

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СВИНЕЙ МИКОПЛАЗМ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

КОЛЬЦОВА Т. Г., ЗУЕВ В. В.,
кандидаты ветеринарных наук

Несмотря на то, что способность микоплазм к внутриклеточному размножению установлена Хейфлик с соавторами в 1955 г. и подтверждена в других работах, исследования по выявлению возможности культивирования штаммов микоплазм, выделенных от свиней при энзоотической пневмонии, в различных культурах клеток проводились в единичных случаях (В. В. Зуев, Д. Ф. Осидзе, 1969).

Мы определяли возможность использования клеточных культур для поддержания и изучения микоплазм, выделенных от свиней. Так как большинство перевиваемых линий клеток спонтанно контаминированы микоплазмами, то для исследований мы использовали первоначально трипсинизированные культуры клеток куриных эмбрионов (ККЭ), почек поросят (СПТ — свиная почечная ткань) и почек ягнят (ПЯ).

В 50-миллилитровые флаконы или чашки Карреля вносили по 1 мл, а в пробирки с клеточным монослоем — по 0,2 мл микоплазмодержащей аллантоисной жидкости (титр $10^{5.5}$ ЕЛД_{50/мл}) штаммов С-4 и С-8. В контрольные флаконы или пробирки вносили аллантоисную жидкость от неинфицированных куриных эмбрионов.

Поддерживающая среда состояла из 0,5% гидролизата лактальбумина в растворе Хенкса, 5% сыворотки лошади или крупного рогатого скота, 0,1% дрожжевого экстракта (были и без дрожжевого экстракта). Инфицированные культуры инкубировали в термостате при 37° в течение 8—10 суток.

При отсутствии цитопатических изменений производили слепые пассажи через каждые 7 суток, а наличие микоплазм в культуральной жидкости определяли на чувствительной лабораторной модели (куриных эмбрионах — КЭ). Если в культуре клеток отмечали изменения, то материал для пассажей (не менее 5 проб) отбирали в период выраженного цитопатического эффекта, вызванного микоплазмами.

Сравнительную оценку чувствительности клеток к микоплазмам проводили по выраженности цитопатоген-

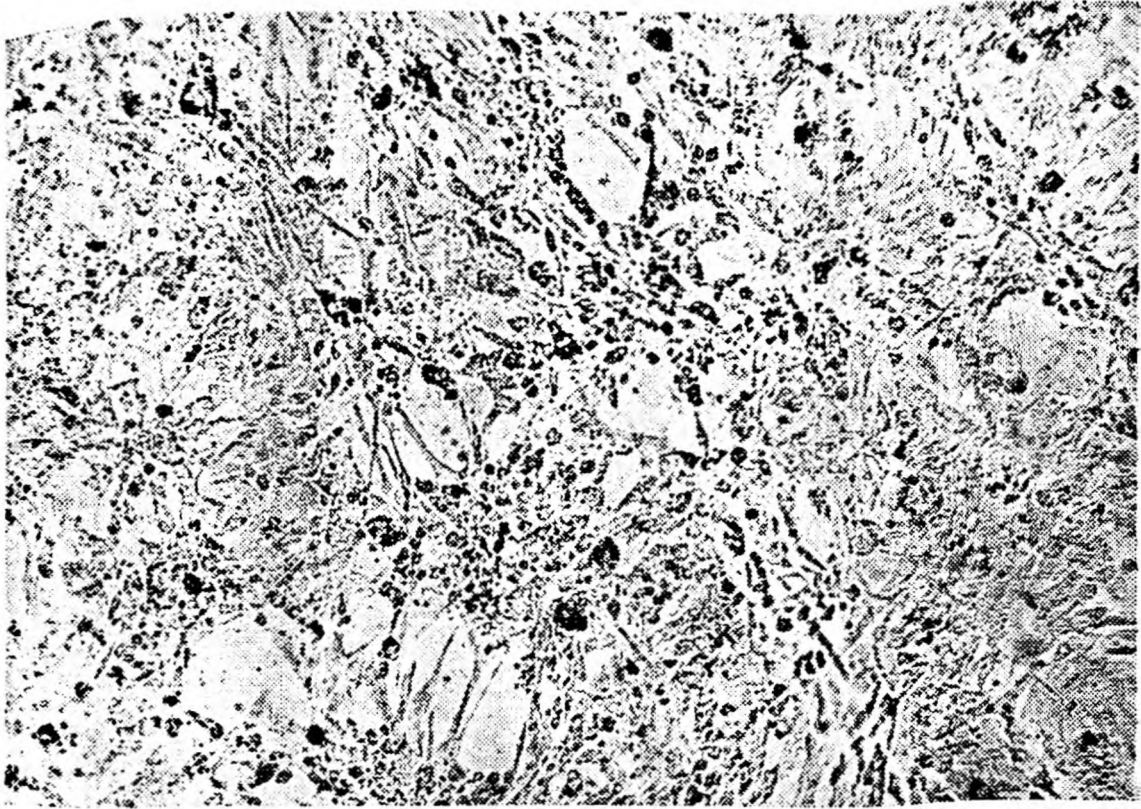


Рис. 1. Культура ККЭ на третьи сутки инфицирования. Штамм С-4.
Нативный препарат ($\times 90$).

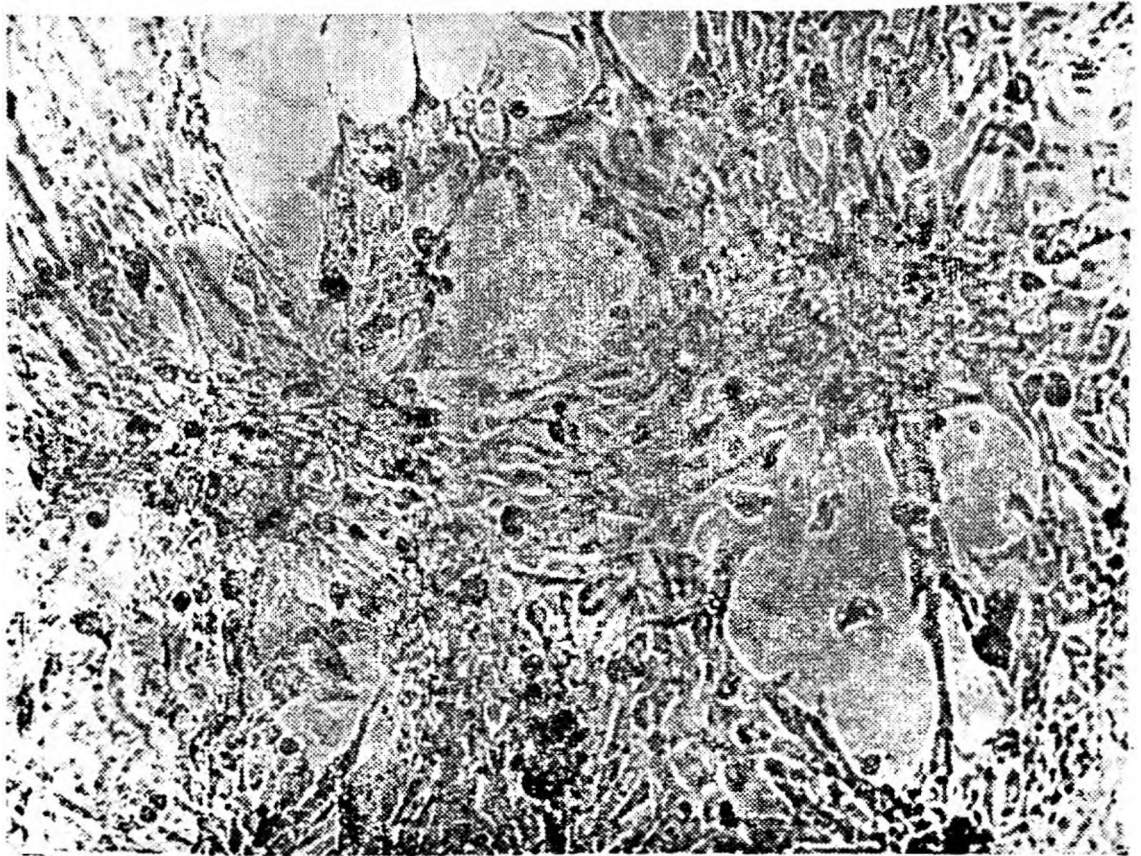


Рис. 2. Культура СПГ на 6-ые сутки инфицирования. Штамм С-8.
Нативный препарат ($\times 90$).

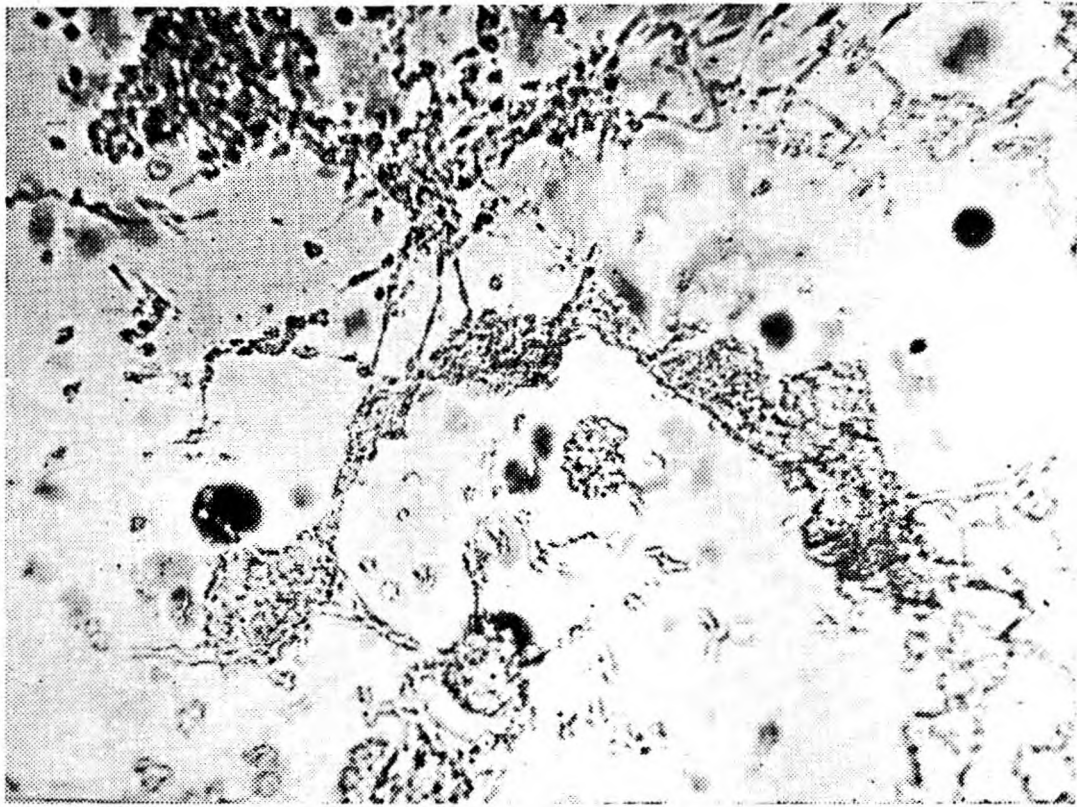


Рис. 3. Культура ККЭ на 6-ые сутки инфицирования. Штамм С-4.
Нативный препарат (×90).

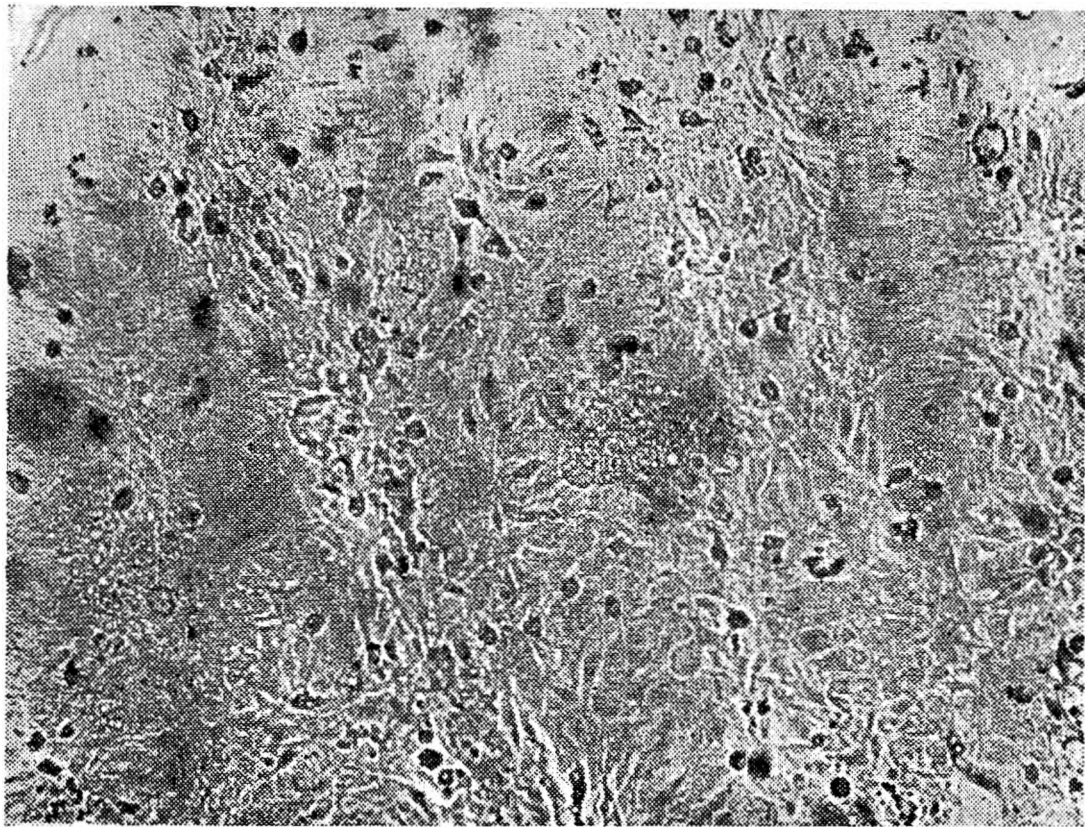


Рис. 4. Нормальная культура (контроль) ККЭ на 6-ые сутки роста.
Нативный препарат (×90).

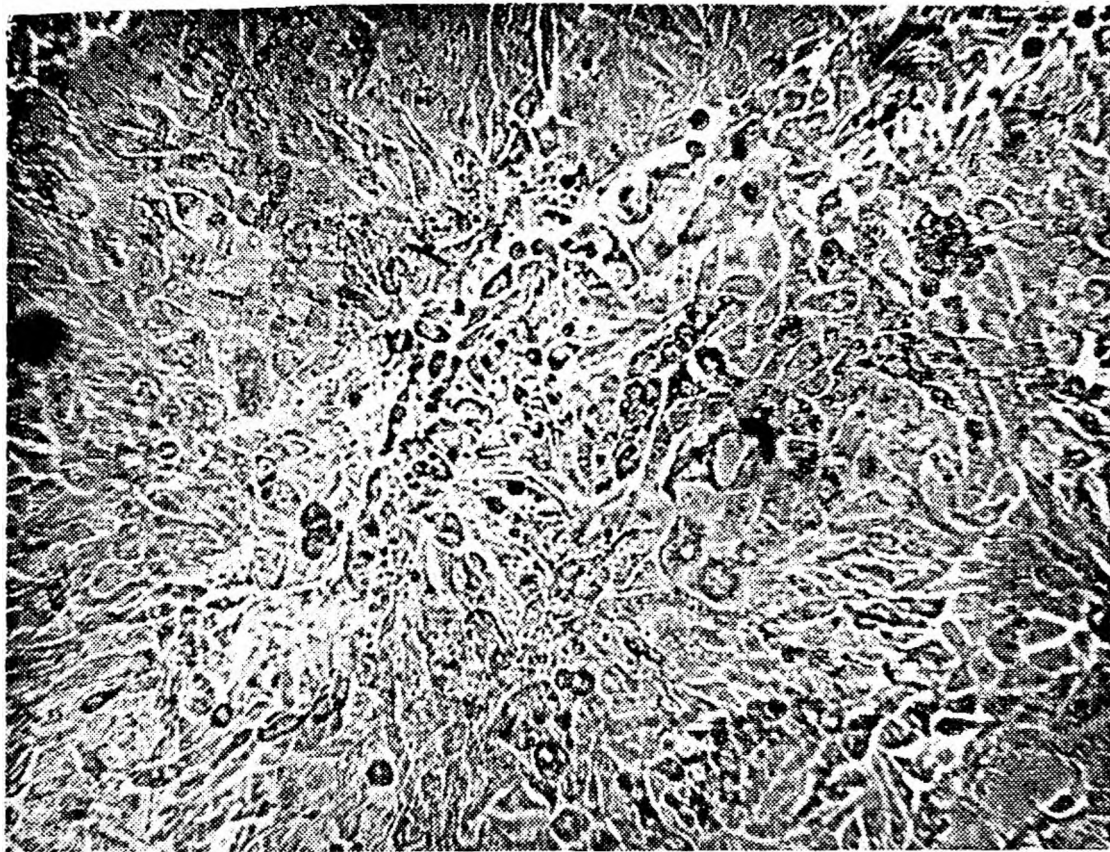


Рис. 5. Нормальная культура (контроль) СПТ на 10-ые сутки роста. Нативный препарат ($\times 90$).

ного действия микоплазм и методом титрования в гомологичной культуре и на КЭ.

При культивировании микоплазм в культурах клеток СПТ и ККЭ наблюдали цитопатические изменения (ЦПИ) в первом и последующих пассажах, характер ЦПИ и сроки его проявления были аналогичны.

На 3—5-е сутки после инфицирования в монослое появлялись небольшие «окна» и фибробластоподобные клеточные элементы (рис. 1). В дальнейшем наблюдали увеличение «окон», клеточный детрит, образование конгломератов из погибших клеток и появление вытянутых фибробластоподобных элементов с длинными отростками (рис. 2 и 3). Полная деструкция клеточного пласта наступала на 6—7-е сутки инкубирования. В неинфицированной культуре клеток таких изменений не отмечалось (контроль, рис. 4 и 5).

Культивирование микоплазм в клетках ПЯ в 5-серийных пассажах не сопровождалось цитопатогенным эффектом. Однако, высевая пробы культуральной жидкости каждого пассажа на бесклеточные среды, отмечали стабильный рост микоплазм.

При латентной форме инфекции в клетках почки ягненка микоплазмы хорошо размножались в культуре и к 5-му пассажу накапливались в титре 10^5 — $10^{5,33}$ ЕЛД_{50/мл} (титровали на КЭ). Данные о накоплении микоплазм в клетках в процессе серийного пассирования представлены в табл. 1.

Таблица 1

Накопление микоплазм в процессе культивирования в первично трипсинизированных культурах клеток при титровании на КЭ

| Штаммы микоплазм | Накопление микоплазм ($-lg$ ЕЛД _{50/мл}) в культурах клеток | | | | | | | | |
|------------------|--|------------|----------|----------|------------|----------|----------|------------|----------|
| | СПТ | | | ККЭ | | | ПЯ | | |
| | I пассаж | III пассаж | V пассаж | I пассаж | III пассаж | V пассаж | I пассаж | III пассаж | V пассаж |
| С-4 | 4,5 | 5,0 | 5,66 | 4,33 | 4,66 | 5,5 | 3,33 | 4,5 | 5,33 |
| С-8 | 4,5 | 5,33 | 5,5 | 4,33 | 4,5 | 5,5 | 3,33 | 4,33 | 5,0 |

Из табл. 1 видно, что в процессе культивирования микоплазм в культурах клеток СПТ, ККЭ, ПЯ происходит накопление их к 5-му пассажу в пределах $10^{5,0}$ — $10^{5,66}$ ЕЛД_{50/мл}.

Нами установлено, что все штаммы вызывали цитопатические изменения в клетках СПТ и ККЭ в течение 5 последовательных пассажей. Дальнейшие исследования касались выяснения возможности использования этих культур для количественной оценки накопления микоплазм (табл. 2).

Таблица 2

Накопление микоплазм в первично трипсинизированных культурах клеток СПТ и ККЭ по ЦПД

| Штаммы микоплазм | Титр микоплазм ($-lg$ ТЦД _{50/мл}) в культурах клеток | | | | | |
|------------------|--|------------|----------|----------|------------|----------|
| | СПТ | | | ККЭ | | |
| | I пассаж | III пассаж | V пассаж | I пассаж | III пассаж | V пассаж |
| С-4 | 4,0 | 4,66 | 5,66 | 2,33 | 3,5 | 5,33 |
| С-8 | 4,33 | 5,0 | 5,5 | 3,00 | 3,66 | 5,0 |

Как видно из табл. 2, культуры СПТ и ККЭ могут быть с успехом использованы для культивирования и определения титров микоплазм. По мере адаптации

штаммов С-4 и С-8 титр их, как правило, возрастает. При оценке накопления микоплазм в культуре клеток и на куриных эмбрионах существенных различий не установлено.

Преимущество метода культур клеток по сравнению с оценкой по гибели куриных эмбрионов дает возможность вести ежедневное визуальное наблюдение культуры в световом микроскопе и выявлять более ранние сроки проявления цитопатических изменений.

Исследованием контрольных (неинфицированных) культур клеток, сывороток и питательных сред на специальных средах для микоплазм наличия микоплазмоконтaminантов не установлено.

В ы в о д ы

1. Проведенные исследования показали, что в зависимости от вида клеточных культур одни и те же штаммы микоплазм могут вызывать острую или латентную инфекцию клеток.

2. Первично трипсинизированные клетки куриного эмбриона и почек поросенка обладают высокой чувствительностью и могут быть использованы для культивирования, титрования и изучения микоплазм, выделенных при энзоотической пневмонии свиней.

3. Культура клеток СПТ по чувствительности к микоплазмам имела сходство с куриными эмбрионами.

4. Культура клеток ПЯ поддерживала размножение микоплазм, но не проявляла цитопатических изменений.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА МЕШОТЧАТОГО РАСПЛОДА ПЧЕЛ

НАУМЕНКОВ В. И.,
аспирант

Вопрос о внутриклеточной репродукции вируса мешотчатого расплода пчел в литературе не освещен. Это послужило основанием для проведения настоя-