

УДК 57.085.23:579.887

ИСПЫТАНИЕ НА ПРИСУТСТВИЕ МИКОПЛАЗМ МЕТОДОМ ИНДИКАТОРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ**Н.С. Куцерубова, М.П. Богрянцева, С.В. Усова, И.Ф. Радаева, Е.А. Нечаева***ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, г. Новосибирск, Россия*

Безопасность иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), получаемых из культур клеток, напрямую связано как с самими клетками, так и их компонентами, а также с присутствием в них контаминантов микробного и вирусного происхождения. Одним из распространенных контаминантов являются микоплазмы. Риск контаминации микоплазмами культур клеток, сывороток, питательных сред, вирусных сборов, используемых при производстве вакцин, является на сегодняшний день серьезной проблемой при производстве ИЛП.

Выявление микоплазменной контаминации ИЛП определяется требованиями нормативной документации. В настоящее время основными методами, рекомендованными Государственной Фармакопеей Российской Федерации XIV издания для выявления микоплазм, являются микробиологический (культуральный) метод и метод индикаторной клеточной культуры с использованием флуоресцирующего красителя ДНК (цитохимический). [1–4].

Культуральный метод, рекомендованный в последних изданиях американской, европейской, японской фармакопей в качестве «золотого стандарта» определения микоплазм, имеет ряд недостатков [5]: длительное время анализа (28 суток); чувствительность теста зависит от правильного приготовления сред, качества компонентов сред, а также от неправильного хранения образцов.

Цитохимический метод выявления микоплазм основан на внесении испытуемого образца в клеточную культуру, чувствительную к микоплазмам (обычно Vero), и последующей обработке культуры клеток специфическим флуоресцирующим красителем Hoechst-33258. Микоплазмы в культурах клеток обнаруживаются в виде отдельных мелких (0,1–0,3 мкм диаметром) гранул или скоплений, расположенных вне клеток или на их поверхности. В препаратах клеток, свободных от микоплазм, наблюдается флуоресценция ядер, цитоплазма при этом почти не светится [6,7]. Недостатками этого метода являются длительность времени анализа (инкубация до 5 суток), метод не прост в использовании, необходимы специальная клеточная культура, среда, а также люминесцентный микроскоп.

Цель настоящей работы является усовершенствование метода выявления микоплазменной контаминации в иммунобиологических лекарственных препаратах с помощью метода индикаторной клеточной культуры с использованием флуоресцирующего красителя ДНК с визуализацией на цитофлюориметре Cellavista.

Цитофлюориметр Cellavista – это платформа для быстрого анализа клеток в режиме светлого поля и множественной флуоресценции. В работе цитофлюориметра используется специально разработанная оптика в сочетании с исключительно быстрым автофокусом для доставки изображений высокого качества на персональный компьютер. Данный прибор является усовершенствованным аналогом люминесцентного микроскопа.

В ходе экспериментальных работ определение микоплазм в культурах клеток проводилось методом индикаторной клеточной культуры (цитохимический) с использованием флуоресцирующего красителя ДНК, для прижизненной окраски клеточных ядер использовали краситель 4'-6-диамино-2-фенилидол (DAPI). Для этой цели были использованы следующие перевиваемые линии клеток: L-929 (мышь, фибробласты подкожной соединительной ткани, клон линии клеток L) и MDCK (собака, почка), Vero – эпителий почки (зеленая мартышка), для выращивания которых была применена питательная среда Игла MEM производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия) с 10 % сыворотки эмбриональной телячьей «Gibco» (США). На 2 сутки инкубации часть клеток контаминировали ОСО Mycoplasma arginine G 230 (Россия) с титром стандартного образца 1×10^{-7} КОЕ/мл. Далее образцы культивировали еще 2 суток при условии CO_2 (36 ± 1) °C.

Для определения микоплазмы анализируемые клетки выращивали на покровных стеклах, в течение 2–3 сут, и на 96-луночных планшетах, затем фиксировали, окрашивали, промывали и просматривали на приборе цитофлюориметре Cellavista и на люминесцентном микроскопе.

При сравнительном исследовании препаратов как на цитофлюориметре так и на люминесцентном микроскопе, были выявлены контаминированные Mycoplasma arginine G 230 культуры клеток (рис. 2) так и чистые культуры клеток MDCK, Vero и L-929 (рис. 1).

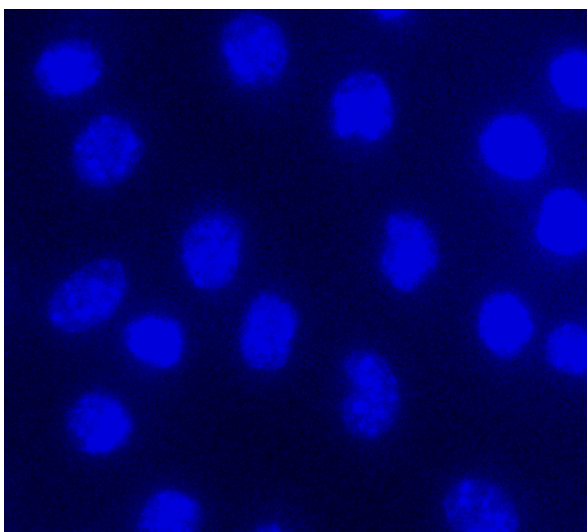


Рисунок 1. Выявление микоплазм на цитофлюориметре Cellavista, окраска красителем 4'-6-диамино-2 – фенилидол (DAPI) – культура клетки L-929 (свободна от микоплазм)

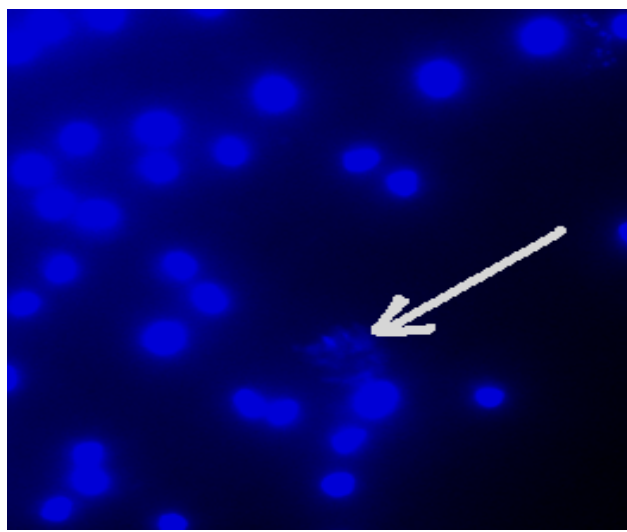


Рисунок 2. Выявление микоплазм на цитофлюориметре Cellavista, окраска красителем 4'-6-диамино-2 – фенилидол (DAPI) – культура клетки L-929 загрязненная микоплазмами (указаны стрелками)

В результате работы было показано, что преимуществом метода индикаторной клеточной культуры с использованием флуоресцирующего красителя ДНК с визуализацией на цитофлюориметре Cellavista, в сравнении с работой на люминесцентном микроскопе является возможность контролировать большее количество образцов одновременно, проведение анализов не только на покровных стеклах, но и на 96-луночных планшетах, получение результата от 3 суток до нескольких часов с выводением результатов на персональный компьютер.

Предложенный метод был валидирован, и было подтверждено, что метод индикаторной клеточной культуры с визуализацией на цитофлюориметре Cellavista соответствует заявленным требованиям Государственной Фармакопеи.

ЛИТЕРАТУРА

Кудерубова Н.С. и др. Выявление микоплазм в иммунобиологических лекарственных препаратах. Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения // Материалы XI съезда Всерос. науч.-практ. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 16–17 ноября 2017 г.) Под ред. А.Ю. Поповой. СПб. ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 2017. С. 134.

ГФ XIV изд., т. 2, М., 2018 г. стр. 2997–3008 [Электронный источник] – URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. (дата обращения: 30.07.2019)

Бердникова З.Е. Разработка и стандартизация методов выявления микоплазм контаминантов медицинских биологических препаратов: дис. канд. биолог, наук. – М., 1991. – 136 с.

Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика. – СПб., 2002.

Ёлшин Н.Д., Петров А.В. Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2017. Т. 17. № 3 (63). С. 173–179.

Drexler H.G., Uphoff C.C. Contamination of cell culture, Mycoplasma // Encyclopedia of cell technology / Ed. by R.S. Spier. – N.Y.; Toronto, 2000. – Vol. 1. – P. 609–627.

Усова С.В. и др. Контаминация микоплазмами культуральных вирусных вакцин // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2014. – Т. 12. – № 4. – С. 59–67.