

ОРИГІНАЛЬНІ ПІДХОДИ ДО УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ ІЗОЛЯЦІЇ ЕКСТРАГЕНІТАЛЬНИХ ХЛАМІДІЙ ВІД ЛЮДЕЙ І ТВАРИН

Гайдучок І.Г., Джораєва С.К., Волков Т.О., Пилюгін Ю.Б., Бузинна Ю.Б., Гушилик Б.І.

«Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків

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

У гуманній та ветеринарній медицині хламідіози проявляють себе вельми агресивно на тлі широкого та нераціонального застосування антибіотиків, сульфаніламідів, антисептиків і дезінфектантів, а також на фоні суттєвого зниження природного протиінфекційного захисту та набутих імунодефіцитів.

Робота присвячена вельми важливому та актуальному розділу інфекційної патології людини і тварин – хламідійній інфекції. Про складність проблеми свідчить постійний довготривалий інтерес дослідників до біології збудників, ще не означеної чітко систематиками, біологами, генетиками та мікробіологами. Так, таксономія хламідій та їх місце в ієрархії мікробів з часу ізоляції збудника трахоми (1907 р.) і псіттакозу (1929–1930 рр.) неодноразово змінювалась за мірою поглиблення вивчення їх біологічних властивостей та загальнобіологічної ролі в природі.

Якщо до 80-х років минулого століття були відомі лише два види хламідій, віднесених до одного роду *Chlamydia*, то на сьогодні вже означено, що хламідії як дрібні, грамнегативні, нерухливі та облігатно паразитуючі бактерії, що входять до одного порядку, 4 родин, кожне з яких вміщує від одного до 6 видів, які складаються з різної кількості біоварів і серотипів.

При цьому окремі види збудника є патогенними для тварин та людини.

Незвичайно широке коло господарів хламідій (більше 200 видів теплокровних, риб, молюсків, амеб, членистоногих) обумовлено їхньою високою біологічною пластичністю, валентністю, відсутністю хазяїноспецифічності, тканинним тропізмом. Така різноманітність властивостей збудника обумовлює широкий спектр ще недостатньо вивченої етіологічної ролі їх в патології тварин та людини.

У тварин на даний час відомо більше 30 спричинених хламідіями форм інфекційної патології. У людини зараз, крім відомих раніше багаточисленних форм інфекційної патології, доведена участь хламідій в етіології хвороб (артрити, атеросклероз, бронхіальна астма, інфаркт міокарду), що раніше вважались неінфекційними.

Вказане свідчить про те, що проблема хламідіозів зоонозного та антропонозного походження з метою розробки ефективних заходів профілактики та удосконалення епідагляду повинна розглядатися комплексно як з екологічних позицій, так і в конкретних клімато-географічних умовах, з урахуванням біології збудника, еколого-епізоотологічних, епідеміологічних даних, факторів антропогенної дії тощо.

При цьому в проблемі зоонозних хламідіозів, з яких найбільш вивченим є орнітоз, важливими являються такі аспекти, як природна осередковість, вплив ролі різних видів носіїв (диких птахів, диких ссавців) на умови формування природного осередку, його функціонування, активність та стійкість. Недостатньо вивчені й умови формування господарських антропогенних осередків не тільки орнітозу, але й інших зоонозних хламідіозів в змінених соціально-економічних умовах.

Залишаються недостатньо дослідженими питання ряду антропонозних хламідіозів, зокрема, їх екстрагенітальних форм.

Хламідійна інфекція за поширеністю та спектром патології посідає провідне місце серед захворювань, що передаються статевим шляхом, та являє собою серйозну проблему охорони здоров'я, яка є спільною для всіх розвинених країн світу. Так кожний рік у світі реєструється біля 89 млн. нових випадків захворювання. Розповсюдженість хламідійної інфекції в Україні складає 87,4 на 100 тис. населення, що свідчить про серйозність та масштабність захворюваності. Ця інфекція може мати хронічний та латентний перебіг з різними клінічними проявами з боку сечостатевого тракту, може спричинити розвиток висхідних та екстрагенітальних ускладнень, що нерідко призводить до порушень репродуктивної функції та безпліддя. Встановлено роль хламідій у патогенезі захворювань дихальної системи з виникненням бронхітів, ларингітів, синуситів, пневмоній. Доведено зв'язок між наявністю антитіл до *S. pleuropneumoniae* та розвитком тяжких ушкоджень з боку серцево-судинної системи, у тому числі таких важких, як інфаркт міокарду, та запальних захворювань опорно-рухового апарату [1, 2]. 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. Фундаментальні зміни, які відбулися в таксономії хламідій, у значній мірі обумовлені можливістю ізоляції та глибокого вивчення біологічних особливостей нових агентів, вилучених від різних господарів, на основі яких розроблені нові принципи видової ідентифікації [3].

Дослідження, які спрямовані на одержання нових штамів хламідій, грають важливу роль у роботі науково-дослідних і практичних лабораторій. Методологічні основи вивчення біології хламідій базуються на здібності цих мікроорганізмів до облігатного внутрішньоклітинного паразитування. Відомо два основних методи виділення чистих культур хламідій – ізоляція збудника на перещеплюваних лініях клітин і в жовткових мішках курячих ембріонів, що розвиваються. Для первинного виділення лабораторних штамів споріднених хламідійних мікроорганізмів використовують різноманітні лінії перещеплюваних клітинних культур, а для серійного культивування ізолятів доцільно застосовувати модель «*in ovo*» з використанням 6–7-денних курячих ембріонів, що розвиваються [4, 5].

Мета досліджень. Визначення можливостей застосування різних методичних підходів щодо оптимізації виділення збудника хламідіозу з сечостатевого тракту та екстрагенітальних вогнищ.

Матеріали та методи досліджень. Клінічним матеріалом для дослідження слугували: зіскрібки з різних ділянок сечостатевого та дихального тракту, синовіальна рідина, змиви та аспірат бронхів, кардіоваскулярні та судинні зразки, навколоплідні води, плацента. Внаслідок вираженої токсигенної дії синовіальної рідини, аспірату бронхів, навколоплідних вод на клітинні моделі, їх розводили поживним середовищем у 10-50 разів. Дослідження проводились на перещеплюваних клітинних лініях L929, Her-2, McCoу та 6-7-денних курячих ембріонах, що розвиваються, з використанням методів світової та люмінесцентної мікроскопії.

Результати досліджень та їх обговорення. Стан клітинної культури, яка застосовується для первинного виділення збудника хламідіозів, має вирішальне значення. Оскільки для хламідій характерна наявність тропізму до клітинних ліній, в яких вони паразитують, то вибір клітинної лінії визначається його цитопатичною дією та тропізмом збудника. Збудники виду *S. trachomatis*

проявляють тропізм до епітеліальних клітин сечостатевого, опорно-рухового трактів, тому виділення цього виду збудника доцільно проводити на фібробластоподібних клітинах ліній McCoу та L 929. Збудники виду *S. pneumoniae* розмножуються в альвеолярних макрофагах, моноцитах, епітелії дихальних шляхів та в ендотеліальних клітинах судин, тому вилучення цього збудника краще проводити на епітеліоїдній клітинній лінії Her-2 [6, 7]. Повноцінна популяція клітин може бути отримана тільки від покоління, яке складається з життєздатних клітин, які не мають ознак дегенерації. У нормальній культурі клітини вирізняються чіткими межами та володіють морфологічними ознаками, типовими для цієї тканини. Наявність великої кількості велетенських округлених клітинних елементів, порушення морфологічних характеристик, появлення клітин з вакуолями робить цю генерацію непридатною для використання з метою первинного вилучення збудника хламідіозу.

Важливе значення для успішного виділення мікроорганізму має використання належного транспортного середовища. У своїх дослідженнях для транспортування інфекційного матеріалу ми використовували середовище 199 з 5–10 % вмістом ЕТС та 5 % 40 мМ розчину глюкози і антибіотиків у концентрації: гентаміцину – 30 мкг/мл, ванкоміцину – 150 мкг/мл та амфотеріцину В – 2,5 мкг/мл, замість традиційного поживного середовища на основі сахарозо-фосфатного буфера [4].

Однією із задач, поставлених у нашому дослідженні, було отримання клітинного моношару з найменшою кількістю пошкоджених клітин. Для виконання цієї задачі в своїх дослідженнях замість класичного методу обробки клітин сумішшю розчинів версену та трипсину [5] використовували розчин альбуциду (30 мг/мл).

У результаті отримано дані, які доводять, що застосування розчину альбуциду є доцільним. Це підтверджено збільшенням мітотичного індексу клітин, що свідчить про більш інтенсивні процеси проліферації. Внаслідок цього клітини усіх ліній значно раніше формували суцільний моношар у порівнянні з клітинами, обробленими за класичною методикою. Крім того, знизилась кількість клітин, у яких спостерігалась вакуолізованість цитоплазми, вирости клітинної мембрани та деформовані ядра [8]. Така культура виявилася найбільш оптимальною для діагностичного вилучення збудника.

Більшість дослідників для діагностичного виділення хламідій застосовують різні способи, які стимулюють розмноження мікроорганізму в клітинах і підвищення їх адсорбції на моношар. З цією метою широко застосовують як самостійно, так і в різних комбінаціях додаткові методичні засоби: центрифугування інфекційного матеріалу на моношар клітин, ультрафіолетове опромінювання клітин, обробка клітин ДЕАЕ, поліетиленгліколем, циклогексимідом, які володіють цитостатичною дією та посередньо стимулюють розмноження хламідій. При застосуванні загальноприйнятих методів обробки клітин ліній L929, McCoу, Her-2: циклогексимідом-інгібітором білкового синтезу еукаріотичних клітин у концентрації 0,9–1,0 мг/мл [9], ми незмінно спостерігали інтенсивну вакуолізацію цитоплазми клітин, що не могло не впливати на репродукцію лабораторних ізолятів і результати діагностичного виділення хламідій із клінічних зразків. Тому нам у процесі досліджень необхідно було провести роботу в цьому напрямку. Для отримання результатів обрано метод обробки моношару клітин L-цистеїном – амінокислотою, яка входить до складу цистеїнівміщуючих білків структурної організації мембран різних форм хламідій.

Інфікування моношару клітин біологічним матеріалом здійснювали по стандартній методиці [5] з внесенням розчину L-цистеїну у концентрації 2,5–3,0 мкг/мл до поживного середовища з метою покращення проникнення збудника у клітини [10]. Облік результатів проводили після 48–72-годинної інкубації при температурі 35–37 °С. Виявлення морфологічних структур хламідій здійснювали за допомогою забарвлення препаратів за Май-Грюнвальда-Гімзою та методу прямої імуофлюоресценції. Застосування L-цистеїну у концентрації 2,5–3,0 мкг/мл не спричиняло вакуолізацію клітин, токсично не впливало на моношар, а сприяло збільшенню інфікування клітинної культури при діагностичному виділенню хламідій з клінічних зразків у 3–4 рази, та в наступних пасажах у 5–6 разів.

Однак, первинне виділення хламідій у культурі клітин з подальшим накопиченням біомаси збудника в послідовних пасажах, упродовж тривалого часу залишалось прерогативою високо патогенних штамів і не було доступно для більшості інших штамів, які мають менш виражену патогенність. На наш погляд, вказане обумовлено впливом на процес культивування факторів навколишнього середовища: чинники, які продукують клітини-господарі, антибіотики, колювання рівня необхідних поживних речовин, у тому числі амінокислот, а також температурні умови культивування. У таких випадках доцільно проводити пасивування на 6–7-денних курячих ембріонах, що розвиваються, оскільки тропізм мікроорганізму до клітин судин призводить до накопичення великої кількості антигену в судинних стінках оболонки жовткових лантухів. У 6–7 денних курячих ембріонів, що розвиваються, жовтковий лантух має найбільший об'єм, що полегшує інокуляцію матеріалу що досліджується та забезпечує велику клітинну поверхню для розмноження мікроорганізму. При чіткому виконанні усіх вимог методики суттєвою перевагою є також висока бактеріологічна чистота одержаних суспензій, оскільки замкнута поверхня яйця слугує надійним захистом від різної сторонньої мікрофлори. Курячі ембріони зручні та доступні для роботи, дозволяють одержувати порівняно велику кількість антигену в зараженому жовтковому мішку, у них проявляються чіткі симптоми інфекції.

Нами проведено дослідження можливості сумісного послідовного використання перещеплюваних клітинних ліній та курячих ембріонів, що розвиваються, з метою збільшення біомаси збудника та підтримання його життєздатності в подальших пасажах, як на культурах клітин, так і на курячих ембріонах.

У деяких випадках первинне діагностичне виділення хламідій на перещеплюваних клітинних лініях давало негативну відповідь, але при перенесенні даного матеріалу на жовткові лантухи курячих ембріонів, що розвиваються, ми отримували позитивний результат. Застосування курячих ембріонів обумовлює відмінні передумови їх використання для підвищення вірулентності отриманих ізолятів. При цьому проходить різке зростання кількості елементарних і ретикулярних тілець хламідій. Ізолят набуває достатньої вірулентності, і що саме головне, він набагато краще зберігає свою життєздатність при довгостроковій криоконсервації та здатний відновлятися в мінімальні терміни при необхідності розконсервування.

Висновки. Таким чином, використання запропонованого нами транспортного середовища, розчину альбуциду (30 мг/мл), цистеїну (2,5 мкг/мл) та методу сумісного послідовного використання перещеплюваних клітинних ліній та курячих ембріонів, що розвиваються, дозволяє удосконалити процес вилучення збудників хламідіозу із сечостатевих та екстрагенітальних осередків від хворих.

Список літератури

1. Мавров, И.И. Актуальные медико-социальные проблемы хламидийной инфекции [Текст] / И.И. Мавров // Дерматология и венерология. – 2001. – № 1(11). – С. 37–41.
2. Сельнікова, О.П. Музей патогенних для людини мікроорганізмів: Принципи формування та перспективи розвитку [Текст] / О.П. Сельнікова, О.І. Поліщук, Н.В. Колтукова // 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. Everett, K.D. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms [Text] / K.D. Everett, R.M. Bush, A.A. Andersen // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1999. – № 49. – P. 415–440. 4. Збудники хламідіозів: особливості методологічних заходів при ізоляції та ідентифікації штамів мікроорганізму [Текст] / В.В. Кутова // *Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокового зберігання в колекціях: роботи співробітників Музею патогенних для людини мікроорганізмів.* – К., 2004. – Вип. 3. – С. 80–84. 5. Урогенитальные хламидиозы [Текст] / А.А. Шаткин, И.И. Мавров. – К.: Здоров'я, 1983. – 200 с. 6. Roblin, P.M. Use of Hep-2 cells for improved isolation and passage of Chlamydia pneumoniae [Text] / P.M. Roblin, W. Dumornay, M. Hammerschlag // *Clin. Microbiol.* – 1992. – № 30. – P. 1968–1971. 7. Herbrink, P. Comparison of different culture media for isolation of Chlamydia trachomatis by cell culture on HeLa cells [Text] / P. Herbrink, M. Zuyderwijn-Zwinkels, J. Wagenwoort // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1991. – № 10. – P. 655–659. 8. Патент № 25661 Україна. G01N33/00. Спосіб пасивування клітинної культури L 929 [Текст] / І.І. Мавров [та ін.]. – № u200705527; заявл. 21.05.2007; опубл. 10.08.2007, Бюл. № 12. 9. Black, C.M. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections [Text] / C.M. Black // *Clin. microbiol. Rev.* – 1997. – Vol. 10, № 1. – P. 160–184. 10. Некоторые особенности использования L-цистеина для стимуляции размножения хламидий в культуре клеток [Текст] / В.В. Кутова [и др.] // *Дерматология та венерология.* – 2001. – № 1(11). – С. 33–35.

ORIGINAL APPROACHES TO IMPROVE METHODS EXTRAGENITAL CHLAMYDIA ISOLATION OF PEOPLE AND ANIMALS

Haiduchok I.G., Dzhoraeva S.K., Volkov T.O., Pilugin S.B., Buzynna J.B., Gushylyk B.I.

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

Institute of microbiology and immunology named after I.I. Mechnikov NAMSU, Kharkiv

The methodological techniques for the primary diagnostic isolation of the agent and its biomass accumulation in cell culture L929, Hep-2, McCoy and developing chicken embryo is described in the article.

УДК 619:578:616.98:578.831

ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПАРАМІКСОВІРУСІВ ТВАРИН

Герілович А.П., Лиманська О.Ю., Болотін В.І., Солодянкін О.С., Горайчук І.В., Ареф'єв В.Л.

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

Застосування молекулярно-біологічного підходу для вивчення еволюції живих організмів виявило його принципову перевагу порівняно з традиційним фенотиповим підходом, оскільки з'явилась можливість, з одного боку, порівняння віддалених організмів, які можуть не мати спільних фенотипових ознак, а з іншого боку, створення найбільш природної системи живих організмів, яка заснована на філогенетичних взаємовідносинах, що виникли в процесі еволюції [1].

Зміни структури біомакромолекул (ДНК, РНК, білків), закономірності та механізми цих змін є об'єктом вивчення молекулярної еволюції, зокрема одного з напрямків цієї науки – молекулярної філогенії. Для з'ясування філогенетичних взаємовідносин між різними видами організмів та уточнення часу їхньої дивергенції використовують методи визначення еволюційних дистанцій, сутність яких полягає у порівнянні нуклеотидних послідовностей гомологічних генів або амінокислотних послідовностей відповідних білків. Ступінь схожості первинної структури гомологічних генів напряму залежить від рівня філогенетичної спорідненості представників цих видів [2].

Нуклеотидні заміни є найчастішим видом молекулярно-генетичних подій, які накопичуються в ході молекулярної еволюції ДНК та РНК. Середня кількість нуклеотидних заміни на один сайт у двох гомологічних послідовностях біомакромолекул для двох видів організмів визначає еволюційну відстань, яка дозволяє встановити зв'язок між відмінностями на рівні ДНК або РНК та часом еволюції видів. Саме знання такої залежності дозволяє будувати філогенетичні дерева, датувати події молекулярної еволюції на основі порівняння послідовностей генетичного матеріалу [3]. Об'єктом дослідження молекулярної філогенетики є, зокрема, процеси реасортації та рекомбінації, які є відносно розповсюдженим явищем для вірусів, геном яких представляють дволанцюгову РНК, але систематично не вивчалися (за винятком ротавірусів) [4]. Зазначені процеси значно ускладнюють здійснення генотипування збудників інфекційних захворювань та, саме тому, потребують ретельного дослідження для створення сучасних засад ветеринарного супроводу галузі тваринництва та птахівництва України.

Метою даної роботи є вивчення філогенетичних взаємовідносин основних параміксовірусів тварин.

Матеріали та методи. Для проведення філогенетичного аналізу використовували програми Mega 4, ver. 4.0.2 [5]; POWER, ver. 1.0 [6]; PhyML ver. 3.0 [7]. Для побудови традиційних дендрограм на основі послідовностей генів і геномних РНК параміксовірусів використовували дистанційно-матричний метод – метод зв'язування найближчих сусідів (Neighbour joining) та максимальної економії (maximum parsimony). Як критерій достовірності топології отриманої дендрограми використовували індекси повторень (bootstrap).

Для проведення філогеографічних досліджень параміксовірусів сільськогосподарських тварин і птиці нами були вибрані 1) представники *Paramyxovirinae* роду: *Avulavirus* – параміксовіруси птиці 1-10 типів (avian paramyxovirus, APMV); *Henipavirus* – вірус Ніпа; *Morbillivirus* – вірус чуми ВРХ (rinderpest virus, RPV) та вірус чуми дрібних жуйних (peste-des-petits-ruminants virus, PPRV); *Respirovirus* – вірус парагрипу 3 великої рогатої худоби (BPH) (bovine parainfluenza virus, BPV) та параміксовірус свині (porsine paramyxovirus, PPMV); 2) представники *Pneumovirinae* роду: *Metapneumovirus* – метапневмовірус птиці (avian metapneumovirus, AMPV); *Pneumovirus* – пневмовірус ВРХ (bovine respiratory syncytial virus, BRSV).

Результати роботи. Особливості первинної структури параміксовірусів. Геном параміксовірусів представлений одноланцюговою несегментованою молекулою РНК негативної полярності довжиною близько 15 тисяч п. н., що кодує сім основних вірусних структурних протеїнів – фосфопротеїн (P), який утворює частину комплексу РНК-полімерази; матриксний протеїн (M), який організує та підтримує структуру вірionу; білок злиття (F) та вірусний оболонковий глікопротеїн з нейрамінідазою та гемогліцинуною активністю (HN); нуклеопротеїн (N); великий полімеразний протеїн L, а також варіабельні неструктурні білки NS1 та NS2 [8]. Множинне вирівнювання представлених у міжнародних базах даних послідовностей геномної РНК параміксовірусів, що циркулюють у різних географічних регіонах, показало, що найбільш консервативними є гени, що кодують протеїни M та L; найменш консервативними є гени, які кодують білки F та особливо HN (функціонування саме цих білків сприяє ініціації вірусної інфекції), що добре узгоджується з літературними даними [9–11] та свідчить про можливість генотипування з урахуванням результатів філогенетичного аналізу. Проведення філогенетичного аналізу на основі нуклеотидних послідовностей варіабельних генів дозволяє ідентифікувати