

Микоплазмы — контаминанты клеточных культур

Н. В. Шалунова, Р. А. Волкова, А. Р. Волгин, Е. М. Петручук, З. Е. Бердникова, Е. В. Эльберт, В. А. Шевцов, А. В. Рукавишников, И. С. Семенова, О. В. Меркулова, Г. А. Трусов, Н. В. Терешкина, О. А. Рачинская, И. Н. Индикова, Е. В. Лебединская, Е. Д. Мыца

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Безопасность биопродуктов, получаемых из клеток животных, связана со свойствами самих клеток или их компонентов, а также с возможным присутствием в них контаминантов микробного и вирусного происхождения. Пригодность клеточного субстрата для производства профилактических препаратов нередко определяется совершенством производственного процесса, который позволяет обеспечивать пользу/риск получаемого продукта. Одним из распространенных контаминантов клеточных субстратов являются микоплазмы, относящиеся к классу Mollicutes. Они отличаются от других микроорганизмов отсутствием клеточной мембраны, паразитированием на различных видах животных и растений, на поверхности или внутри клеток. Некоторые виды микоплазм потенциально патогенны для человека, *in vitro* конкурируют с клетками за питательные вещества, вызывают хромосомные aberrации, препятствуют нормальному метаболизму клеток. Выявление микоплазменной контаминации клеточных субстратов при производстве профилактических препаратов определяется требованиями нормативных документов.

Ключевые слова: клеточные культуры; первичные клетки; диплоидные клеточные линии; перевиваемые линии клеток; контаминанты; микоплазмы; питательные среды; методы определения микоплазм; флуоресценция; полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Библиографическое описание: Шалунова НВ, Волкова РА, Волгин АР, Петручук ЕМ, Бердникова ЗЕ, Эльберт ЕВ, Шевцов ВА, Рукавишников АВ, Семенова ИС, Меркулова ОВ, Трусов ГА, Терешкина НВ, Рачинская ОА, Индикова ИН, Лебединская ЕВ, Мыца ЕД. Микоплазмы-контаминанты клеточных культур. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2016; 16 (3): 151–160.

В вирусологических исследованиях в настоящее время используются свыше 200 первичных и перевиваемых (в том числе трансформированных) клеточных линий. Достоверно известно, что как сами клетки, так и процессы, связанные с клеточным ростом, могут влиять на безопасность производимых иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП). Для разработки системы контроля качества препарата необходимо, в первую очередь, всестороннее изучение свойств клеточных субстратов.

Приемлемость определенного типа клеток (первичных, перевиваемых (диплоидных или гетероплоидных)) в качестве субстрата для производства отдельных ИЛП, зависит от множества факторов, среди которых важным является знание их основных биологических характеристик. Оценка данных, доступных для изучения, позволяет определить возможность регистрации препарата, произведенного в использованном клеточном субстрате.

Начиная с 50-х годов прошлого века первичные культуры клеток, полученные из ткани или органов одного или нескольких организмов, на протяжении десятилетий использовались во всем мире для производства живых и инактивированных вирусных вакцин. Например, первичные культуры клеток, полученные из почек обезьян, до настоящего времени используются для производства инактивированной и живой пероральной полиомиелитной вакцины [1–3].

Большие успехи в контроле над вирусными заболеваниями, такими как желтая лихорадка, полиомиелит, корь, паротит, краснуха были достигнуты благодаря широкому использованию вакцин, полученных в первичных культурах клеток куриных и перепелиных эмбрионов, почек обезьян, собак, кроликов, хомяков и других животных [3, 4]. Преимуществом первичных культур клеток является

то, что они обладают большой чувствительностью к разнообразным вирусам и их относительно несложно получить при использовании обычных питательных сред и сывороток крови животных.

В качестве альтернативного субстрата производства первичным культурам в 1960-х годах были предложены диплоидные клетки, преимуществом которых явилась возможность сохранять их в криобанках при низких температурах с первых пассажей после становления линии с начальным уровнем удвоения популяции и предварительно аттестовывать с тем, чтобы использовать в течение многих десятилетий для производства ИЛП [5–7].

При аттестации коллекций клеточных культур, главного банка (ГБК) и рабочего банка клеток (РБК) в биотехнологических производствах особое место занимает разработка методов, обеспечивающих выявление стабильности культуральных и морфофункциональных свойств клеток [3, 8–10].

Перевиваемые клеточные линии (ПКЛ) для производства ИЛП применяются с 1970 годов в связи с разработкой и большой потребностью в интерфероне альфа (ИФН- α), субстратом которого являлись лимфобластоидные клетки человека Namalwa, выращенные *in vitro*. Основные опасения, связанные с использованием клеток Namalwa, касались возможного содержания в них встроенного в клеточную ДНК генома вируса Эпштейна-Барр (EBV), и передачи реципиентам препаратов либо целого вируса, либо ДНК, содержащей элементы вируса. Тем не менее, к концу 1970 годов было проведено клиническое исследование ИФН- α , и он был зарегистрирован в ряде стран. Среди наиболее важных причин, повлиявших на это решение, был тот факт, что ИФН- α , в противоположность живым вирусным вакцинам, представляет собой белок, который ис-

пользуется как терапевтическое средство для лечения, поэтому оценка соотношения пользы/риска отличалась от требований к профилактическим препаратам. Кроме того, значительно усовершенствованные технологии позволили выполнять тщательную очистку ИФН- α до пределов возможного диагностического количественного определения EBV и клеточной ДНК в конечном продукте (цитировано по WHO Technical Report Series, 2013, No. 978, С. 86 [3]).

Дальнейшее использование ПКЛ в качестве субстратов для производства обширного спектра ИЛП вновь поставило вопрос о безопасности получаемых продуктов, связанной с присутствием различных контаминантов [11–13].

В 1987–1998 гг. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) были опубликованы требования к перевиваемым линиям, используемым в качестве субстратов ИЛП. ВОЗ пришла к выводу, что ПКЛ могут являться субстратом при условии, что в процессе производства устраняются потенциальные контаминирующие агенты, патогенные для человека, и до приемлемого уровня сокращается содержание клеточной ДНК и/или элиминируется ее биологическая активность настолько тщательно, насколько позволяют диагностические методы [14–16].

В течение последующих десяти лет было изучено множество ПКЛ с точки зрения их преимуществ и безопасности. К ним, например, относятся модифицированные линии опухолевых клеток HeLa, клетки почек собак (MDCK), хомяков (CHO), культура почек эмбриона человека 293, почки обезьян (Vero), используемые для производства инактивированных и живых вирусных вакцин [17], и иммуноглобулинов, в том числе и против особо опасных инфекций [18–21]. Позднее было предложено использовать в производстве ИЛП линии клеток насекомых и ствольных (SCL), но с их применением возникают проблемы, связанные с исследованием, описанием характеристик, частой микробной, в том числе микоплазменной контаминацией [3].

Термин «Микоплазма» был использован Альбертом Бернардом Франком в 1889 г., который посчитал ее грибом. О первом выделении и культивировании этого возбудителя сообщили Нокар и Ру в 1898 г. [22] Позднее его начали называть организмом, подобным плевропневмонии (PPLO). О выделении возбудителя из зараженных клеточных культур впервые сообщили L. Nauflick 1955 г. [23]; L. V. Robinson в 1956 г. [24].

Ранее считалось, что микоплазмы занимают промежуточное положение между бактериями и вирусами. От вирусов они отличаются способностью расти в бесклеточной среде, а от бактерий — отсутствием клеточной стенки. В настоящее время микоплазмы принято относить к бактериям, которые представляют собой группу мелких микроорганизмов, способных к автономному существованию

и размножению и имеют округлую, овальную или вытянутую форму с оболочкой, представляющую собой элементарную цитоплазматическую мембрану. На ультратонких срезах клеток при просмотре в электронном микроскопе микоплазмы размером от 0,1 до 0,3 мкм выявляются в межклеточном пространстве, на цитоплазматической мембране клеток.

В литературе представлены сообщения о выделении из клеточных линий не менее 20 видов микоплазм, из них 95 % случаев приходится на 7 видов, наиболее часто встречающихся в клеточных культурах животных и человека: *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. salivarium*, *Acholeplasma laidlawii*. При этом, несмотря на высокую специфичность в отношении природных хозяев, микоплазмы являются неспецифичными в отношении вида клеток, инфицируемых *in vitro*. ПКЛ оказываются зараженными микоплазмами приблизительно в 1 % случаев, культуры, прошедшие первые 3–5 пассажей — до 5 % случаев, средняя зараженность длительно перевиваемых линий составляет от 15 до 35 %. В начале 1990-х годов были обнародованы результаты проверки на наличие микоплазменной контаминации коллекций клеточных культур в лабораториях ряда стран. Оказалось, что в коллекциях США 15 % культур инфицировано микоплазмами, в Японии — 80 %, в Аргентине — 65 %, в Израиле — 32 % [25]. Относительная встречаемость различных видов микоплазм неодинакова в лабораториях разных районов мира и меняется со временем. В таблице представлены источники контаминации клеточных культур различными видами микоплазм и относительное количество инфицированных культур [26, 27]. Подавляющее большинство микоплазм, инфицирующих клеточные культуры, принадлежит только 6 видам, в первую очередь, человеческого, бычьего или свиного происхождения (табл. 1).

Истинная распространенность микоплазменной инфекции клеточных культур может быть выше, чем публикуемые данные, так как чувствительность методов, используемых для тестирования контаминантов, различна.

Присутствие микоплазм в клеточных культурах нередко приводит к значительному изменению скорости роста клеток и их пролиферативной активности. Характерным признаком микоплазменной инфекции клеточных культур является наличие зернистости, вакуолизации, образование многоядерных клеток, изменение клеточного метаболизма и митотической активности, а при острой форме возможны пикноз, деструкция и даже потеря клеточной линии [28]. На рисунках 1 и 2 представлены клеточные культуры RK-13 и Vero, в которых впоследствии при микробиологическом посеве и при окраске клеток красителем Hoechst 33258 была выявлена микоплазменная контаминация.

Таблица 1. Наиболее распространенные виды микоплазм, обнаруженные в клеточных культурах [26, 27]

Вид	Источник происхождения	1958–1972	1966–1982	1973–1979	1988	2002
<i>M. hyorhinis</i>	Свиньи	15.9 %	30.1 %	2.0 %	26 %	10–40 %
<i>M. orale</i>	Человек, приматы	38.8 %	34.4 %	41.3 %	34 %	20–40 %
<i>M. arginini</i>	Крупный рогатый скот, овцы, козы	21.4 %	24.8 %	2.3 %	21 %	20–30 %
<i>M. fermentans</i>	Человек, приматы	0.36 %	4.1 %	1.3 %	13 %	10–20 %
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Животные, растения, почва	8.5 %	9.7 %	20.0 %	5 %	5–20 %
<i>M. hominis</i>	Человек, приматы	6.1 %	2.4 %	1.8 %	–	10–20 %

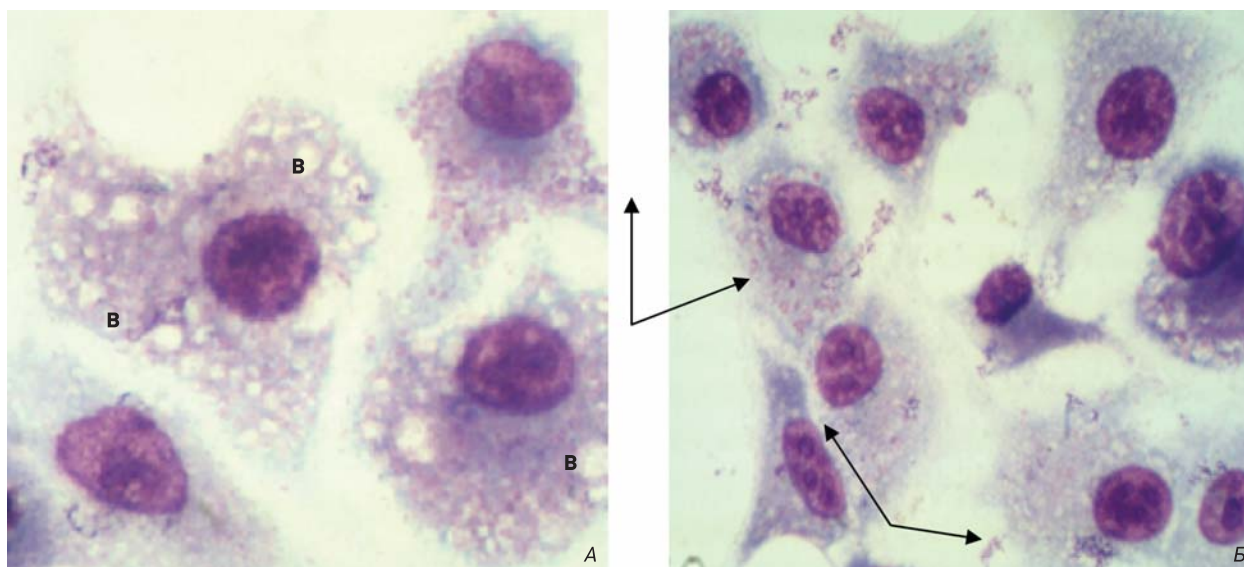


Рис. 1. Культура клеток РК-13, 4 пассаж. Выраженный клеточный полиморфизм, вакуолизация цитоплазмы (В). В цитоплазме клеток и во внеклеточном пространстве выявлены мелкие преимущественно палочковидные и нитевидные образования фиолетово-красного цвета (указаны стрелками). Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение $\times 250$.

Источником контаминации микоплазмами является сыворотка крови животных — компонента питательных сред при культивировании культур клеток, а также внутрилабораторная передача инфекции из окружающей среды (из воздуха и/или от персонала, от лабораторного оборудования, при несоблюдении правил работы в изолированном помещении) [29, 30]. В результате работы в одном боксе с инфицированной клеточной культурой ранее свободные от микоплазмы линии клеток, как правило, оказываются контаминированными.

В латентной форме микоплазменная инфекция не вызывает видимых изменений клеток, и без специального анализа может оставаться незамеченной исследователю при уровне зараженности до сотни микоплазм на одну эукариотическую клетку.

В соответствии с правилами GMP работу с клеточными культурами во избежание контаминации следует проводить в асептических условиях окружающей среды. Усло-

вия работы должны регулярно контролироваться путем постоянного отбора проб в рабочей зоне и проведением соответствующих микробиологических контролей [31].

Описано большое количество способов выявления микоплазм в исследуемых образцах клеточных культур. Используемый метод обнаружения должен быть чувствительным и точным, но в то же время простым, быстрым, эффективным и экономичным. Применение большинства описанных в литературе методов выявления микоплазм и оценка их эффективности часто зависит от специализации лабораторий и квалификации персонала.

Методы индикации и идентификации микоплазм традиционно делятся на прямые и косвенные. К прямым относится классический микробиологический метод выращивания колоний микоплазм на питательной среде [3, 26, 32] и окрашивание препаратов флуорохромами (прямое окрашивание исследуемой или индикаторной клеточной культуры ДНК флуорохромами (DAPI; Hoechst

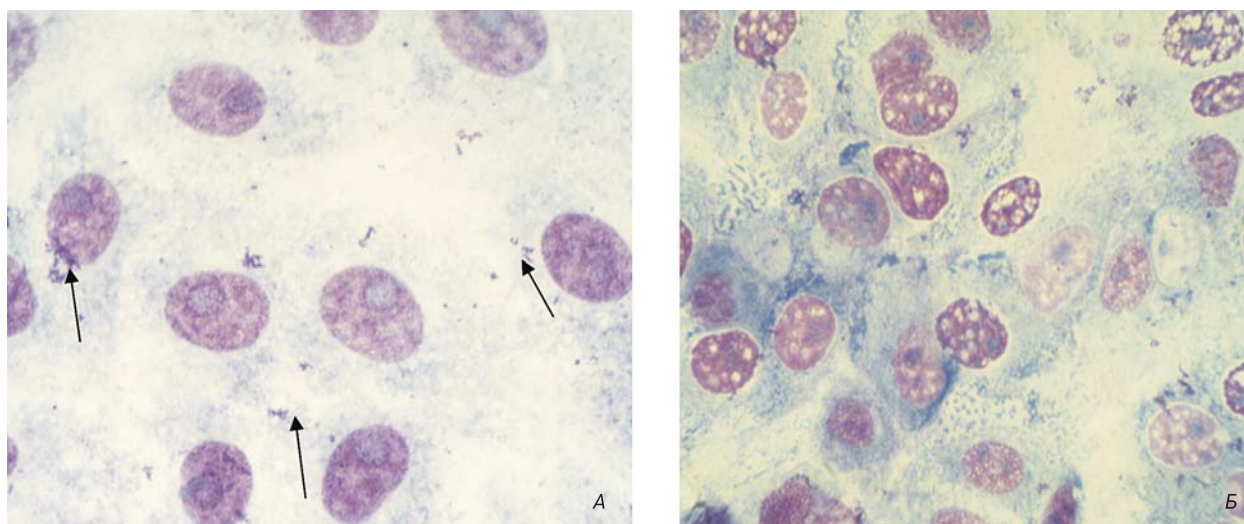


Рис. 2. Культура Vero, 3 и 4 пассаж. В некоторых клетках вакуолизация ядра (Б). В цитоплазме клеток и во внеклеточном пространстве выявлены мелкие преимущественно палочковидные и нитевидные образования фиолетово-красного цвета (указаны стрелками). Окраска по Романовскому-Гимзе. Увеличение $\times 250$.

33258, антибиотик — оливомицин) [30, 32, 33], а как косвенным — иммунофлуоресценция, иммуноферментный анализ (ИФА), молекулярно-биологические анализы — полимеразная цепная реакция (ПЦР); флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH); электронная микроскопия, использование видоспецифических гипериммунных сывороток, меченных флуоресцеином и другие [26–28, 30–33].

Самый приемлемый метод — это посев на жидкие или содержащие различное количество агара питательные среды. Европейская фармакопея 8,0 (ЕФ) рекомендует несколько прописей микробиологических сред, в которые в обязательном порядке входит экстракт бычьего сердца и агар. Для обнаружения большинства микоплазм прежде всего рекомендуются среды Хейфлика — жидкая и твердая. Приводятся также прописи сред Фрея, Фриса, рекомендуемые для выявления многих видов микоплазм, которые содержат различные аминокислоты и витамины. В качестве универсальной среды для высева микоплазм, контаминирующих клеточные культуры, в США предложены коммерческие среды с агаром, выпускаемые фирмами «Napa» и «Dupont». При проведении посевов используется два набора сред: бульонная (жидкая) и твердая. Окончательные результаты учитываются на 21 сутки, после посева с бульонной культуры на твердую питательную среду [34].

Обязательным компонентом питательных сред является сыворотка крови животных (лошадиная, свиная, иногда бычья) и пенициллин. Жидкие среды нередко содержат в своем составе феноловый красный. В твердую среду добавляется 15 г/дм³ агара. Жидкую среду инкубируют в плотно закрытых контейнерах (пробирках), твердую — чаще всего в чашках Петри, диаметром 60 мм в атмосфере азота; инкубацию посевов проводят при 36–38 °С. Каждая вновь приготовленная серия питательной среды должна быть предварительно испытана на чувствительность с помощью тест-штаммов, приготовленных из свежевыделенной культуры микоплазм, прошедших не более 15 пассажей в искусственных питательных средах.

В настоящее время международный стандарт (тест-штамм) для определения качества питательных сред отсутствует, поэтому для этих целей различными фирмами, как правило, используются стандартные образцы собственного производства, аттестованные в соответствии с требованиями ВОЗ [4], представляющие некий набор тест-штаммов различного рода и вида микоплазм: *A. laidlawii*, *M. galisepticum*, *M. fermentans*, *M. orale* и др. Для контроля чувствительности сред и определения ингибирующего действия ИЛП в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи 8,0 [34] возможно использование набора тест-штаммов микоплазм, полученных из музейных коллекций: *M. orale*, *M. fermentans*, *M. gallisepticum*, *M. hyorhinis*, *M. synoviae*.

Целью нашей работы на протяжении многих лет явилось создание системы контроля качества безопасности вакцинных препаратов, основанных на унификации и стандартизации методов обнаружения посторонних агентов, в том числе микоплазм.

В нашей стране Э. Е. Бердниковой в 1991 г. [35] в результате изучения различных прописей питательных сред, обеспечивающих выявление минимального количества микоплазм в селективной бульонной среде, впервые был предложен тест-штамм *Mycoplasma arginini* G 230, как наиболее распространенный среди крупного рогатого скота и птиц, субстраты которых чаще всего используются при приготовлении вакцин. Многочисленные эксперимен-

ты показали возможность с помощью этого штамма не только получать воспроизводимые результаты тестирования вновь приготовленных серий питательных сред, но и его способность дифференцировать их по чувствительности.

Тест-штамм изготавливается и изучается в соответствии с требованиями ВОЗ к стандартным образцам. Комплексное изучение тест-штамма *Mycoplasma arginini* G 230 позволило рекомендовать его в качестве референс-препарата (ОСО 42-28-378–2015 П) для контроля чувствительности вновь приготовленных серий питательной среды, предназначенной для испытания ИЛП, клеточных культур, сывороток крови животных на присутствие микоплазм. Полученный препарат не содержит посторонней микрофлоры и сохраняет свои свойства не менее 3–5 лет при хранении при минус 20–30 °С.

Описанное в нашей стране в нормативной документации (НД) выделение и культивирование микоплазм «микробиологическим методом» проводится на питательной среде, приготовленной на триптическом переваре бычьего сердца по прописи, разработанной профессором Г. Я. Каган совместно с отделом питательных сред ГУ НИИЗМ им. Н. Ф. Гамалеи в 1956 году. В отличие от сред Хейфлика, среда Каган содержит 0,3 % агара (так называемая полужидкая среда), чувствительность которой для выявления малых доз микоплазм была доказана контрольными испытаниями в производственных учреждениях нашей страны и исследованиями в ГИСК им. Л. А. Тарасевича в течение многих лет. Этот метод, при котором посева инкубируют непосредственно на полужидкую среду Каган, позволяющую одновременно выявлять аэробные и анаэробные возбудители, по чувствительности не уступает западным аналогам.

Необходимым условием правильности проведенного испытания на присутствие микоплазм является определение наличия ингибирующего действия на рост микоплазм для каждого наименования вновь испытываемого ИЛП. Ингибирующее действие может быть проведено одновременно с определением ростовых свойств питательной среды с помощью того же тест-штамма. При испытании ИЛП на присутствие микоплазм контрольно подлечат: культуральная жидкость контрольных клеточных культур, объединенный вирусный сбор, полученный в процессе приготовления вакцинного штамма, посевного вируса и вакцины [30].

При испытании клеточных линий, поступающих в ФГБУ «НЦЭСМП», для выявления контаминации микоплазмами используется посев на среду Каган, культивирование при 36–38 и 20–22 °С и окрашивание клеток с помощью флуоресцентных красителей Hoechst 33258 (бисбензимида) или DAPI (0,0002 % DAPI-4,6-диамидино-2-фенилиндол), реже — антибиотика оливомицина по методике, разработанной ранее [32, 33]. Перед анализом клетки культивируют без антибиотиков не менее 7 сут при температуре 36–37 °С на предметных стеклах, помещенных в чашки Петри. Стекла с монослоем клеток, не превышающем 50–70 %, отмывают в буферном растворе (рН 7,2–7,4), фиксируют в 96° этиловом спирте при комнатной температуре в течение 20–30 мин и высушивают на воздухе.

Окрашивание изучаемых клеточных линий проводят общепринятыми методами и анализируют с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager M2 («Carl Zeiss»), оборудованном ртутной лампой HXP 120 С и фильтром: set 49 П 365 АЕ 395 ИК 445/50 («Carl Zeiss») при

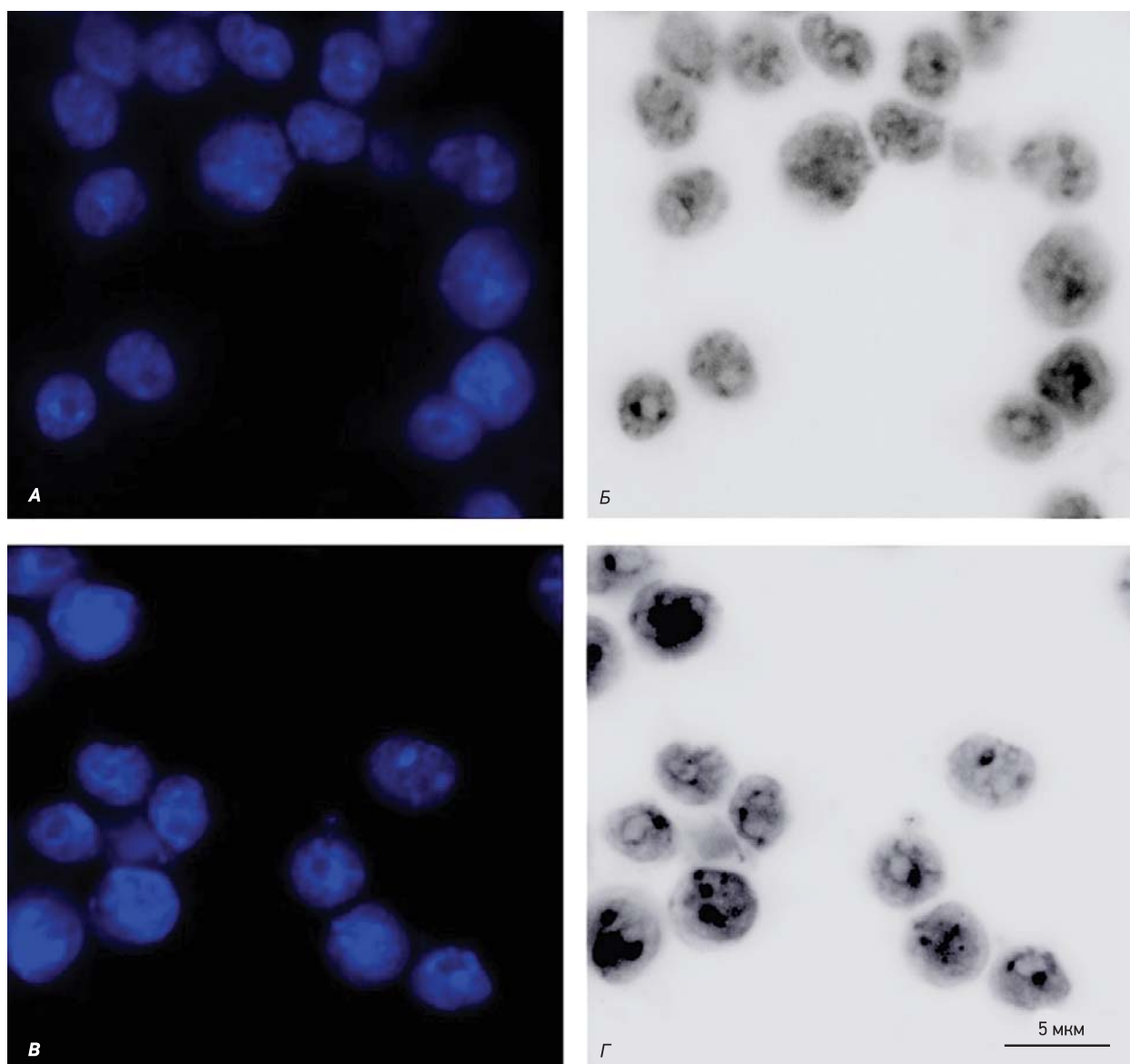


Рис. 3. Ядра клеток линий клеток WEHI 164 (мышь, фибросаркома): А — окраска Hoechst 33258; Б — окраска Hoechst 33258, представленная в оттенках серого; В — окраска DAPI; Г — окраска DAPI, представленная в оттенках серого.

100-, 400- и 1000-кратном увеличении. Фотографирование клеток осуществляли при 1000-кратном увеличении с помощью цифровой камеры AxioCam MRc5 («Carl Zeiss»). Полученные изображения обрабатывали с помощью компьютерной программы для работы с цифровым изображением Adobe Photoshop.

Флуоресцентные красители, протестированные на клетках линии WEHI 164 (мышь, фибросаркома), позволили получить сходные изображения ярко окрашенной ДНК ядер клеток с хорошо выраженными гетерохроматиновыми областями. Оба красителя не проявляли минорным или значительным фоновым свечением (отсутствие ложноположительного результата) (рис. 3). Был сделан вывод о возможном применении изученных красителей для выявления микоплазм.

Таким образом, анализ полученных данных позволяет сделать вывод о простоте и эффективности выявления микоплазм в культурах клеток цитохимическим методом с помощью окрашивания DAPI и Hoechst 33258. Использование компьютерной программы Adobe Photoshop для об-

работки изображений предоставляет удобную возможность для документирования полученных результатов.

В сравнительных исследованиях 16 клеточных (диплоидных и гетероплоидных) линий с помощью микробиологического и цитохимического методов было выявлено 6 образцов, контаминированных микоплазмами.

Одним из наиболее перспективных методов для выявления контаминации клеточных культур микоплазмами является молекулярно-биологический метод — полимеразная цепная реакция (ПЦР) [36–38].

ПЦР зарекомендовала себя в качестве достаточно простого, воспроизводимого и специфичного метода для определения контаминации в культуре клеток. Принцип ПЦР основан на многократном умножении части генома с последующей детекцией продукта с использованием различных методик. Время анализа снижается до одного дня, чувствительность — около 10^3 КОЕ/мл.

Нами проведен сравнительный ПЦР-анализ 9 клеточных линий с двумя вариантами универсальных праймеров:

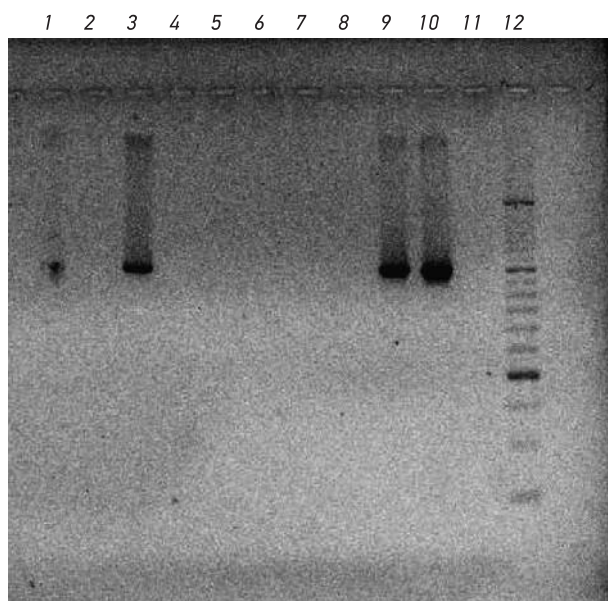


Рис. 4. Типичная электрофореграмма продуктов амплификации при использовании универсальных праймеров для выявления микроорганизмов рода *Mycoplasma* в образцах 9 линий клеток: 1 — Vero₁ WHO; 2 — Vero₂ WHO; 3 — MA104; 4 — Vero₃ WHO; 5 — HEP-2; 6 — HEK 293; 7 — WIL2S; 8 — WIL2S; 9 — RK 13; 10 — K+ («ООО *Mycoplasma arginini*», ЦЭК МИБП ФГБУ «НЦСЭМП»); 11–12 — Маркер 50 bp.

1) с использованием родových праймеров, предложенных Urphoff С. С., Drexler Н. G, в условиях амплификации согласно МР [36];

2) с использованием коммерческого набора реагентов для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma*.

На наличие контаминации *Mycoplasma* spp. в наших опытах были испытаны клетки почек обезьян, кролика, трансформированные клетки человека, полученные из различных коллекций страны и зарубежья, и использующихся при контроле качества биологических препаратов.

ДНК выделяли при помощи Комплекта реагентов для выделения ДНК/РНК «Рибо-преп» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. В первом варианте амплификацию осуществляли с использованием Набора реагентов для амплификации «GenPak PCR Core» производства компании ООО «Isogene», Россия, во втором варианте — с использованием набора реагентов «АмплиСенс МИК-КОМ», предназначенного для выявления ДНК микроорганизмов рода *Mycoplasma* в материалах от больной и павшей птицы, эмбрионах, а также культурах клеток и сыворотках крови животных (чувствительность $5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

В обоих вариантах детекцию результатов амплификации проводили методом электрофореза в агарозном геле. Амплификацию проводили на приборе с активным регулированием «Терцик» производства ЗАО «ДНК-Технология», Россия по соответствующей программе.

При проведении анализа 9 клеточных линий двумя вариантами методики с универсальными праймерами получены одинаковые результаты: показано отсутствие микроорганизмов рода *Mycoplasma* в образцах 6 линий клеток; в образцах трех клеточных линий: Vero₁, MA104, и RK-13 (образцы 1, 3 и 9) выявлена ДНК *Mycoplasma* spp. (рис. 4).

Наличие микоплазм в этих культурах было подтверждено также прямым посевом на питательные среды и цитохимическим методом в индикаторной культуре. Таким образом, показана возможность использования для выявления ДНК микоплазм в культуре клеток двух выше описанных вариантов методики ПЦР. Однако следует иметь в виду, что метод ПЦР обладает ограниченной чувствительностью и может быть использован только как дополнительный к «золотому стандарту» — культуральным методом. Замена культурального метода методом ПЦР может быть проведена только на основании его не меньшей чувствительности, однако методом ПЦР можно определить от 5 КОЕ/мл, при этом чувствительность метода зависит от вида определяемых микоплазм [39–43] и от условий для ПЦР анализа.

Если испытанию на микоплазмы подвергается объединенный вирусный сбор вакцин, нерасфасованная партия вакцины или готовый препарат, то обязательным является метод культивирования в искусственных питательных средах. Для контроля питательных сред и сывороток, используемых для поддержания роста клеточных культур, XIII Государственная фармакопея РФ [44] и 8,0 Европейская фармакопея [34] рекомендуют использовать метод индикаторной клеточной культуры.

Заключение

В обзоре обобщены материалы исследований отечественных и зарубежных авторов, материалы ВОЗ и Европейской фармакопеи. Особое внимание уделено необходимости постоянного контроля клеточных культур и вакцинных препаратов, использование комплекса методов для повышения достоверности полученных результатов. Показано преимущество разработанных в нашей стране питательных сред для выявления микоплазм в рутинной работе при контроле препаратов. Постоянное исследование клеточных линий — субстратов производства на присутствие микоплазм необходимо для функционирования системы контроля качества, обеспечения эффективности и безопасности ИЛП, а также для аттестации и поддержания клеточных линий, используемых при производстве и контроле ИЛП.

Анализ материалов по разработке и внедрению отечественных вирусных вакцин, позволяет сделать вывод, что применяемые методы контроля микоплазм в значительной степени гармонизированы с международными. Применение прямого посева в питательные среды образцов ИЛП, а также окрашивание ДНК флуорохромами используемых клеточных линий, продолжает оставаться «золотым стандартом» для обнаружения микоплазменной контаминации. В дополнение к этим методам может быть использована ПЦР. Использование молекулярно-биологических методов взамен культуральных требует доказательства их не меньшей чувствительности. При проведении исследований на присутствие микоплазм в клеточных культурах в случае получения сомнительных результатов следует последовательно использовать все три метода (микробиологический, окрашивание клеток флуорохромами, ПЦР).

Литература

1. Annex 2. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (oral, live, attenuated). Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, № 904, and Addendum to Annex 1 of WHO Technical Report Series, № 910. In:

- WHO Expert Committee on Biological Standardization, WHO Technical Report Series, № 980 (63 report). WHO; 2014.
2. Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2, 3 типов, рас-твор для приема внутрь (ФС. 3.3.1.0037.15). Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 3. С. 1110–25. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3/HTML/#1110/z.
 3. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, 2013. WHO Technical Report Series, № 978, 79–187.
 4. Вакцина против краснухи культуральная живая (ФС. 3.3.1.0024.15). Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 3. С. 964–72. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3/HTML/#1110/z.
 5. Степанова ЛГ, Алексеев СБ, Згурский АА, Шалунова НВ. и др. Получение и характеристика нового штамма диплоидных клеток из эмбриональной ткани легкого человека. Цитология 1986; **28**(12): 1373–6.
 6. Hayflick L. A brief history of cell substrates used for the preparation of human biologicals. *Developmental Biology* 2001, **106**: 5–23.
 7. Polio vaccines: WHO position paper. March, 2016. *Weekly Epidemiol Rec.* 2016; **91**(12): 145–68.
 8. Шалунова НВ, Меркулов ВА, Комратов АВ, Петручук ЕМ, Семенова ИС, Волгин АР, Трусов ГА. Требования к клеточным культурам, используемым для производства и контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2013; (1): 28–32.
 9. Колокольцова ТД, Сабурова ИИ, Кубатиев АА. Культуры клеток человека и животных: выделение, культивирование, криоконсервация и контроль. *Патогенез* 2015; **13**(2): 50–65.
 10. Carrier T, Donahue-Hjelle L, Strama MJ. Banking Parental Cells According to CGMP Guidelines. A Practical Approach to Developing Stable Cell Lines. *BioProcess International* December 2009: 20–25. Available from: http://www.thermofisher.com/content/dam/Life-Tech/global/applied-sciences/pdfs/Bioproduction/BPI_banking-parental-cells.pdf
 11. Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2009; **8**(12): 1681–92.
 12. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; **8**(5): 607–18.
 13. Бархалева ОА, Ладьяженская ИП, Воробьева МС, Шалунова НВ, Подчерняева ДЯ, Михайлова ГР, Хорошева ТВ, Баринский ИФ. «Витагерлавак» — первая отечественная вакцина на перерабатываемой линии клеток Vero (B). *Вопросы вирусологии* 2009; (5): 33–7.
 14. Barile MF, Rottem S. Mycoplasmas in cell culture. In: Kahane I. and Adoni A. (eds). *Rapid diagnosis of mycoplasmas*. New York: Plenum Press; 1993. P. 155–193.
 15. Requirements for continuous cell lines used for biologicals production. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-sixth report. Geneva: World Health Organization; 1987 (WHO Technical Report Series, № 745), Annex 3. Viral safety evaluation of biotechnology products.
 16. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh report. Geneva: World Health Organization; 1998 (WHO Technical Report Series, № 878). Annex 1. Viral safety evaluation of biotechnology products.
 17. Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. 2010.
 18. Градобоев ВН, Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Лебединская ЕВ, Черникова НК, Тиманькова ГД. Разработка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Ласса. *Вопросы вирусологии* 1997; **42**(4): 168–71.
 19. Краснянский ВП, Потрываева НВ, Борисевич ИВ, Градобоев ВН, Пашанина ТП, Пшеничных ВА. Опыт получения инактивированной вакцины лихорадки Ласса. *Вопросы вирусологии* 1993; (6): 276–9.
 20. Фирсова ИВ, Шатохина ИВ, Борисевич ИВ, Евсеев АА, Максимов ВА, Пантюхов ВБ, Хмелев АЛ. Использование морских свинок для оценки эффективности вакцин против лихорадки Ласса. *Вопросы вирусологии* 2003; **48**(6): 43–5.
 21. Борисевич ИВ, Потрываева НВ, Мельников СА, Евсеев АА, Краснянский ВП, Максимов ВА. Получение иммуноглобулина к вирусу Марбург на основе сыворотки крови лошадей. *Вопросы вирусологии* 2008; **53**(1): 39–41.
 22. Razin S, Hayflick L. Time-line of significant contributions to mycoplasmaology. *Biologicals* 2010; **38**: 191–2.
 23. Hayflick L, Stinebring WR. Intracellular growth of pleuropneumonia-like organisms ANATOMICAL RECORD. 1955; **121**(2): 477–8.
 24. Robinson LB, Wichelhausen RH, Roisman B. Contamination of cell cultures by pneumonia-like organisms. *Science* 1956; **124**: 1147–8.
 25. Drexler HG, Uphoff CC. Contamination of cell cultures Mycoplasma. *The Encyclopedia of Cell Technology*. New York: Wiley; 2000. P. 609–27.
 26. Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. *Cell J.* 2012; **13**(4): 203–212.
 27. Ryan J, Mariano J. What are Mycoplasmas? Available from: <http://www.bionique.com/files/whataremycoplasma.pdf>.
 28. Drexler HG, Uphoff CC. Contamination of cell cultures Mycoplasma. *The Encyclopedia of Cell Technology*. New York: Wiley; 2000. P. 609–27.
 29. Дьяконов ЛП, ред. *Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии)*. М.; 2009.
 30. Шалунова НВ, Петручук ЕМ, Корнилова ОГ. и др. Аттестация перерабатываемых клеточных культур. Методические рекомендации. М.: ФГБУ «ГИСК им Л. А. Тарасевича» Минздравсоцразвития России; 2011.
 31. Приказ Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств».
 32. Исследование ИПП на присутствие микоплазм. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты)*. Ч. 2. М; 2012. С. 118–20.
 33. Михайлова ГР, Хижнякова ТМ, Подчерняева РЯ. Использование антибиотиков для деконтаминации клеточных культур от микоплазм. *Ветеринарная патология* 2005; (1): 48–51.
 34. 2015.2.6.7. Mycoplasmas. P. 178–83. *European Pharmacopoeia 8.0*. Strasbourg: Council of Europe; 2015.
 35. Бердникова ЗЕ. Разработка и стандартизация методов выявления микоплазм — контаминантов медицинских биологических препаратов: дис. ... канд. биол. наук. М.; 1991.
 36. Кулешов КВ, Гальбек ТВ. Методические наставления по идентификации и видовой дифференциации микроорганизмов рода Mycoplasma в клеточных линиях методом полимеразной цепной реакции. М.; 2012.
 37. Урываев ЛВ, Ионова КС, Дедова АВ и др. Анализ контаминации клеточных культур пестivirusом BVDV и микоплазмами. *Вопросы вирусологии* 2012; **57**(5): 15–21.
 38. Kazemiha VM, Shokgroser AV, Frabestani MR, et al. PCR-based detection and eradication of mycoplasma infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology* 2009; **61**(3): 117–24.
 39. Shahhosseiny MH, Hosseiny Z, Khoramkhorshid HR, Azari S, Shokrgozar MA. Rapid and sensitive detection of Mollicutes in cell culture by polymerase chain reaction. *J Basic Microbiol.* 2010; **50**(2): 171–8.
 40. Kazemiha VM, Amanzadeh A, Memarnejadian A, Azari S, Shokrgozar MA, Mahdian R, Bonakdar S. Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran. *Cytotechnology* 2014; **66**(5): 861–73.
 41. David Fiorentini. Available from: http://www.bioind.com/page_14199.
 42. Uphoff CC, Drexler HG. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol.* 2014; **106**: 28.4.1–28.4.14.
 43. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes.* 2011; **25**(2–3): 69–77.
 44. Испытание на присутствие микоплазм (ОФС 1.7.2.0031.15). Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 2. С. 827–835. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#827/z.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Шалунова Нина Васильевна. Главный эксперт управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, д-р мед. наук, проф.

Волкова Рауза Асхатовна. Начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП, д-р биол. наук.

Волгин Андрей Рудольфович. Заместитель директора Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. мед. наук.

Петручук Елена Мидатовна. Эксперт 1-й категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Бердникова Зинаида Евтропьевна. Ведущий эксперт лаборатории бактериологических питательных сред и культур клеток Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Эльберт Елизавета Викторовна. Ведущий эксперт лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний, канд. биол. наук.

Шевцов Владимир Александрович. Начальник управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. мед. наук.

Рукавишников Андрей Владимирович. Заместитель начальника управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП, канд. биол. наук.

Семенова Ирина Семеновна. Эксперт 1-й категории лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества ЛС.

Меркулова Ольга Владимировна. Ведущий научный сотрудник лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества ЛС, канд. мед. наук.

Трусов Георгий Александрович. Научный сотрудник лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества ЛС.

Терешкина Наталья Васильевна. Эксперт 1-й категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Рачинская Ольга Анатольевна. Эксперт 2-й категории лаборатории нанолечарств, препаратов для клеточной и генотерапии Испытательного центра экспертизы качества ЛС.

Индикова Ирина Николаевна. Ведущий эксперт управления экспертизы противовирусных МИБП Центра экспертизы и контроля МИБП.

Лебединская Елена Владимировна. Ведущий научный сотрудник отдела редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации НИР, канд. биол. наук.

Мыца Елена Дмитриевна. Эксперт 2-й категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП.

Адрес для переписки: Шалунова Нина Васильевна; Shalunova@expmed.ru

Mycoplasma — contamination of cell cultures

N. V. Shalunova, R. A. Volkova, A. R. Volgin, E. M. Petrushuk, Z. E. Berdnikova, E. V. Elbert, V. A. Shevtsov, A. V. Rukavishnikov, I. S. Semenova, O. V. Merkulova, G. A. Trusov, N. V. Tereshkina, O. A. Rachinskaj, I. N. Indikova, E. V. Lebedinskaya, E. D. Mytsa

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The safety of biological products derived from animal cells is associated with the properties of the cells themselves or their components, as well as with the possible presence of contaminants of microbial and viral origin. The suitability of cell substrate for production of prophylactic preparations is often determined by the features of the production process, which allows to benefit/risk ratio of the product. One of the common contaminants of cell substrates are mycoplasmas, type Mollicutes. As distinguished from other microorganisms they don't have cell membranes, and parasitize a wide range of animals and plants, on the surface or inside the cells. Some mycoplasma species of are potentially pathogenic to humans, they compete for nutrients with cells *in vitro*, cause chromosomal aberrations, interfere with normal cell metabolism. The detection of mycoplasma contamination in cell substrates when manufacturing prophylactic preparations is required by regulatory documents.

Key words: cell cultures; primary cells; diploid cell lines; finite cell lines; contaminants; mycoplasmas; culture media; methods for detecting mycoplasmas; fluorescence polymerase chain reaction (PCR).

For citation: Shalunova NV, Volkova RA, Volgin AR, Petrushuk EM, Berdnikova Z. E, Elbert EV, Shevtsov VA, Rukavishnikov AV, Semenova IS, Merkulova OV, Trusov GA, Tereshkina NV, Rachinskaj OA, Indikova IN, Lebedinskaya EV, Mytsa ED. Mycoplasma contamination of cell cultures. *BIOpreparations. Preventions, Diagnostics, Treatment* 2016; 16 (3): 151–160.

References

1. Annex 2. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of poliomyelitis vaccines (oral, live, attenuated). Replacement of Annex 1 of WHO Technical Report Series, № 904, and Addendum to Annex 1 of WHO Technical Report Series, № 910. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization, WHO Technical Report Series, № 980 (63 report). WHO; 2014.
2. Oral Polio Vaccine 1, 2, 3 types of oral solution (FS. 3.3.1.0037.15). The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 3. P. 1110–25. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3/HTML/#1110/z (in Russian).
3. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, 2013. WHO Technical Report Series, № 978, 79–187.

4. Rubella vaccine culture alive (FS. 3.3.1.0024.15). The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 3. P. 964–72. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3/HTML/#1110/z (in Russian).
5. Stepanova LG, Alekseev SB, Zgursky AA, Shalunova NV, et al. Isolation and characterization of a new strain of diploid cells from human fetal lung tissue. *Tsitologiya* 1986; **28**(12): 1373–6 (in Russian).
6. Hayflick L. A brief history of cell substrates used for the preparation of human biologicals. *Developmental Biology* 2001; **106**: 5–23.
7. Polio vaccines: WHO position paper. March, 2016. *Weekly Epidemiol Rec.* 2016; **91**(12): 145–68.
8. Shalunova NV, Merkulov VA, Comratov AV, Petruchuk EM, Semenova IS, Volgin AR, Trusov GA. Requirements for cell cultures, used for manufacture and quality control of immunobiological medicines. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* 2013; (1): 28–32 (in Russian).
9. Kolokoltsova TD, Saburina IN, Kubatiev AA. Cultures of human and animal cells: isolation, culturing, cryopreservation and control. *Patogenez* 2015; **13**(2): 50–65 (in Russian).
10. Carrier T, Donahue-Hjelle L, Strama MJ. Banking Parental Cells According to CGMP Guidelines. A Practical Approach to Developing Stable Cell Lines. *BioProcess International* December 2009: 20–25. Available from: http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/applied-sciences/pdfs/Bioproduction/BPI_banking-parental-cells.pdf
11. Genzel Y, Reichl U. Continuous cell lines as a production system for influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2009; **8**(12): 1681–92.
12. Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; **8**(5): 607–18.
13. Barhaleva OA, Ladyzhenskaya IP, Vorobieva MS, Shalunova NV, Podchernyaeva DYa, Mikhailova GR, Horosheva TV, Barinsky IF. «Vitagerpavak» — first domestic vaccine on a continuous Vero cell line (B). *Voprosy virusologii* 2009; (5): 33–7 (in Russian).
14. Barile MF, Rottem S. Mycoplasmas in cell culture. In: Kahane I. and Adoni A. (eds). *Rapid diagnosis of mycoplasmas*. New York: Plenum Press; 1993. P. 155–193.
15. Requirements for continuous cell lines used for biologicals production. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-sixth report. Geneva: World Health Organization; 1987 (WHO Technical Report Series, № 745), Annex 3. Viral safety evaluation of biotechnology products.
16. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. In: WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-seventh report. Geneva: World Health Organization; 1998 (WHO Technical Report Series, № 878). Annex 1. Viral safety evaluation of biotechnology products.
17. Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. 2010.
18. Gradoboev VN, Borisevich IV, Potryvaeva NV, Lebedinskaya EV, Chernikova NK, Timankova GD. Development and study of the properties of the immunoglobulin against Lassa fever. *Voprosy virusologii* 1997; **42**(4): 168–71 (in Russian).
19. Krasnyansky VP, Potryvaeva NV, Borisevich IV, Gradoboev VN, Pashanina TP, Pshenichnov VA. Experience of producing inactivated vaccines against Lassa fever. *Voprosy virusologii* 1993; (6): 276–9 (in Russian).
20. Firsova IV, Shatohina IV, Borisevich IV, Evseev AA, Maksimov VA, Pantyuhov VB, Hmelev AL. The use of guinea pigs to evaluate the efficacy of vaccines against Lassa fever. *Voprosy virusologii* 2003; **48**(6): 43–5 (in Russian).
21. Borisevich IV, Potryvaeva NV, Melnikov SA, Evseev AA, Krasnyansky VP, Maksimov VA. Getting immunoglobulin Marburg virus through blood serum of horses. *Voprosy virusologii* 2008; **53**(1): 39–41 (in Russian).
22. Razin S, Hayflick L. Time-line of significant contributions to mycoplasma. *Biologicals* 2010; **38**: 191–2.
23. Hayflick L, Stinebring WR. Intracellular growth of pleuropneumonia-like organisms ANATOMICAL RECORD. 1955; **121**(2): 477–8.
24. Robinson LB, Wichelhausen RH, Roisman B. Contamination of cell cultures by pneumonia-like organisms. *Science* 1956; **124**: 1147–8.
25. Drexler HG, Uphoff CC. Contamination of cell cultures Mycoplasma. *The Encyclopedia of Cell Technology*. New York: Wiley; 2000. P. 609–27.
26. Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. *Cell J.* 2012; **13**(4): 203–212.
27. Ryan J, Mariano J. What are Mycoplasmas? Available from: <http://www.bionique.com/files/whataremycoplasma.pdf>.
28. Drexler HG, Uphoff CC. Contamination of cell cultures Mycoplasma. *The Encyclopedia of Cell Technology*. New York: Wiley; 2000. P. 609–27.
29. Diakonov LP, ed. *Animal cells in culture (method and application in biotechnology)*. Moscow; 2009 (in Russian).
30. Shalunova NV, Petruchuk EM, Kornilova OG, et al. Evaluation of continuous cell cultures. Guideline. Moscow: Federal State Budgetary Institution «Tarasevich State Research Institute of Standardization and Control of Biological Medicines» of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation; 2011 (in Russian).
31. Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation on June 14, 2013 № 916 «On Approval of Rules of the organization of production and quality control of medicines» (in Russian).
32. Research of immunobiological drugs for the presence of mycoplasma. In: *Guidelines for preclinical studies of drugs (immunobiological drugs)*. Part 2. Moscow; 2012. P. 118–20.
33. Mikhailova GR, Hizhnyakova TM, Podchernyaeva RYa. The use of antibiotics for the decontamination of cell cultures from mycoplasma. *Veterinarnaya patologiya* 2005; (1): 48–51 (in Russian).
34. 2015.2.6.7. Mycoplasmas. P. 178–83. *European Pharmacopoeia 8.0*. Strasbourg: Council of Europe; 2015.
35. Berdnikova ZE. Development and standardization of methods for detection of mycoplasma — contaminants medical biologicals. *Cand. Biol. Sci [thesis]*. Moscow; 1991 (in Russian).
36. Kuleshov KV, Galnbek TV. Methodical instructions on the identification and differentiation of specific microorganisms of the genus Mycoplasma in cell lines by polymerase chain reaction. Moscow; 2012 (in Russian).
37. Uryvaev LV, Ionova KS, Dedova AV, et al. Analysis of contamination of cell cultures pestivirus BVDV and mycoplasma. *Voprosy virusologii* 2012; **57**(5): 15–21 (in Russian).
38. Kazemiha VM, Shokgroser AV, Frabestani MR, et al. PCR-based detection and eradication of mycoplasma infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology* 2009; **61**(3): 117–24.
39. Shahhosseiny MH, Hosseiny Z, Khoramkhorshid HR, Azari S, Shokrgozar MA. Rapid and sensitive detection of Mollicutes in cell culture by polymerase chain reaction. *J Basic Microbiol.* 2010; **50**(2): 171–8.
40. Kazemiha VM, Amanzadeh A, Memarnejadian A, Azari S, Shokrgozar MA, Mahdian R, Bonakdar S. Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran. *Cytotechnology* 2014; **66**(5): 861–73.
41. David Fiorentini. Available from: http://www.bioind.com/page_14199.
42. Uphoff CC, Drexler HG. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Curr Protoc Mol Biol.* 2014; **106**: 28.4.1–28.4.14.
43. Volokhov DV, Graham LJ, Brorson KA, Chizhikov VE. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol Cell Probes.* 2011; **25**(2–3): 69–77.
44. Testing for the presence of mycoplasma (OFS 1.7.2.0031.15). The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. P. 827–835. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#827/z.

Authors

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Shalunova NV. Chief expert of Office for expertise of antiviral medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Doctor of Medical Sciences, professor.

Volkova RA. Head of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations. Doctor of Biological Sciences.

Volgin AR. Deputy director of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Petruchuk EM. 1st professional category expert of Laboratory of viral vaccines of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Berdnikova ZE. Leading expert of Laboratory of bacteriological culture media and cell cultures of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Elbert EV. Leading expert of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods. Candidate of Biological Sciences.

Shevtsov VA. Head of Office of expertise of antiviral medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Candidate of Medical Sciences.

Rukavishnikov AV. Deputy head of Office of expertise of antiviral medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Semenova IS. 1st professional category expert of Laboratory of nanomedicines, cell therapy and gene therapy products of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality.

Merkulova OV. Leading researcher of the Laboratory of nanomedicines, cell therapy and gene therapy products of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality. Candidate of Medical Sciences.

Trusov GA. Researcher of Laboratory of nanomedicines, cell therapy and gene therapy products of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality.

Tereshkina NV. 1st professional category expert of Laboratory of viral vaccines of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations.

Rachinskaya OA. 2nd professional category expert of Laboratory of nanomedicines, cell therapy and gene therapy products of Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality.

Indikova IN. Leading expert of Office for expertise of antiviral medical immunobiological preparations of Center for examination and control of medical immunobiological preparations. Candidate of Biological Sciences.

Lebedinskaya EV. Leading researcher of Department of publishing activity and intellectual property protection of Center of planning and coordination of scientific research. Candidate of Biological Sciences.

Mytsa ED. 2nd professional category expert of the Laboratory of molecular biology and genetic testing methods of Test Center for Quality Expertise of medical immunobiological preparations.