.* Metabolic capabilities and deficiencies of rickettsiae and psittacosis group // Int. J. Leprosy. — 1965. — V. 33. — P. 494.

11. Analysis of the 16S rRNA gene of micro organism WSU 86 1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales:proposal of Waddliaceae fam.nov., Waddlia chondrophila gen.nov., sp.nov. / Rurangirwa F. R. et al.//Int. J. Syst. Bacteriol. — 1999. — V. 49. — P. 577–581.

12. *Stephens R. S.* Chlamydia.Intracellular Biology, Pathogenesis,and Immunity. — Washington: ASM Press. — 1999. — P. 143–146.