© Коваленко С.М., Деміховська О.В., Риженко С.А., Радченко О.Г., 2004
УДК 616.921.5-022.6-078

С.М. Коваленко, О.В. Деміховська, С.А. Риженко, О.Г. Радченко

ДОСВІДВИКОРИСТАННЯКУЛЬТУРИКЛІТИН МКСКДЛЯ ІЗОЛЯЦІЇВІРУСІВГРИПУ

Дніпродзержинська санітарно-епідеміологічна станція,
Дніпропетровський інститут народної медицини

Наведені результати першого в Україні досвіду впровадження методу ізоляції вірусу грипу на лінії клітин MDCK у роботу практичної вірусологічної лабораторії. Використання культурального методу протягом трьох епідемічних сезонів дозволило підвищити результативність вірусологічного нагляду за грипом, а також заощадити час і матеріальні ресурси.

Виділення та ідентифікація вірусу грипу від хворих під час сезонних підйомів має велике значення не тільки для етіологічної діагностики, але й для епідеміологічного нагляду за циркуляцією актуальних грипозних штамів.

Традиційним і найбільш розповсюдженим методом виділення вірусу грипу з носоглоткових змивів від хворих є курячі ембріони. Останніми роками результативність цього методу у вірусологічних лабораторіях України дещо знизилася [1]. Неможливість своєчасного виділення вірусів грипу на курячих ембріонах частково пов'язана з відсутністю систематичних закладок на інкубаторах.

Характерною відмінністю сучасних циркулюючих штамів вірусів грипу А та В є зміна їх рецепторної чутливості, зокрема відмічається підвищення тропізму вірусів грипу до клітинних культур порівняно з курячими ембріонами [2]. Тому у світовій практиці все активніше використовується для ізоляції вірусів грипу епітеліальна культура клітин нирки собаки MDCK [3]. Результативність виділення вірусів при дослідженні на культурі клітин в окремих випадках сягає 33 % [4]. Дуже низька результативність вірусологічних досліджень в 1999-2000 рр., а також незадовільна забезпеченість курячими ембріонами призвели до вивчення можливості впровадження у практичній вірусологічній лабораторії досліджень на культурі клітин MDCK з метою ізоляції вірусу грипу від хворих під час епідемічного сезону [5].

Метою роботи було впровадження методу виділення вірусів грипу на культурі клітин MDCK, а також визначення результативності та економічної доцільності цього методу в умовах практичної вірусологічної лабораторії.

Матеріали і методи

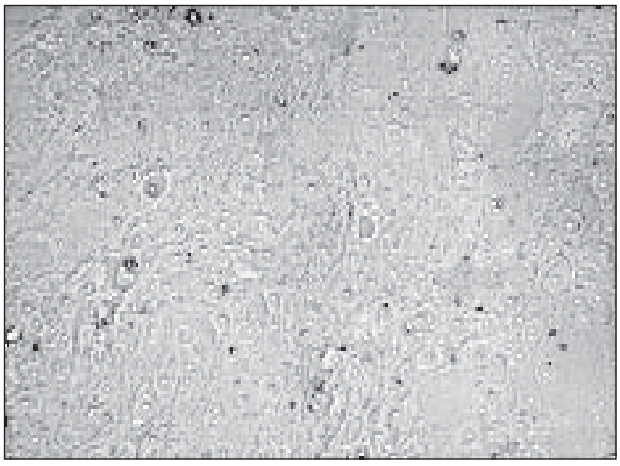
Забір носоглоткових змивів від хворих на грип і ГРВІ було організовано в лікувальних закладах при звертанні хворих за медичною допомогою в перший день хвороби. Транспортування проб до лабораторії здійснювалось, як правило, в день їх забору. В лабораторії змиви після первинної обробки та деконтамінації пеніциліном (400 ОД/мл), стрептоміцином (200 мкг/мл), ністатином (100 ОД/мл) зберігались до вірусологічного дослідження не більше 2 діб при температурі +6 °С [6].

Дослідження проводились на перещеплюваній культурі клітин MDCK (епітеліальні клітини нирки собаки), що попередньо була адаптована до поживного середовища ДМЕМ (виробник «Підприємство з виробництва бактерійних і вірусних препаратів» Інституту поліомієліту та вірусних енцефалітів ім. М.П. Чумакова РАМН, Росія) з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (виробник АТ «Конотопм'ясо», Україна), з антибіотиком гентаміцином (100 мкг/мл). Клітини знімали розчинами версену та трипсину у співвідношенні 1:1, розсівали у флаконах по 1,5-2,0 мл [7]. Для виділення вірусів грипу використовували 48-годинну культуру клітин MDCK. Після контакту матеріалу (по 0,2 мл) протягом 2 год при кімнатній температурі до флакону з культурою клітин вносили підтримуюче середовище. Інокульовані клітини інкубували при 34 °С протягом 5 діб, щоденно мікроскопували для обліку цитопатичної дії.

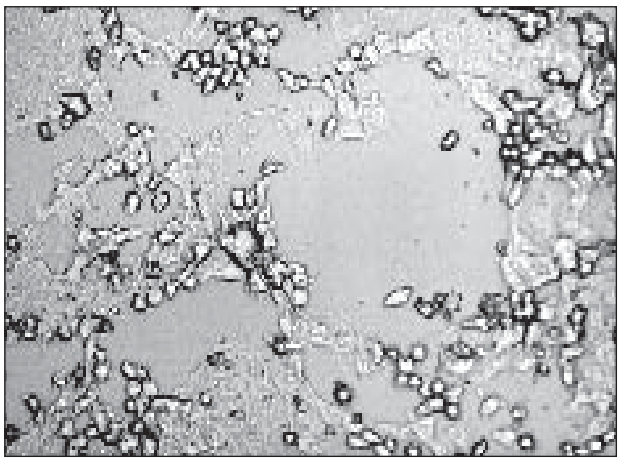
З усіма культуральними рідинами проводили реакцію гемаглютинації з 0,5 % суспензією еритроцитів кур та з 0,4 % суспензією еритроцитів 0(I) групи крові людини [6]. Суспензію еритроцитів людини готували з еритроцитарної маси, яку одержали зі станції переливання крові. Титрування та ідентифікацію вірусовмісного матеріалу здійснювали мікрометодом, що дозволяло економно його використовувати. Результати досліджень опрацьовані методами варіаційної статистики.

Результати досліджень та їх обговорення

Метод ізоляції вірусів грипу на культурі клітин MDCK був впроваджений у роботу вірусологічної лабораторії м. Дніпродзержинська у 2001 р. Виділені в нашій лабораторії 9 вірусів грипу А(H1N1) були першими в Україні, одержаними на культурі клітин MDCK [1]. Всього за 2001-2003 рр. виконано 351 дослідження, виділено 14 штамів вірусів, що становить 3,9 %. Від хворих з діагнозом «грип» виділено 10 вірусів (71,4 %), від хворих на ГРВІ – 4 штами (28,5 %). Видовий склад вірусів представлено так: 11 штамів А(H1N1) (78,5 %), 3 штами вірусу грипу В (21,5 %). Підтвердження результатів і подальше вивчення виділених вірусів грипу було проведене в Центрі грипу Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України (м. Київ). Всі штами епідемічних сезонів 2001 та 2003 рр. ідентифіковані як віруси грипу А/Нова Каледонія 20/99 (H1N1). В 2002 р. виділені віруси грипу належали до штаму В/Сичуань/379/99.



Мал. 1. Культура клітин MDCK.



Мал. 2. Культура клітин MDCKчерез 72 год після зараження вірусом грипу А (H1N1).

При первинному зараженні було виділено 14,2 % вірусів, на першому пасажі – 85,7 %. Морфологічні зміни культури клітин, зараженої носоглотковими змивами від хворих, спостерігались не раніше як через 72 год інкубації у вигляді дегенерації, яка нагадувала «макові розсипи», з подальшою фрагментацією клітинного моношару (мал. 1, 2). Титри виділених вірусів були невисокими: 7,1 % вірусів мали титр 1:16, 50,0 % – 1:8, 42,8 % штамів – 1:4. Позитивна гемаглютинація відмічалась тільки з тими культуральними рідинами, де спостерігалась цитопатична дія. Усі без винятку штами вірусів грипу, щойно виділені на культурі клітин, давали позитивну реакцію аглютинації з еритроцитами крові людини і тільки 28,5 % штамів реагували з еритроцитами кур. Це підтверджує спостереження російських авторів щодо зміни тропізму сучасних епідемічних вірусів грипу А та В до гемаглютинінових рецепторів, а саме зниження рецепторної чутливості еритроцитів кур при одночасному збільшенні її до еритроцитів людини [2, 8].

Порівнюючи метод ізоляції вірусів грипу на культурі клітин з традиційним методом (курячі ембріони), слід відзначити, що при використанні курячих ембріонів питома вага позитивних знахідок коливалася (1991-1993 рр.) від 1,3 до 3,3 % (у середньому 2,1±0,7), а при дослідженнях на культурі клітин (2001-2003 рр.) – від 1,6 до 11,5 % (у середньому 3,9±1,0).

Крім підвищення результативності досліджень культуральний метод виявився більш економічним. За нашими підрахунками, вартість одного дослідження на курячому ембріоні складала в середньому 13 грн 32 коп., одного дослідження на культурі клітин – 10 грн 85 коп. Крім того, цей метод дозволяє заощаджувати час, бо первинний скринінг заражених культур здійснюється при перегляді клітин під мікроскопом, а ідентифікації потребують тільки ті культуральні рідини, де спостерігалася цитопатична дія вірусу грипу.

Висновки

1. Метод виділення вірусів грипу від хворих на культурі клітин MDCK впродовж епідемічного сезону є більш результативним порівняно з традиційним методом використання курячих ембріонів.

2. Культуральний метод виділення вірусів грипу, впроваджений у практику вірусологічних лабораторій, дозволяє економити час і матеріальні ресурси.

Література

1. Міроненко А.П. Методичні підходи до виділення вірусів грипу та реалізація їх в Україні // Лабор. діагностика. – 2001. – № 4. – С. 42-44.

2. Бурцева Е.И., Иванова В.Т., Оскерко Т.А., Слепушкин А.Н. Свойства вирусов гриппа А и В, выделенных на куриных эмбрионах и в культуре клеток MDCK // Вопросы вирусологии. – 2001. – № 1. – С. 29-33.

3. Вороненко С.Г. Віруси грипу // Посібник з медичної вірусології. – Київ: Здоров'я, 1995. – 332 с.

4. Беляев А.Л., Слепушкин А.Н. Грипп вчера, сегодня, завтра // Медицинская сестра. – 2002. – № 6. – С. 32-35.

5. Коваленко С.М., Коробка Н.Я. Выделение вирусов гриппа на культуре клеток // Проблеми епідеміології, екології та гігієни. – Дніпропетровськ: Пороги, 2001. – С. 78-79.

6. Методи лабораторної діагностики грипу та гострих респіраторних інфекцій: Методичні рекомендації, затверджені Наказом МОЗ України від 09.02.1998 р. №30. – С. 28-31.

7. Голубева Л.И., Клевцова Г.А., Иванова В.Т. и др. Выделение вирусов гриппа в Новгороде в 1990-1991 гг. // Вопросы вирусологии. – 1993. – №1. – С. 7-8.

8. Иванова В.Т., Бурцева Е.И., Слепушкин А.Н. и др. Распространение и свойства эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В, вызвавших подъемы заболеваемости в России в 1999-2002 гг. // Там же. – 2003. – № 4. – С. 11-15.

EXPERIENCE кF MKCK CELL CULTURE USAGE FкR INFLUENZA VIRUSES ISкLATING

S.M. Kovalenko, O.V. Demikhovska, S.A. Ryzhenko, O.H. Radchenko

SUMMARY. The article presents the results of the first Ukrainian experience of implementation of influenza virus isolating method using MDCK cells into the work of virusologic laboratory. Usage of cultural methods during 3 epidemic seasons made it possible to improve the results of ihfluenza virusologic inspection and to save time and material resources.

© Колектив авторів, 2004
УДК 619:579,842.14:616-076:636.5

А.Г. Дяченко, О.М. Савінова, В.В. Липовська, А.Ю. Волянський, І.Ю. Кучма

ФАКТОРФЕРТИЛЬНОСТІ(F)ЕНТЕРОБАКТЕРІЙЯК ЕПІДЕМІОЛОГІЧНИЙМАРКЕР

Сумський державний університет, Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова, м. Харків

Проведені дослідження циркулюючих ентеропатогенних штамів ешерихій, шигел і сальмонел на наявність фактора кон'югативності. Встановлено, що 85 % циркулюючих штамів S. flexneri 2a мають донорську активність відносно F-фактора. Серед ентеропатогенних E. coli (EPEC) різних сероварів кількість таких штамів становить 63 %, у S. enteritidis – 15 %. Оскільки 63 % штамів ентеропатогенних ешерихій мають гемолітичну активність і F-плазміду кон'югативності, можна вважати визначальними селективними ознаками патогенних ешерихій одночасну присутність гемолітичної та донорської активності відносно F-фактора Наявність плазмід кон'югативності є важливим епідеміологічним маркером. Згідно з одержаними даними, можна припустити збереження основних сероварів серед циркулюючих штамів ентеробактерій в наступному році. В той же час можна очікувати зниження частки серовару S. enteritidis серед інших збудників сальмонельозної інфекції.

В умовах повсюдного поширення і багаторічної тенденції до росту захворюваності кишковими інфекціями особливу значимість мають прості, інформативні методи діагностики таких ентеробактерій, як ентеропатогенні ешерихії, шигели, сальмонели.

Патогенні ентеробактерії характеризуються поліетіологічністю, значною варіабельністю антигенного складу, різною роллю мікробів та їх токсинів у патогенезі інфекційних захворювань, можливістю зміни збудника [1].

Оцінка епідеміологічної значимості культур, що виділяються від хворих, може ґрунтуватися не тільки на вивченні класичних морфологічних, культуральних, біохімічних і антигенних властивостей, але й на чіткому визначенні маркерів, що забезпечують селективні переваги збудника [2-4].

Поряд з маркерами бактерійної персистенції: антилізабельна, антикомплементарна активність, здатність до інактивації бактерійного складового