

ДЕТЕКЦИЯ МИКОПЛАЗМ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЭУКАРИОТ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ОБРАЗЦА

© 2020 г. А. А. Чапленко¹, *, О. В. Меркулова¹, И. С. Семенова¹, А. Р. Сайфутдинова¹,
Е. В. Мельникова¹, В. А. Меркулов¹

¹Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава РФ, Москва, 127051 Россия

*E-mail: a.a.chaplenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.09.2019 г.

После доработки 10.10.2019 г.

Принята к публикации 15.10.2019 г.

Детекция микоплазменной контаминации – важный этап контроля качества клеточных линий эукариот, как используемых при производстве биотехнологических лекарственных препаратов, так и входящих в состав биомедицинских клеточных продуктов. Предложенные в Государственной Фармакопее методы анализа: микробиологический (культуральный) и цитохимический (индикаторной клеточной культуры) выполняются в течение нескольких суток, сложно стандартизируются, а их результат субъективно интерпретируется оператором. Альтернативные молекулярно-генетические методы анализа, наиболее широко используемым из которых является ПЦР, отличаются экспрессностью, однако менее чувствительны. Для решения данной проблемы используют предварительное концентрирование образца клеточной линии. В настоящем исследовании мы сравнили эффективность различных способов пробоподготовки образца, оценили влияние его состава на параметры процесса концентрирования, а также провели валидацию комбинированной методики детекции на примере двух видов микоплазм: *Mycoplasma arginini* и *Acholeplasma laidlawii*.

Ключевые слова: микоплазма, ПЦР, биомедицинские клеточные продукты, контаминация клеточных линий

DOI: 10.31857/S0041377120010034

Контаминация клеточных линий бактериями класса Mollicutes, в том числе микоплазмами, ахлеплазмами и уреоплазмами, является одной из наиболее часто встречающихся проблем при культивировании клеток эукариот. Согласно литературным данным, доля контаминированных линий варьируется от 15 до 80% в зависимости от типа клеток, источника их получения и методов культивирования (Langdon, 2004). Продукты на основе соматических клеток человека перед введением пациенту обязательно должны быть протестированы на присутствие микоплазм.

В ГФ XIV (ОФС.1.7.2.0031.15 “Испытание на присутствие микоплазм”), Европейской Фармакопее (раздел 2.6.7.) и Фармакопее США (раздел 63) описаны методы детекции данного контаминанта: микробиологический (культуральный) и цитохимический (индикаторной клеточной культуры). Также заявлены требования к чувствительности методов детекции на уровне 10–100 КОЕ/мл.

Ключевое преимущество традиционного культурального метода детекции микоплазм – высокая чувствительность, возможность обнаружить еди-

ничные жизнеспособные клетки микроба. Однако сложность стандартизации, субъективная интерпретация результатов, а также необходимость длительной инкубации сводят к минимуму удобство использования метода и достоверность получаемых данных.

В качестве альтернативы исследователями предложены методики детекции микоплазм, основанные на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), как с электрофоретической детекцией (van Kuppeveld et al., 1992, 1994; Ossewaarde et al., 1996; Kong et al., 2000, 2001; Bruchmüller et al., 2006), так и с детекцией в реальном времени (Jurstrand et al., 2005; Ishikawa et al., 2006; Dumke et al., 2007; Störmer et al., 2009). Разработано большое количество коммерческих наборов для ПЦР детекции микоплазм, как российского (“АмплиСенС”, “МИК-КОМ”), так и зарубежного (“Microsart ATMP Mycoplasma”, “E-myc”, “LookOut Mycoplasma PCR Detection Kit” и др.) производства. Заявленный предел обнаружения ПЦР-методик составляет 1–10 копий генов микоплазмы в 1 мкл образца, однако неясным остается соотношение числа копий ДНК в пробе и КОЕ микоплазмы в 1 мл исходного образца. Также остается