

КОНТРОЛЬ ЧИСТОТЫ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР МЕТОДАМИ КЛИНИЧЕСКОЙ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ

© А. В. Морозова,^{1, 2, *} С. Н. Борхсениус,^{1, 2} И. Е. Вишняков,¹ А. Ю. Малинин^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² ООО Научно-производственное предприятие «Лаборатория ДНК-Диагностики»,
Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: avtoro@gmail.com

Культуры клеток высших организмов, особенно человека, все шире используются в медицине, фармацевтике и научных исследованиях. Основная проблема культивирования — нелетальная скрытая контаминация микоплазмами, вирусами и посторонними клеточными линиями. Мы предлагаем в качестве доступного и надежного метода контроля чистоты клеточных культур использование комплектов для ПЦР, официально применяемых в клинической диагностике. Мы проверили коммерческими диагностическими системами для выявления папилломавирусов, герпесвирусов, аденовирусов, *Mycoplasma hominis* и общей бактериальной массы 50 клеточных линий человека. Контаминации в проверенных линиях не обнаружено. Для клеточных линий, в геномах которых содержатся встроенные участки вирусной ДНК, подтверждено присутствие нуклеотидных последовательностей ДНК соответствующих вирусов. Предлагаемые диагностические системы можно эффективно использовать для рутинной проверки чистоты культур как для качественного выявления возможной контаминации, так и для количественных оценок с расчетом вирусной нагрузки, подобно тому как это практикуется в клинической диагностике.

Ключевые слова: контаминация клеточных культур, ПЦР, микоплазмы, папилломавирусы, герпесвирусы

Принятые сокращения: ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени, HPV — Human papillomavirus, EBV — Epstein—Barr virus, CMV — Cytomegalovirus, AdV — Adenovirus, HHV — Human herpes virus, ОБМ — общая бактериальная масса, КВМ — контроль взятия материала.

Контаминация клеточных культур является проблемой, которая вряд ли перестанет быть остро актуальной в обозримом будущем и которая требует непрерывных затрат сил и времени для контроля чистоты культуры. Контаминация бывает трех видов — химическая (ионами металлов и перекисей, пластификаторами, дезинфектантами), микробиологическая (бактериями, вирусами, иногда прочими микроскопическими организмами) и кросс-контаминация другими клеточными культурами. При этом опасность контаминации, которая подразумевает потерю культуры, получение ложных результатов работы и угрозу здоровью персонала, прямо пропорциональна трудности определения контаминанта. Дольше других незамеченными и прогрессирующими до непоправимых величин могут оставаться контаминации микоплазмами, вирусами и иными клеточными линиями.

Появление метода ПЦР явилось прорывом не только в клинической диагностике, но и в области контроля чистоты клеточных культур. Скорость метода ПЦР сравнима с микроскопическими методами при значительно меньшей чувствительности и специфичности последних. По сравнению с культуральными методами у ПЦР несколько ниже чувствительность, но микоплазменная и вирусная инфекции обычно довольно быстро достигают высокого

титра в культуре, превышающего чувствительность ПЦР минимум на три порядка.

К недостаткам метода ПЦР относят возможность снижения специфичности из-за контаминации целевыми фрагментами ДНК. Возможны контаминация продуктом амплификации (из-за неправильной организации пространства лаборатории) и перекрестная контаминация ДНК между пробами (из-за ошибок персонала). Сведение вероятности контаминации ДНК к нулю видится в выполнении анализов в лаборатории, специализирующейся на методе ПЦР. В специализированной лаборатории пространство строго поделено на зоны пробоподготовки, амплификации и детекции результатов, а персонал имеет выделенное время и средства для поддержания требуемого для ПЦР очень высокого уровня чистоты рабочих мест.

Наборы реактивов медицинского назначения имеют маркировку IVD («In vitro diagnostic») в отличие от наборов RUO и IUO («Research use only» и «Investigational use only»). IVD-продукт прошел регламентированную процедуру проверки на соответствие нормам ИСО и ГОСТ (см.: ГОСТ Р 51352—2013, 2014; <http://www.fda.gov/Medical-Devices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm253307.htm>; ISO/TS 17822-1 : 2014, 2014). RUO- и

ИУО-продукты не прошли проверку для IVD; формально они находятся на стадии разработки и испытаний. Для производителя достаточно проверки таких наборов на панели синтетических или рекомбинантных образцов. Именно поэтому в литературе часто можно встретить нарекания на качество этих наборов (Maass et al., 2011). Кроме того, наборы медицинского назначения лучше еще и тем, что из-за больших объемов их производства обычно имеют относительно невысокую цену.

Задачей настоящей работы было показать возможность использования применяемых в клинической диагностике методов пробоподготовки и проведения ПЦР для определения наличия микоплазм, бактерий и вирусов в клеточных линиях. Предполагалось использовать реактивы, предназначенные для диагностики *in vitro* в медицинских, а не исследовательских целях, так как они проходят более тщательную процедуру проверки при государственной регистрации.

Материал и методика

Клеточные линии, перечисленные в табл. 1, получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РККК П; Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) в виде замороженной суспензии, содержащей до 1 млн кл./мл.

Культуры микоплазм *Acholeplasma laidlawii* PG8 и *Mycoplasma hominis* H34 (Коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) выращивали в жидкой питательной среде *Mycoplasma Broth Base*, содержащей селекционные добавки *Supplement G* (Oxoid, Великобритания) и 0.1 % глюкозы (для *A. laidlawii*) или 0.1 % аргинина (для *M. hominis*). Число микоплазм в накопительных культурах в момент окончания культивирования составляло $1 \cdot 10^9$ (*A. laidlawii*) и $1 \cdot 10^8$ (*M. hominis*) кл./мл.

Для выделения тотальной ДНК 0.1–0.5 мл клеточной суспензии (10^4 – 10^5 клеток) центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 5 мин и аккуратно удаляли супернатант, оставляя в пробирке не более 20 мкл (осадок плюс жидкая фракция).

Способы выделения тотальной ДНК. 1. Выделение на мини-колонках, PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, США). К осадку добавляли 200 мкл буфера PBS, 20 мкл раствора протеиназы К и 20 мкл раствора РНКазы А, тщательно перемешивали с помощью вортекса и инкубировали 2 мин при комнатной температуре. Добавляли 200 мкл буфера для лизирования, вновь перемешивали, инкубировали при 55 °С 10 мин, добавляли 200 мкл этанола и немедленно наносили весь объем смеси на миниколонку. Элюировали несвязавшийся материал центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 1 мин, колонку последовательно промывали двумя буферными растворами, содержащими гуанидинхлорид и этанол в разных концентрациях (по 500 мкл), и элюировали ДНК 200 мкл буфера ТЕ (10 мМ Трис-НСI и 1 мМ ЭДТА, pH 8.0–9.0) при том же режиме центрифугирования.

2. Выделение простым сорбентным методом (по Boom et al., 1990, с модификациями). К осадку добавляли 300 мкл концентрированного раствора гуанидинтиоционата и 20 мкл взвеси диатомовой земли, тщательно перемешивали с помощью вортекса. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре, коротко центрифугировали

взвесь, удаляли супернатант. Дважды отмывали осадок 1.25 мл 70%-ного этанола и элюировали ДНК 100 мкл буфера ТЕ при 60 °С в течение 10 мин.

3. Выделение методом термокоагуляции. Добавляли к осадку 200 мкл реактива «ПРОБА-РАПИД» (ДНК-Технология, Россия) и встряхивали на вортексе в течение 10–20 с. Термостатировали пробирку при 98 °С в течение 20 мин и центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 2 мин. Полученный супернатант использовали в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

Все выделенные образцы ДНК хранили при 4 °С в течение 2 нед, при необходимости более длительного хранения — при –20 °С.

В качестве отрицательных контрольных образцов использовали следующие препараты: 1) буфер ТЕ; 2) 20 мкл деионизованной воды, прошедшей все стадии выделения ДНК методом термокоагуляции; 3) 20 мкл чистой ростовой среды для выращивания микоплазм, прошедшие все стадии выделения ДНК методом термокоагуляции; 4) 20 мкл среды, в которой были получены клеточные линии (супернатант после центрифугирования), прошедшие все стадии выделения ДНК методом термокоагуляции; 5) образцы ДНК из лейкоцитов здоровых людей, полученные методом термокоагуляции с помощью набора реактивов «ДНК-экспресс кровь» (НПФ Литех, Россия); 6) 20 мкл деионизованной воды, прошедшей все стадии выделения ДНК простым сорбентным методом.

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) со следующими параметрами реакции: первоначальный прогрев — 2 мин при 95 °С; денатурация — 15 с при 95 °С, отжиг и считывание — 30 с при 60 °С, синтез — 40 с при 72 °С, 40 циклов. Использовали реакционные смеси производства НПФ Литех (Россия) для определения ДНК *M. hominis*, общей бактериальной массы (ОБМ), *CMV*, *HPV* 16 и 18 с дифференциацией и без нее. Количественные значения концентрации ОБМ получали построением калибровочных графиков зависимости флуоресценции ПЦР-РВ от концентрации ДНК для последовательных десятикратных разведений положительного контрольного образца с концентрацией 10^6 копий в 1 мл. Реакционные смеси производства ДНК-Технология (Россия) для определения *HPV* 18 и 21-ного типа *HPV* («*HPV* квант-21»: типы 6, 11, 44, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 и 82, количественный анализ с дифференциацией) использовали согласно протоколу производителя.

ПЦР с электрофоретической детекцией проводили на амплификаторах Терцик (ДНК-Технология, Россия). Использовали реакционные смеси производства НПФ Литех (Россия) для определения ДНК *M. hominis*, *CMV*, *EBV*, «*HPV* комплекса» (типы 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 70 и 82 без дифференциации) и производства Лаборатории ИзоГен (Россия) для определения ДНК *AdV* и *HNH* 6. Реакции проводили согласно протоколам производителей. Электрофорез проводили в 1.8%-ном геле агарозы и 50 мМ Трис-ацетатном буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА, pH 8.1–8.3. Размер полученных в результате ПЦР фрагментов составлял 220–780 п. о. Площадь лунки для внесения пробы составляла 4.5×1 мм, объем вносимой пробы — 15 мкл, длина пробега лидирующего красителя бромфенолового синего — не менее 35 мм.

Т а б л и ц а 1

Содержание ДНК микроорганизмов в клеточных культурах

Номер	Линия клеток	Происхождение, патология	Содержание вирусов согласно описанию ^а	Фактическое содержание ДНК ^б			
				EBV	HPV _к	HPV18	КВМ
1	293	Почка эмбриона	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-,+), HPV18(-)	—	—	—	+
2	A-172	Глиобластома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	—	—	—	+
3	A-431	Эпидермоидная карцинома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
4	A549	Карцинома легкого	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
5	BT-20	Карцинома молочной железы	НД	—	—	—	+
6	CCRF-SB	Острый В-лимфобластный лейкоз	CMV(-), EBV(+), ^в HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	+	—	—	+
7	FRSN	Крайняя плоть ребенка	НД	—	—	—	+
8	HeLa-S3	Цервикальная карцинома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(+)	—	+	+	+
9	HeLaTK ⁻	То же	НД	—	+	+	+
10	HEp-2	Карцинома, контаминант HeLa	HPV(+)	—	+	+	+
11	HepG2	Гепатоцеллюлярная карцинома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	—	—	—	+
12	HL-60	Острый миелолейкоз	НД	—	—	—	+
13	HOS (Te85clF5)	Остеосаркома	»	—	—	—	+
14	HT-1080	Фибросаркома тазовой кости	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	—	—	—	+
15	IMR32	Нейробластома брюшной полости	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
16	Jurkat	Т-клеточный лейкоз	НД	—	—	—	+
17	K562	Хронический миелолейкоз	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
18	MG-63	Остеосаркома	НД	—	—	—	+
19	MNNG-HOS	»	»	—	—	—	+
20	MOLT-3	Т-клеточный лейкоз	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
21	MOLT-4	То же	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
22	NAMALWA	Лимфома Беркитта	CMV(-), EBV(+), HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	+	—	—	+
23	NC-37	Лимфома Беркитта, контаминант Raji	CMV(-), EBV(+), ^в HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	+	—	—	+
24	Raji	Лимфома Беркитта	CMV(-), EBV(+), ^в HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	+	—	—	+
25	RD	Эмбриональная тазовая рабдомиосаркома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
26	RPMI-1788	Лейкоциты	CMV(-), EBV(+), ^в HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	+	—	—	+
27	RPMI-2650	Плоскоклеточная карцинома носовой перегородки	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
28	SK-N-MC	Нейробластома мозга	НД	—	—	—	+
29	SK-UT-1B	Маточная мезодермальная лейомиосаркома	»	—	—	—	+
30	SW-837	Ректальная аденокарцинома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	—	—	—	+
31	THP-1	Острый моноцитарный лейкоз	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	—	—	—	+
32	U-251 MG	Невральная астроцитома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	—	—	—	+
33	U937	Гистиоцитарная лимфома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), Adv(-), HPV18(-)	—	—	—	+
34	ZR-75-1	Карцинома молочной железы	НД	—	—	—	+
35	M-Fet MSC	Мезенхимные стволовые клетки из мышцы конечности эмбриона	»	—	—	—	+

Таблица 1 (продолжение)

Номер	Линия клеток	Происхождение, патология	Содержание вирусов согласно описанию ^а	Фактическое содержание ДНК ^б			
				EBV	HPV _к	HPV18	КВМ
36	AsPC-1	Аденокарцинома поджелудочной железы	НД	—	—	—	+
37	BT-474	Карцинома протока молочной железы	»	—	—	—	+
38	CACO-2	Аденокарцинома ободочной кишки	»	—	—	—	+
39	CAPAN-2	Аденокарцинома поджелудочной железы	»	—	—	—	+
40	COLO 320HSP	Аденокарцинома сигмовидной кишки	»	—	—	—	+
41	HS578T	Карцинома протока молочной железы	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), AdV(-), HPV18(-)	—	—	—	+
42	HBL100	Клетки эпителия молочной железы	НД	—	—	—	+
43	Hutu80	Аденокарцинома двенадцатиперстной кишки	»	—	—	—	+
44	KG-1	Острый миелолейкоз	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), AdV(-), HPV18(-)	—	—	—	+
45	MCF-7	Аденокарцинома груди	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), AdV(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
46	MIA PaCa-2	Панкреатическая карцинома	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), AdV(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
47	PANC-1	Панкреатическая эпителиальная карцинома	НД	—	—	—	+
48	PA-1	Тератокарцинома яичника	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), AdV(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
49	RPMI-8226	Плазмацитома, миелома: лимфоциты	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), AdV(-), HPV18(НД)	—	—	—	+
50	FetMSC	Мезенхимные стволовые клетки из костного мозга эмбриона	НД	—	—	—	+

Примечание. HPV_к — «HPV комплекс» (HPV типы 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 70, 82 без дифференциации).
^а В графе собрана информация, когда-либо полученная каким-либо методом диагностики для данной линии клеток (по материалам коллекций клеточных культур American Type Culture Collection (ATCC) и Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (JCRB)): (-) — отсутствует, (+) — присутствует, (-,+) — противоречивые данные по разным источникам, НД — нет данных. ^б ДНК HPV 16, CMV, HHV 6, AdV, M. hominis и других прокариот в этих клеточных линиях не обнаружена. ^в Информация получена для линий клеток в Российской коллекции клеточных культур позвоночных (РКК П; Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Чувствительность анализа составляла 10³—10⁴ ген-ном-эквивалентов/мл.

Все реакционные смеси производства НПФ Литех с электрофоретической или РВ-детекцией и «HPV квант-21» производства ДНК-Технология содержали дополнительный комплект праймеров и зондов для определения геномной ДНК человека, так называемый контроль взятия материала (КВМ). Для проб, содержащих клетки человека, это служило контролем прохождения реакции и контролем наличия материала в пробе, для отрицательных контрольных образцов и проб прокариот — контролем контаминации.

Все качественные реакции проводили в двух повторах и учитывали только в случае совпадения двух результатов. В табл. 1 положительный результат в графе «КВМ» означает, что во всех без исключения реакциях, поставленных для данной линии клеток, результат по КВМ был положительным.

Использованные реактивы получены от фирм Sigma-Aldrich (США), Merck, Gerbu (Германия) и MP Bio-medicals (США); наконечники, пробирки, планшеты и пленки для ПЦР — от фирм Sarstedt (Германия) и Axugen (США).

Результаты и обсуждение

В 50 клеточных линиях, предоставленных РКК П, было проверено наличие ДНК папилломавирусов типов 16, 18 и комплекса из 18-ти типов без дифференциации (HPV_к), герпесвирусов EBV, CMV, HHV 6 и аденовируса; микоплазмы M. hominis и прокариот (ОБМ). ДНК HPV 16, CMV, HHV 6, AdV, M. hominis и других прокариот в этих клеточных линиях не обнаружено. Данные по остальным анализам представлены в табл. 1.

ДНК вирусов в клеточных линиях. Клеточные линии естественного происхождения из злокачественных новообразований содержат интегрированную ДНК папилломавирусов, герпесвирусов и других вирусов. Например, клетки цервикальных карцином SiHa, Ca Ski и HeLa содержат последовательности HPV 16 и 18, клетки лимфом Беркитта NAMALWA и Raji содержат последовательности EBV, а HHV 6 ассоциирован с лимфомами, лейкозами, цервикальными неоплазиями и опухолями мозга (Parkin, 2006).

Искусственно иммортализованные клеточные линии могут быть получены введением вирусных генов. Воз-

можно инфицирование интактными вирусами, обычно полиомавирусом SV40, гибридами SV40 с аденовирусом. Часто применяют трансфекцию отдельными генами вирусов. Для этого используют, в частности, последовательности *AdV* типов 5, 12 (Graham et al., 1977) и *HPV* типов 16, 18, 31, 33 и 35 (Schlegel, 1994). Например, клетки почки эмбриона 293 были получены в результате трансфекции ДНК вируса *AdV* 5.

Находящиеся в клетке последовательности ДНК вирусов можно детектировать методом ПЦР, что дает быстрый и легкий способ контроля чистоты клеточных линий.

С другой стороны, сами клеточные культуры чувствительны к заражению вирусами. Это свойство используется в исследовательских целях (примером служат клетки A549 и HeLa). Но при спонтанном заражении в лаборатории возникает опасность потери коллекционного материала и серьезная угроза здоровью персонала (Ryan, 2008). Наиболее опасны вновь поступающие в лабораторию культуры, особенно первичные. Источником заражения чистых культур может стать и больной сотрудник, тем более что речь идет о вирусах, часто не вызывающих у человека яркой клинической симптоматики, таких как аденовирусы, герпесвирусы, даже ВИЧ и вирусы гепатита. Признанным методом выбора для идентификации вирусного заражения является ПЦР.

Самым распространенным типом перекрестной контаминации клеточных линий является заражение клетками HeLa, быстрорастущими и высокоадаптивными (Ryan, 2008). Клетки HeLa содержат часть генома *HPV* 18, встроенную в их ДНК. Перекрестную контаминацию клеточных линий можно контролировать, проверяя наличие *HPV* 18 в клетках методом ПЦР.

Используя наборы реагентов для клинической диагностики, мы подтвердили наличие генов вирусов в вирусосодержащих клеточных линиях естественного происхождения: вируса *EBV* в линиях лейкоцитов CCRF-SB, NAMALWA, NC-37, RAJ1 и RPMI-1788, вируса *HPV* 18 в линиях эпителиальных клеток HeLa-S3, HeLaTK⁻ и HEp-2 (табл. 1). В остальных клеточных линиях генов 18-ти папилломавирусов (типы 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67, 70 и 82), герпесвирусов *CMV*, *EBV* и *HHV* 6 и аденовируса обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии заражения ими культур. В трансфицированной *AdV* 5 клеточной линии 293 аденовируса выявлено не было. Использованный набор реактивов предназначен для выявления клинически значимых типов. В патологии человека наибольшее значение имеют серотипы 3, 4, 7, 8, 14 и 21 (Berk et al., 2013). Известно, что линия 293 трансфицирована участком *E1* ДНК *AdV* типа 5 (Graham et al., 1977). Вероятно, набором реактивов медицинского назначения эта последовательность не является.

Геномы папилломавирусов в клеточный геном обычно встраиваются не полностью. Потому для клеточных линий естественного происхождения важно, чтобы диагностическая система выявляла именно встраиваемые участки. Логично предположить, что именно эти участки и клинически являются наиболее значимыми и что именно они должны быть использованы в качестве мишеней при производстве ПЦР-наборов для клинической диагностики папилломавирусов. Однако на практике встраиваемые участки могут оказаться переменными или нетипоспецифическими. Тогда требованиям высокой специфичности и чувствительности, предъявляемым к наборам клинического назначения, сможет отвечать

только диагностический набор, выявляющий ДНК интактного вируса.

На клетках HeLa-S3 мы проверили 3 набора для диагностики *HPV* 16/18, набор для диагностики 18-ти типов *HPV* без дифференциации («*HPV*-комплекс»), набор для количественной диагностики 21-ного типа *HPV* с дифференциацией «*HPV* квант-21». Все перечисленные наборы позволяли выявить наличие папилломавируса в линии HeLa-S3, а значит, разработаны для выявления HeLa-интегрированных участков *HPV* 18. Набором «*HPV* квант-21» остальные 20 типов *HPV* не обнаружены. Эти наборы подходят для контроля чистоты клеточных линий в связи с возможной контаминацией клетками HeLa.

Согласно схеме интегрирования *HPV* 18 в геном HeLa, клетки содержат полные участки *E1*, *E6* и *E7*, а также фрагменты участков *E2* и *L1* генома папилломавируса (Adey et al., 2013). Участки *E6* и *E7* являются типоспецифическими, поэтому используются в дизайне праймеров и зондов диагностических наборов, определяющих индивидуальные типы *HPV* высокого канцерогенного риска. Этим, вероятно, объясняется стабильное выявление *HPV* 18 в HeLa перечисленными выше наборами для определения *HPV* 18 и 16/18. Скорее всего, эти наборы выявляют фрагменты одного и того же участка ДНК *HPV* 18, что подтверждается перекрестной амплификацией ампликонов.

В случае наборов для выявления целых филогенетических групп *HPV* (выборка по степени онкогенного риска, локализации в организме и пр.) производители наборов могут использовать в качестве мишени участки *E2* и *L1*. К применению таких наборов для проверки чистоты клеточных линий, в частности идентификации генов клеток HeLa, следует подходить с осторожностью. Нам известны как минимум два набора двух производителей для диагностики целой группы *HPV*, которые не выявляют *HPV* 18 в клетках HeLa. Однако наборы производства Литех для диагностики 18 типов *HPV* и *HPV* 16/18 без дифференциации подходят для выявления *HPV* 18, интегрированного в геном клеток HeLa.

«Вирусная нагрузка» в клетках. Значимость папилломавирусов в развитии опухолей до сих пор обсуждается, однако общепризнан тот факт, что выявление папилломавирусов является самым чувствительным из существующих методов ранней диагностики неоплазий, несмотря на его низкую специфичность. В случае положительного результата диагностики *HPV* степень риска развития злокачественного новообразования в современной клинической практике принято оценивать не только по типу выявленного *HPV*, но и по так называемой вирусной нагрузке.

Вирусная нагрузка измеряется числом копий вируса в 1 мл биологической жидкости. Это количественная величина, которая строго может быть вычислена только в стандартизованном образце (например, ВИЧ в крови или плазме). Точного метода исчисления для клеток тканей не существует.

Однако в ряде публикаций для папиллома-вирусов вводится условный термин «вирусная нагрузка», который в контексте означает отношение числа вирусных частиц к числу клеток хозяина. Это отношение для конкретного пациента можно оценить по количеству в пробе ДНК *HPV* и ДНК консервативного гена человека с известной копийностью (обычно определяется ген бета-глобина). Считается, что 1 единица вируса на 100 клеток человека — это порог клинической значимости, 1 единица виру-

са на 1 клетку — порог прогрессии развития неоплазии. Эти цифры приняты у российских клиницистов, хотя не вполне подтверждаются данными литературы (Snijders et al., 2006; Broccolo et al., 2009; Hesselink et al., 2009; Constandiou-Williams et al., 2010; Назарова и др., 2013). В этой связи нами была проанализирована «вирусная нагрузка» в клетках цервикальной карциномы HeLa, содержащей *HPV* 18.

У авторов, использовавших участок *L1* в качестве мишени для ПЦР-выявления *HPV* 18 в клинических образцах (Бауэр и др., 1999), для линии HeLa получены значения 10—50 копий ДНК *HPV* 18 на клетку. Следует отметить, что фрагмент участка *L1* в хромосоме HeLa имеет большую копияность, чем участки *E6*, *E7* или *E1* (Adey et al., 2013). Мы полагаем, что в использованных в нашей работе наборах выбраны последние участки и что такой выбор является более современным ввиду известной сейчас гетерогенности участка *L1*.

В табл. 1 приведены качественные результаты по выявлению папиллома-вируса типа 18. При количественном анализе данных РВ-ПЦР с использованием наборов для диагностики *HPV* 16/18 производства Литех получены следующие усредненные числа копий на 1 клетку: для клеток HeLa-S3 — 2.2 копии *HPV* 18, для HeLaTK⁻ — 2.9, для контаминанта HeLa клеток HEp-2 — 2.5 копии. Используемые диагностические системы не рассчитаны на определение вирусной нагрузки с точностью до копии на 1 клетку, и эти цифры приблизительные, усредненные из не менее чем 10 последовательных повторов реакции для каждой линии. Для количественного определения «вирусной нагрузки» *HPV* предназначен набор производства ДНК-Технология «*HPV* квант-21». Для линии HeLa-S3 этим набором получено значение 4.3 копии *HPV* 18 на 1 клетку. Таким образом, «выявлен риск развития неоплазии», но риск, по приведенной выше шкале «вирусной нагрузки», минимальный, на пороге прогрессии. Так как клетки HeLa являются клетками самой безусловной злокачественной неоплазии в мире, данный результат подтверждает сомнения по поводу информативности универсального понятия «вирусная нагрузка» для папилломавирусов.

Из многолетних данных НПП «Лаборатория ДНК-Диагностики» следует, что даже у первичных пациентов с неподтвержденными новообразованиями часто встречаются цифры 10, 100 и даже 1000 копий *HPV* на 1 клетку. Локально число копий может быть очень большим, если учесть высокую неоднородность опухолевой ткани (Patel, 2016) и возможное наличие свободных частиц вируса. Однако следует отметить, что для *HPV* группы А7, к которой относится *HPV* 18, нам не встречались значения выше 50 копий на 1 клетку, что указывает на необходимость оценки онкологического риска дифференцированно для разных типов папилломавирусов. Значение, полученное на этих же диагностических системах для HeLa, дополнительно подтверждает необходимость снижения порога значимости «вирусной нагрузки» для отдельных типов. Анализ генома HeLa показал, что при небольшой копияности *HPV* 18 сыграл драматическую роль в перерождении клеток благодаря специфическому встраиванию в хромосому, которое привело к активации клеточного протоонкогена *MYC* и максимальной экспрессии собственных онкогенов *E6* и *E7* (Adey et al., 2013).

Что касается использования «вирусной нагрузки» в диагностике клеточных линий методом ПЦР, этот показатель безусловно может быть полезным.

При чувствительности 1 геном-эквивалент/мкл можно количественно определить примесь HeLa в культуре клеток, не содержащих *HPV* 18, уже при соотношении 1 клетка HeLa на 1000 клеток проверяемой культуры, что недостижимо ни одним альтернативным методом.

Вирусная нагрузка может быть использована для любых других интегрированных в клеточные линии вирусов — *HPV* 16, *EBV* и др. Возможно, окажется, что для разных линий, содержащих один и тот же вирус, «вирусная нагрузка» будет отличаться на порядки, что позволит методом ПЦР легко различать эти линии. Например, известно, что набором для клинической диагностики *HPV* 16, использующим в качестве мишени участок *L1* генома *HPV*, выявляется 1 копия ДНК *HPV* 16 на 1 клетку в линии SiHa и 500 копий на 1 клетку в линии CaSki (Бауэр и др., 1999).

ДНК микоплазм в клеточных линиях. Микоплазменная контаминация является, возможно, самой значительной технологической проблемой при культивировании клеток эукариот *in vitro*. В разных лабораториях зараженными оказываются от 15 до 80 % клеточных культур. Число клеток микоплазм быстро достигает в зараженной культуре количеств, 1000-кратно превышающих число клеток культуры — до 10⁸ колониеобразующих частиц в 1 мл культуры. При такой плотности роста 25 % общего белка в культуре клеток и до 15 % ДНК может быть микоплазменного происхождения (McGarrity, Kotani, 1985; Rottem et al., 2012). Тем не менее контаминация остается длительно незамеченной и по морфологическим, и по культуральным признакам. Это связано с тем, что микоплазмы являются самыми мелкими микроорганизмами с самым маленьким геномом и потому с редуцированным метаболизмом. Чрезвычайно малые размеры и отсутствие клеточной стенки позволяют им проходить через мембраны при стерилизации сред фильтрацией и достигать высоких концентраций в культуре, оставаясь незамеченными при световой микроскопии. К тому же аномальная требовательность микоплазм к условиям культивирования (к сожалению, хорошо удовлетворяемая именно условиями культивирования клеточных культур) создает трудности для выявления их культуральными методами (Ryan, 2008; Борхсениус и др., 2016). Микоплазмы как контаминанты очень похожи на вирусы, но в действительности они опаснее, потому что в отличие от вирусов в культуре клеток не являются хозяин-специфическими, часто не внедряются в клетку, а конкурируют с ней за питательную среду. Контаминация вирусами обычно заканчивается разрушением клеток и гибелью культуры, а контаминация микоплазмами позволяет культивировать клетки длительное время. При этом, адаптируясь к сосуществованию с микоплазмами, клетки могут изменять свой кариотип, что бывает необратимо даже после элиминации микоплазм (Полянская, Ефремова, 2010).

Наиболее эффективным способом выявления микоплазменных контаминаций сегодня является ПЦР (Чернов и др., 2014). Возможно использование высокочувствительных ОТ-ПЦР и «гнездового» ПЦР, однако с учетом обычно высокого титра микоплазм в клеточных культурах простой одношаговый вариант ПЦР вполне приемлем с точки зрения необходимости и достаточности. Он отвечает концепции экспресс-теста, т. е. легко выполним, чувствителен, специфичен и экономичен. ПЦР-тест одобрен международными экспертными организациями, и на мировом рынке представлено большое

Т а б л и ц а 2

Выявление ДНК микроорганизмов в контрольных образцах

Образцы	HPVк	HPV 18	ОБМ	<i>M. hominis</i>	КВМ
<i>Mycoplasma hominis</i> , 10 ⁴	—	—	+	+	—
<i>M. hominis</i> , 10 ³	—	—	—	—	—
Смесь <i>M. hominis</i> , 10 ⁴ + HeLa-S3, 10 ⁵	+	+	+	+	+
Смесь <i>M. hominis</i> , 10 ³ + HeLa-S3, 10 ⁵	+	+	—	—	+
<i>Acholeplasma laidlawii</i> , 10 ⁴	—	—	+	—	—
<i>A. laidlawii</i> , 10 ³	—	—	—	—	—
Смесь <i>A. laidlawii</i> , 10 ⁴ + HeLa-S3, 10 ⁵	+	+	+	—	+
Смесь <i>A. laidlawii</i> , 10 ³ + HeLa-S3, 10 ⁵	+	+	—	—	+

Примечание. ДНК была выделена из чистой культуры микоплазм и из культуры микоплазм в смеси с клетками HeLa-S3.

количество наборов для тестирования клеточных культур на микоплазмы (Uphoff, Drexler, 2011).

Еще больше на рынке наборов для тестирования на микоплазмы клинических проб. Наборы медицинского назначения, учитывая предъявляемые к ним регламентированные высокие требования и тиражность их выпуска, разрабатываются большими коллективами профессионалов и проверяются на огромных массивах клинических изолятов. Их использование для диагностики контаминации культур явилось бы недорогим инструментом заведомо высокого качества.

К сожалению, несмотря на высокую специфичность в отношении природных хозяев, микоплазмы оказываются неспецифичными в отношении вида клеток, инфицируемых *in vitro*. И в культурах клеток человека, которые рассматриваются в настоящей работе, как и клеток всех прочих эукариот, чаще размножаются микоплазмы, неактуальные для клинического анализа, непатогенные для человека. Более чем в 95 % случаев это следующие виды: *M. arginini*, *M. orale*, *M. hyorhinitis*, *A. laidlawii*, *M. hominis*, *M. salivarium* и *M. fermentans* (McGarrity, Kotani, 1985; Drexler, Uphoff, 2000; Rottem et al., 2012). Набором клинического назначения из этих видов можно определять только *M. hominis*. Основные патогены человека (*M. pneumoniae* и *M. genitalium*) почти не встречаются в культурах клеток (Uphoff, Drexler, 2013).

Определение остальных видов возможно либо набором для ПЦР-определения ДНК микоплазм, предназначенным для научных исследований, либо набором для определения рибосомной ДНК прокариот. Второй случай мы рассмотрим ниже. Что касается наборов для научных исследователей, это либо сложные мультиплексные системы с огромным коктейлем олигонуклеотидов в одной пробирке, либо, напротив, системы с универсальными праймерами, выявляющими 60 видов молликут, которым соответствуют продукты ПЦР разного размера. Известно, что многоцелевая ПЦР требует гораздо больших затрат при разработке наборов, потому что для каждой матрицы и каждого комплекта праймеров и зондов условия приходится подбирать отдельно и их обычно трудно совместить (Markoulatos et al., 2002). С точки зрения клинической диагностики возможность в одной пробирке проанализировать большое количество возбудителей — задача заманчивая и приоритетная, потому что в масштабах клинических лабораторий сокращение времени работы персонала, загруженности оборудования, расхода лабораторного пластика имеет экономическое значение и

позволяет ускорить диагноз. Однако ПЦР-системы, определяющие более трех аналитов в одной реакции, которые выдержали испытания и допущены к использованию в медицинской деятельности, на отечественном рынке отсутствуют. Стоимость высококачественной мультиплексной системы ставит под сомнение рациональность применения ее в рутинной диагностике. А в вопросе контроля клеточных линий речь идет о постоянном мониторинге всех находящихся в работе линий клеток.

Мы проверили двумя наборами для определения ДНК *M. hominis* возможность выявления этой микоплазмы в культуре клеток. ДНК *M. hominis* была выделена из чистой культуры микоплазм и из культуры микоплазм в смесях с клетками HeLa-S3 (10⁷, 10⁴ и 10³ клеток *M. hominis* на 10⁵ клеток HeLa-S3). Результаты частично представлены в табл. 2. Примесь эукариотных клеток никак не влияла на выявляемость *M. hominis*, что и следовало ожидать от наборов для диагностики клинических проб. ДНК *A. laidlawii*, выделенная из препарата, содержащего даже 10⁹ кл./мл, наборами на *M. hominis* не выявлена.

Рибосомная ДНК бактерий в клеточных линиях. Высокий уровень консерватизма генов 16S РНК прокариот позволил разным авторам предложить универсальные праймеры для выявления методом ПЦР прокариотной, в том числе микоплазменной, ДНК на фоне значительных количеств ДНК эукариотных клеток. Эти праймеры давно уже успешно опробованы на культурах клеток человека (Жуланова и др., 1993; Narasawa et al., 1993; Veilleux et al., 1996; Говорун, 1999). На их базе существуют и ПЦР-наборы клинического назначения для определения ОБМ.

Проблема диагностики ОБМ методом ПЦР — наличие слишком широкой «серой зоны», которая охватывает область концентраций микроорганизмов от 10³—10⁴ геном-эквивалентов/мл и ниже. В медицинской диагностике это не является ограничением, потому что анализируется этот показатель в пробах эпителиальных соскобов со слизистых, где у человека концентрация микроорганизмов составляет не менее 10⁶ геном-эквивалентов/мл. В случае диагностики обсемененности клеточных линий теоретически необходимо определять меньшие концентрации бактерий для выявления начальных стадий заражения.

Ложноположительное выявление праймерами на 16S рРНК низких концентраций микроорганизмов связано с практической невозможностью полного освобождения

реактивов для рутинной работы от ДНК микроорганизмов. Используемая в ПЦР полимеразы получена из бактерий, к тому же на этапе выделения ДНК применяются рекомбинантные ферменты и другие компоненты биологического происхождения.

Мы проверили набором для выявления ОБМ пробы ДНК из клеточных линий, выделенные методом термокоагуляции, простым сорбентным методом и на мини-колонках.

Для всех отрицательных контрольных образцов, полученных методом термокоагуляции (см. раздел «Материал и методика»), среднее значение концентрации ОБМ составляло $(1-2) \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл, незначительно увеличиваясь в ряду: чистый реактив для выделения > препараты ДНК из лейкоцитов > среды для выращивания и хранения. Значение $1 \cdot 10^3$ получено и при постановке реакции ПЦР с чистым буфером ТЕ в качестве образца. Таким образом, фоновое значение, порог специфичности системы определения ОБМ составляет 10^3 геном-эквивалентов/мл. Мы условились вычитать это значение из значений, полученных для исследуемых проб, считая в этом случае концентрацию прокариот в пробе равной нулю.

Для всех 50 проверенных клеточных линий при выделении ДНК методом термокоагуляции было получено среднее значение концентрации ОБМ $2 \cdot 10^3$ геном-эквивалентов/мл. Таким образом, бактериальной контаминации во всех 50 линиях не обнаружено.

При выделении простым сорбентным методом среднее значение концентрации ОБМ для 5 проверенных клеточных линий (табл. 1, № 6—10) составляло $4 \cdot 10^4$ геном-эквивалентов/мл. Значение $1 \cdot 10^4$ геном-эквивалентов/мл получено и для отрицательного контрольного образца, выделенного этим методом, т. е. порог специфичности системы определения ОБМ нужно поднимать на один порядок, так как во всех пробах с диатомовой земли содержится дополнительно несколько десятков копий ДНК прокариот в 1 мл. Диатомовая земля состоит из окаменелых останков диатомовых водорослей. Некоторые виды бактерий (и, возможно, архей) в океанах и озерах способны разлагать эти водоросли (Bidle, Azam, 1999). И конечно, сама по себе морская среда нестерильна. Диатомовая земля при производстве обрабатывается кислотой, но при концентрациях и значениях pH, которые, как выяснилось, недостаточны для разрушения ПЦР-пригодных фрагментов ДНК.

При выделении на мини-колонках среднее значение концентрации ОБМ для 20 клеточных линий (табл. 1, № 1—20) составляло $6 \cdot 10^5$ геном-эквивалентов/мл, т. е. при выделении этим методом фоновое значение ДНК прокариот самое высокое. Выделение на мини-колонках является разновидностью сорбентного метода. Выход ПЦР-выявляемой ДНК, полученной на колонках, в 10—100 раз превышал выход ДНК, полученной простым сорбентным методом или методом термокоагуляции. Безусловно, из трех выбранных методов этим методом получается ДНК, самая свободная от примесей белка, РНК и пр. Такое улучшение показателей достигается емкостью сорбента и введением в методику двойной ферментной обработки. Ферментные препараты могут быть источником ДНК прокариот. Состав кремнеземного сорбента, используемого в колонках, неизвестен и может быть природного происхождения. Кроме того, для увеличения товарной привлекательности производителя наборов для научно-исследовательских работ пред-

лагают транспортировку и хранение всех входящих в набор водных растворов при комнатной температуре, что не может гарантировать отсутствие бактериального роста.

Потому для контроля контаминации клеточных линий бактериями, включая микоплазмы, мы выбираем метод выделения ДНК термокоагуляцией (набор «ПРО-БА-РАПИД» производства ДНК-Технология или аналогичный), как наиболее свободный от фоновой ДНК прокариот, наиболее простой и дешевый. Возможно также усовершенствование сорбентного метода процедурами предварительного освобождения порошка сорбента от примесей ДНК.

Выделенную таким образом ДНК рекомендуем анализировать набором для определения ОБМ и при получении результата выше фонового значения (10^3 геном-эквивалентов/мл) проверять его наборами для выявления микоплазм, в том числе набором для выявления *M. hominis*, и (или) альтернативными методами диагностики микоплазм.

При условии, что при определении ОБМ в клетках в первую очередь ставится целью выявление микоплазм, а эти бактерии быстро достигают в культуре клеток концентрации 10^6-10^8 кл./мл, система для определения ОБМ, определяющая от 10^4 кл./мл и выше, является удовлетворительной для мониторинга микоплазменных контаминаций.

В заключение следует оговорить ряд ограничений при использовании предлагаемых методов выделения ДНК и проведения ПЦР для выявления контаминации клеточных линий.

Ряд компонентов сред могут быть ингибиторами полимеразы. В общем случае желательно проводить тщательную отмывку клеток низкосолевым буфером перед выделением методом термокоагуляции.

После элиминации микоплазм из зараженной культуры возможны ложноположительные результаты ПЦР из-за наличия ДНК погибших бактерий. Поэтому контроль за излеченностью культуры от микоплазм желательно проводить несколькими методами.

В контроле за чистотой клеточных культур самым сложным является выявление трех видов контаминации — микоплазменной, вирусной и кроссконтаминации другими клеточными линиями. Методом выбора для их выявления служит ПЦР. Наивысшим качеством и доступной ценой обладают наборы реактивов для клинической диагностики методом ПЦР. Мы показали возможность эффективного применения доступных на российском рынке коммерческих наборов медицинского назначения: для выявления возможной микоплазменной контаминации — наборов для определения ОБМ и *M. hominis*, для выявления вирусной контаминации и кросс-контаминации культур — наборов для определения *HPV*, герпесвирусов, аденовируса и рекомендуем их для рутинного мониторинга чистоты клеточных культур.

Авторы благодарны руководителю Банка клеточных культур Института цитологии РАН Г. Г. Полянской, сотрудникам Отдела клеточных культур и лично А. С. Мусориной за предоставленные препараты культур клеток. Авторы признательны О. Э. Красовской за ценные замечания по поводу результатов работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО НПП «Лаборатория ДНК-Диагностики».

Список литературы

- Бауэр Х. М., Грир К. Е., Мано М. М. 1999. Применение ПЦР для диагностики папилломавирусных инфекций гениталий. В кн.: Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мир. 448—473. (Bauer H. M., Greer C. E., Manos M. M. 1992. Determination of genital human papillomavirus infection using consensus PCR. In: Diagnostic molecular pathology: a practical approach. United Kingdom, Oxford: Oxford Univ. Press. 132—152.)
- Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вишняков И. Е. 2016. Микоплазмы в биологии и медицине начала 21-го века. СПб.: Наука. 420 с. (Borchsenius S. N., Chernova O. A., Chernov V. M., Vishnyakov I. E. 2016. Mycoplasmas in biology and medicine of the early 21st century. St. Petersburg: Nauka. 420 p.)
- Говорун В. М. 1999. Молекулярно-биологические методы выявления и идентификации инфекционных агентов. В кн.: Клиническая лабораторная аналитика. Т. 2. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. М.: Лабинформ, РАМЛД. 301—322. (Govorun V. M. 1999. Molecular and biological methods for detection and identification of infectious agents. In: Clinical laboratory analyst. Vol. 2. Particular analytical techniques in the clinical laboratory. Moscow: Labinform, RAMLD. 301—322.)
- ГОСТ Р 51352—2013. 2014. Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Методы испытаний. М.: Стандартинформ. 26 с. (GOST R 51352—2013. 2014. Medical devices for *in vitro* diagnosis. Test methods. Moscow: Standartinform. 26 p.)
- Жуланова Е. Ю., Вонский М. С., Лисин В. В., Ефремова Т. Н., Борхсениус С. Н. 1993. Диагностика микоплазменных заражений с помощью направленной амплификации. Молекуляр. генет. микробиол. вирусол. 2 : 9—13. (Zhulanova E. Y., Vonsky M. S., Lisin V. V., Efremova T. N., Borchsenius S. N. 1993. Diagnosis of *Mycoplasma* infections using directional amplification. Mol. Genet. Microbiol. Virol. 2 : 9—13.)
- Назарова Н. М., Прилепская В. Н., Суламанидзе Л. А., Мзарелуа Г. М., Бестаева Н. В. 2013. Папилломавирусная инфекция: распространенность, диагностика и лечение. Лечащий врач. 11 : 15—18. (Nazarova N. M., Prilepskaya V. N., Sulamanidze L. A., Mzarelua G. M., Bestaeva N. V. 2013. Human papillomavirus infection: incidence, diagnosis and treatment. Therapist. 11 : 15—18.)
- Полянская Г. Г., Ефремова Т. Н. 2010. Влияние *Mycoplasma salivarium* в отсутствие и в присутствии L-аргинина на карiotипическую изменчивость в клеточной линии фибробластов кожи индийского мунтжака при длительном культивировании. Цитология. 52 (12) : 997—1004. (Poljanskaya G. G., Efremova T. N. 2010. The influence of *Mycoplasma salivarium* in the absence and presence of L-arginine on karyotypic variability in cell line of the indian muntjak skin fibroblasts under long-term cultivation. Tsitologiya. 52 (12) : 997—1004.)
- Чернов В. М., Чернова О. А., Санчес-Вега Х. Т., Колпаков А. И., Ильинская О. Н. 2014. Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов. Acta naturae. 6 (3) : 43—54. (Chernov V. M., Chernova O. A., Sanchez-Vega X. T., Kolpakov A. I., Ilyinskaya O. N. 2014. Mycoplasma contamination of cell cultures: vesicular traffic in bacteria and control over infectious agents. Acta naturae. 6 (3) : 43—54.)
- Adey A., Burton J. N., Kitzman J. O., Hiatt J. B., Lewis A. P., Martin B. K., Qiu R., Lee Ch., Shendure J. 2013. The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. Nature. 500 : 207—211.
- Berk A. J. 2013. Adenoviridae. In: Fields virology. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2 : 1704—1731.
- Bidle K. D., Azam F. 1999. Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages. Nature. 397 : 508—512.
- Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen P. M. E., van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28 : 495—503.
- Broccolo F., Chiari S., Piana A., Castiglia P., Dell'Anna T., Garcia-Parra R., Maneo A., Villa A., Leone E. B., Perego P., Maida A., Mangioni C., Cocuzza C. E. 2009. Prevalence and viral load of oncogenic human papillomavirus types associated with cervical carcinoma in a population of North Italy. J. Med. Virol. 81 : 278—287.
- Constandinou-Williams C., Collins S. I., Roberts S., Young L. S., Woodman C. B., Murray P. G. 2010. Is human papillomavirus viral load a clinically useful predictive marker? A longitudinal study. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 19 : 832—837.
- Drexler H. G., Uphoff C. C. 2000. Contamination of cell culture, mycoplasma. In: Encyclopedia of cell technology. New York: Wiley. 1 : 609—627.
- Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J. Gen. Virol. 36 : 59—74.
- Harasawa R., Uemori T., Asada K., Kato I. 1993. Sensitive detection of mycoplasmas in cell cultures by using two-step polymerase chain reaction. In: Rapid diagnosis of mycoplasmas. FEMS Symposium N 62. New York; London: Plenum Press. 227—232.
- Hesselink A. T., Berkhof J., Heideman D. A., Bulkman N. W., van Tellingen J. E., Meijer C. J., Snijders P. J. 2009. High-risk human papillomavirus DNA load in a population-based cervical screening cohort in relation to the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Int. J. Cancer. 124 (2) : 381—386.
- ISO/TS 17822-1 : 2014. 2014. *In vitro* diagnostic test systems — Qualitative nucleic acid-based *in vitro* examination procedures for detection and identification of microbial pathogens — Part 1 : General requirements, terms and definitions. ISO Standards. ISO OBP, www.iso.org. 30 p.
- Maass V., Kern J. M., Poeckl M., Maass M. 2011. Sequence homologies between *Mycoplasma* and *Chlamydia* spp. lead to false-positive results in chlamydial cell cultures tested for *Mycoplasma* contamination with a commercial PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 49 : 3681—3682.
- Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J. Clin. Lab. Anal. 16 : 47—51.
- McGarrity G. J., Kotani H. 1985. Cell culture mycoplasmas. In: The mycoplasmas. Mycoplasma Pathogenicity. New York: Acad. Press. 4 : 353—390.
- Parkin D. M. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int. J. Cancer 118 : 3030—3044.
- Patel J. N. 2016. Cancer pharmacogenomics, challenges in implementation, and patient-focused perspectives. Pharmacogen. Personalized Med. 9 : 65—77.
- Rottem S., Kosower N. S., Kornspan J. D. 2012. Contamination of tissue cultures by Mycoplasmas. In: Biomedical tissue culture. InTech. 2012-10-17 ISBN 978-953-51-0788-0, under CC BY 3.0 license. 35—58.
- Ryan J. 2008. Understanding and managing cell culture contamination. Corning Tech. Bull. New York: Corning Inc. 22 p.
- Schlegel R. 1994. Method for producing immortalized cell lines using human papillomavirus genes. Патент US 5376542 A. Опубликовано 27.12.1994.
- Snijders P. J. F., Hogewoning C. J., Hesselink A. T., Berkhof J., Voorhorst F. J., Bleeker M. C., Meijer C. J. 2006. Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology. Int. J. Cancer. 119 : 1102—1107.
- Uphoff C. C., Drexler H. G. 2011. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. Methods Mol. Biol. 731 : 93—103.
- Uphoff C. C., Drexler H. G. 2013. Detection of mycoplasma contaminations. Methods Mol. Biol. 946 : 1—13.
- Veilleux C., Razin S., May L. H. 1996. Detection of mycoplasma infection by PCR. In: Molecular and diagnostic procedures on mycoplasma. London: Acad. Press. 2 : 431—438.

CELL CULTURES PURITY CONTROL BY METHODS OF CLINICAL DIAGNOSTICS

A. V. Morozova^{1, 2, *} *S. N. Borchsenius*^{1, 2} *I. E. Vishnyakov*¹ *A. Yu. Malinin*^{1, 2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² Research and Production Enterprise «Laboratory of DNA-Diagnostics» LLC, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: avmoro@gmail.com

Cell cultures of higher organisms, especially cultures of human cells, are increasingly used in medical, pharmaceutical and scientific research. The main problem of cell cultures — non-lethal hidden contamination by mycoplasmas, viruses and outsider cell lines. As an available and reliable method for monitoring the purity of the cell cultures, we offer to use PCR kits designed and officially used in clinical diagnostics. We have tested 50 human cell lines using commercial diagnostic systems for detection of papilloma viruses, herpes viruses, adenoviruses, *Mycoplasma hominis* and total bacterial mass. Contamination in tested cell lines was not found. In the case of cell lines that contain integrated parts of viral genomes, the presence of the respective DNA sequences was confirmed. The proposed diagnostic systems can be effectively used to control the purity of cell lines, for qualitative detection of possible contamination, as well as for quantitative evaluations with calculation of viral load like it is practiced in clinical diagnostics.

Key words: cell cultures contamination, PCR, mycoplasmas, papillomaviruses, herpesviruses
