

6. Савлевич Е.Л., Жарких М.А., Козлов В.С. и др. Неоднозначность диагностической ценности некоторых методов лабораторной диагностики при хроническом тонзиллите. Медицинский совет. 2016,9:54-57.
7. Сагандыкова Н.С. Особенности микрофлоры небных миндалин при хроническом воспалении. Вестник КазНМУ. 2015,2:105-107.
8. Феклисова Л.В, Мескина Е.Р, Галкина Л.А. и др. Современные подходы к коррекции микробиоценоза ротоглотки. Лечащий врач. 2009,10:71-74.
9. Bista M., Amatya R.C., Basnet P. Tonsillar microbial flora: a comparison of infected and non-infected tonsils. Kathmandu Univ. Med. J. 2006,4(1):18-21.
10. Brook I., Foote J. Comparison of the microbiology of recurrent tonsillitis between children and adults. Laryngoscope. 1986,96(12):1385-1388.
11. Develioglu O.N., Ipek H.D., Bahar H. et al. Bacteriological evaluation of tonsillar microbial flora according to age and tonsillar size in recurrent tonsillitis. Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 2014,271(6):1661-1665.
12. Kuhn J.J., Brook I., Waters C.L. et al. Quantitative bacteriology of tonsils removed from children with tonsillitis hypertrophy and recurrent tonsillitis with and without hypertrophy. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 1995,104(8):646-652.
13. Van Staaij B.K., Van Den Akker E.H., De Haas Van Dorsser E.H. et al. Does the tonsillar surface flora differ in children with and without tonsillar disease? Acta Otolaryngol. 2003, 123(7): 873-878.
14. Stjernquist-Desatnik A., Holst E. Tonsillar microbial flora: comparison of recurrent tonsillitis and normal tonsils. Acta Otolaryngol. 1999,119(1):102-106.
15. Swidsinski A., Durffel Y., Loening-Baucke V. et al. Biomorphology of the bacterial invasion in chronic pharyngotonsillitis. Laryngorhinootologie. 2008,87(11):776-782.
16. Windfuhr J.P. Indications for tonsillectomy stratified by the level of evidence. GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. Head. Neck. Surg. 2016,15:Doc09.doi: 10.3205/cto000136. eCollection 2016. Review. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5169082/>.

Поступила 28.02.18

Контактная информация: Савлевич Елена Леонидовна, к.м.н.,
121359, Москва, ул. Маршала Тимошенко, 21

ЗАМЕТКА ИЗ ПРАКТИКИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.Б.Файзулов, Е.Р.Корчевая, Д.В.Марков, О.А.Петруша, В.В.Зверев

ПРОБЛЕМА КОНТАМИНАЦИИ КУЛЬТУР КЛЕТОК ОРТОРЕОВИРУСАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Обязательным требованием к культурам клеток, используемым в научных исследованиях и биотехнологическом производстве, является отсутствие их контаминации вирусами. Нами описан случай незапланированного выделения в культуре клеток почки эмбриона макаки-резуса МА-104 ортореовируса млекопитающих. ПЦР-анализ на наличие реовирусной РНК всех вероятных источников реовируса (трипсин, эмбриональная сыворотка коров, клинические образцы, культура клеток) не выявил вирусной РНК ни в одном из образцов. Важным условием активации репродукции реовируса в культуре клеток МА-104 являлось наличие в культуральной среде трипсина. Полученные результаты подчеркивают актуальность контроля на наличие контаминации реовирусами реактивов животного происхождения и клеточных культур. Поскольку реовирусы ассоциированы

с заболеваниями человека, такой контроль на фармацевтическом производстве представляется обязательным.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 104—107

Ключевые слова: культура животных клеток, вирусная контаминация, орторевовирус млекопитающих, трипсин

E.B.Faisuloev, E.P.Korchevaya, D.V.Markov, O.A.Petrusha, V.V.Zverev

THE PROBLEM OF CELL CULTURES CONTAMINATION WITH MAMMALIAN ORTHOREOVIRUSES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

A mandatory requirement for cell cultures used in scientific researches and biomanufacturing is the absence of their contamination by viruses. We have described the case of adventitious isolation of mammalian orthoreovirus in the rhesus macaque embryo kidney cells MA-104. PCR analysis for the presence of reovirus RNA of all probable sources of reovirus (trypsin, fetal bovine serum, clinical samples, cell culture) revealed no viral RNA in any of the samples. An important condition for the activation of the reovirus reproduction in the MA-104 cells was the presence of trypsin in the culture medium. The obtained results underscore the urgency of control for the reovirus contamination of chemicals of animal origin and cell cultures. Since reoviruses are associated with human diseases, such control in pharmaceutical production is mandatory.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 5, P. 104—107

Key words: animal cell culture, viral contamination, mammalian orthoreovirus, trypsin

Культуры животных клеток широко применяются в научных исследованиях, эпидемиологическом мониторинге, лабораторной диагностике вирусных инфекций и в фармацевтической промышленности для наработки биологически активных веществ и вирусов. Важным требованием, предъявляемым к культурам клеток, является отсутствие их контаминации вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами [2, 5]. В лабораторной и производственной практике наиболее вероятными источниками контаминации вирусами являются эмбриональная сыворотка коров (ЭСК) и трипсин, получаемый из поджелудочной железы свиней. Также не исключена реактивация вируса из самой клеточной линии при возникновении перmissive для вируса условий. В большинстве случаев контаминантами клеточных культур являются вирусы зоонозного происхождения, не патогенные для человека [2, 5].

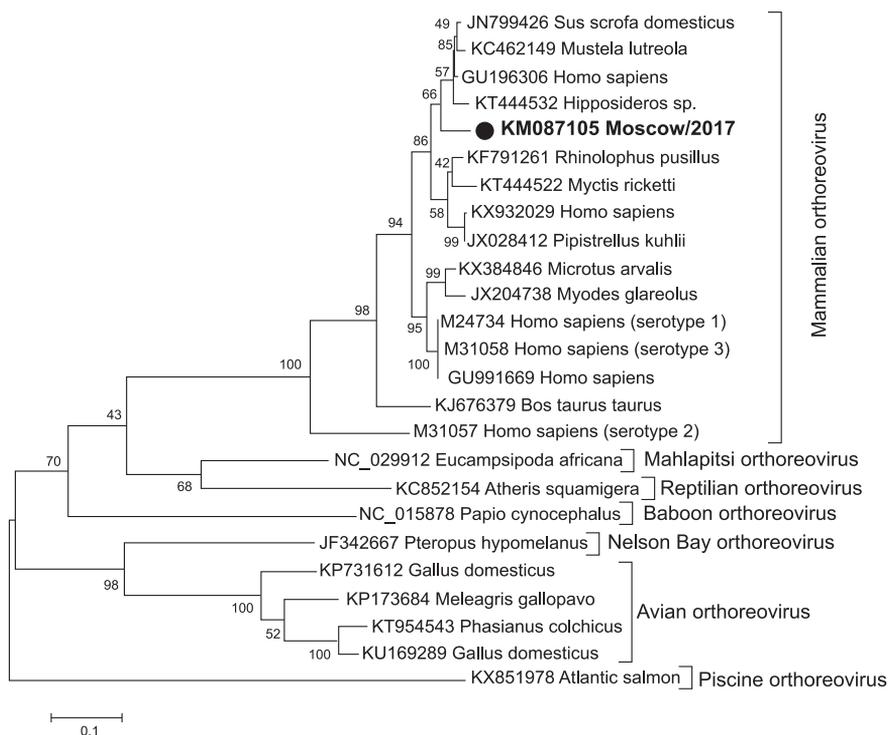
Поводом для написания данной статьи послужил случай незапланированного выделения в культуре клеток почки эмбриона макаки-резуса (МА-104) орторевовируса млекопитающих (далее — реовируса). С целью изоляции ротавирусов человека группы А клетки МА-104 инокулировали фекальными экстрактами от 12 детей с подтвержденной ротавирусной инфекцией и проводили слепые пассажи в поддерживающей среде ДМЕМ с трипсином. Для контроля условий культивирования ротавирусов использовали лабораторные штаммы ротавирусов группы А человека Wa, DS-1 и W161, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Лабораторные штаммы ротавирусов вызывали в культуре клеток выраженное цитопатогенное действие (ЦПД), а его специфичность подтверждалась в ПЦР-РВ с ротавирусспецифичными праймерами. Из числа 12 исследуемых клинических образцов на уровне 5-9 пассажей пять образцов вызвали выраженное ЦПД. Поскольку в процессе пассирования вируса концентрация ротавирусной РНК в образцах снизилась на несколько порядков (в ряде случаев до предела чувствительности ПЦР), был сделан вывод, что причиной ЦПД была репродукция не ротавируса, а какого-то другого вируса. Экстракция вирусного материала хлороформом не снижала способность выделенного вируса вызывать в культуре клеток ЦПД, что свидетельствовало об отсутствии у вируса липидной оболочки. В опыте по пассированию вируса в от-

сутствие трипсина после второго пассажа все образцы вирусов перестали вызывать ЦПД, что свидетельствует о зависимости репродукции вируса от наличия в питательной среде трипсина. Проведенный гель-электрофорез геномной РНК вируса (ПААГ по Laemmly) выявил 10 генных сегментов, которые распределились по схеме 3:3:4, что соответствует электрофоретипу генома реовирусов. Для сравнения, геном ротавирусов состоит из 11 генных сегментов, которые распределяются в ПААГ по схеме 4:2:3:2. ПЦР-анализ с праймерами к ортореовирусу млекопитающих подтвердил наличие в исследуемых образцах реовирусной РНК в высокой концентрации.

С целью видовой идентификации реовируса методом ПЦР был получен фрагмент генного сегмента L1, кодирующего РНК-полимеразу (координаты 3100-3854 для GenBank №KM087105) и определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена размером 656 п.н. (депонирована в GenBank, № MN170361). По месту выделения штамм вируса назван Moscow. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей всех 5 исследуемых изолятов вирусов выявило их 100% гомологию. Таким образом, реовирус-контаминант представлен одним штаммом, что позволяет предположить его попадание в культуру клеток из одного источника — ЭСК или трипсина, но не из клинических образцов. Также нельзя исключать присутствия реовируса в самой культуре клеток MA-104, в которой он мог латентно персистировать и активироваться при проведении пассажей в присутствии трипсина. Однако ПЦР-анализ ЭСК, трипсина, клеток MA-104, ротавирусосодержащих клинических образцов, использованных для инокуляции клеток, не выявил наличия в них реовирусной РНК. Вероятно, концентрация вируса-контаминанта в источнике заражения была ниже предела чувствительности ПЦР. BLAST-анализ частичной последовательности гена РНК-полимеразы показал до 94% нуклеотидной и до 99,5% аминокислотной идентичности с наиболее близкими штаммами ортореовирусов млекопитающих, выделенными от свиньи, человека, норки и рукокрылых (GenBank № JN799426, GU196306, KC462149, DQ997719, KT444552). Проведённый в программе MEGA5 филогенетический анализ позволил с высокой надёжностью отнести выделенный вирус к семейству Reoviridae, подсемейству Spinareovirinae, роду Reovirus, виду Mammalian orthoreovirus. Анализ проводили в программе Mega5, используя метод максимального правдоподобия и 2-параметрическую эволюционную модель Kimura. Надёжность внутренних узлов дерева оценивали с помощью «бутстреп»-анализа путем построения 500 альтернативных деревьев. В качестве референсных использовали штаммы разных представителей рода Reovirus. В описании штаммов реовирусов указан идентификационный номер последовательности в GenBank и вид животного-хозяина, от которого выделен вирус. Квадратными скобками выделены группы вирусов, относящиеся к одному виду рода Reovirus. Черным кружком отмечен исследуемый штамм реовируса. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 нуклеотидов (см. рис.).

Описанный нами случай неожиданного выделения в культуре клеток реовирусов не является единичным. Так, в работе Колпакова С.А. [1] культуру перевиваемых клеток эмбриона свиньи (СПЭВ) заражали фекальными экстрактами от детей с ротавирусной инфекцией. После проведения четырех слепых пассажей в присутствии трипсина все образцы начали вызывать ЦПД, выражавшееся в полной деструкции монослоя клеток. На уровне 10-16 пассажа урожай вируса достигал $1 \cdot 10^9$ — $6 \cdot 10^9$ вирионов в 1 мл культуральной жидкости. Размер и морфология вирионов, а также зависимость вируса от трипсина соответствовали свойствам ротавирусов, однако электрофоретическая подвижность генных сегментов оказалась характерной для реовирусов — 10 генных сегментов, которые распределялись в ПААГ по схеме 3:3:4. Важно отметить, что в реакции непрямого гемагглютинации на ротавирусы группы А ни один из адаптированных штаммов вируса не дал положительного результата. К сожалению, идентификацию вируса методом ПЦР или секвенирования авторы не проводили.

Культуры клеток животных обладают разной чувствительностью к реовирусам. При заражении перmissive культур клеток реовирусами, таких как линия мышечных фибробластов L929, на начальном этапе проникновения в клетку вирус попадает в эндосому или лизосому, где вирусные поверхностные белки $\sigma 3$ и $\mu 1$ подвергаются



Филогенетический анализ частичной последовательности генного сегмента L1 с целью установления таксономической принадлежности вируса.

расщеплению эндогенной протеазой катепсин L с образованием инфекционных субвирионных частиц, способных проникать в цитоплазму клетки [4]. При заражении некоторых непермиссивных культур клеток (в том числе МА-104) для активации реовируса требуется обработка вируса экзогенной протеазой, например, трипсином.

Орторевовирусы млекопитающих представлены четырьмя типами, способны заражать людей и отличаются высокой устойчивостью к физико-химическим воздействиям [3, 10]. Реовирусы эффективно выделяются из клинических образцов в различных клеточных культурах, включая клетки почек обезьян [3]. Реовирусы встречаются повсеместно, а штаммы, серологические идентичные реовирусам человека, были выделены у самых разных животных, включая мышей, шимпанзе, собак, кошек, крупный рогатый скот, овец, свиней, лошадей и обезьян [3]. Описаны высоковирулентные для млекопитающих, в том числе домашних свиней, штаммы реовирусов [6, 10]. Реовирусная инфекция часто встречается у людей, но в большинстве случаев протекает в субклинической форме. Вирус часто обнаруживается в фекалиях, носовых или носоглоточных секретах, моче, крови, спинномозговой жидкости и в различных органах при вскрытии. Название **reovirus** представляет собой акроним, предложенный Sabin A.V. [8] (**r** — respiratory, **e** — enteric, **o** — orphan), то есть вирус, который обнаруживается в респираторном тракте и кишечнике, но при этом называется «сиротским», так как не связан с конкретным заболеванием. Реовирусная инфекция наблюдалась у пациентов с различными состояниями, такими как лихорадка, экзантема, болезни верхних и нижних дыхательных путей, кишечные заболевания, гепатит, кератоконъюнктивит, менингит, энцефалит и другие [3, 7, 9]. Однако этиологическая роль реовирусов в возникновении этих заболеваний остается неясной, поскольку убедительные доказательства вовлеченности вируса в патогенез заболеваний отсутствуют.

Полученные результаты подчеркивают актуальность контроля на наличие контаминации реовирусами не только реактивов животного происхождения, применяемых при выращивании культур клеток, но и самих клеточных культур. Поскольку реовирусы

ассоциированы с заболеваниями человека, такой контроль в фармацевтическом производстве представляется обязательным. Условием повышенного риска активации реовирусной репродукции в клетках является их культивирование в среде с трипсином.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колпаков С.А., Колпакова Е.П. Новая группа ротавирусов человека семейства Reoviridae. Электронное периодическое издание ЮФУ «Живые и биокосные системы». 2014, 10.
2. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 89.
3. Dermody T.S. et al. Chapter 44. Orthoreoviruses. *In: Fields Virology*. David M. Knipe, Peter M. Howley. (ed.). 2013.
4. Golden J.W., Linke J., Schmechel S. et al. Addition of exogenous protease facilitates reovirus infection in many restrictive cells. *J. Virol.* 2002, 76(15): 7430-7443.
5. Hawkes P.W. Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour. Bioprocess.* 2015, 2: 34.
6. Lelli D., Beato M.S., Cavicchio L. et al. First identification of mammalian orthoreovirus type 3 in diarrheic pigs in Europe. *Virol. J.* 2016, 13: 139.
7. Ouattara L.A., Barin F., Barthez M.A. et al. Novel human reovirus isolated from children with acute necrotizing encephalopathy. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17(8): 1436-1444.
8. Sabin A.B. Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science.* 1959, 130(3386): 1387-1389.
9. Steyer A., Gutierrez-Aguire I., Kolenc M. et al. High similarity of novel orthoreovirus detected in a child hospitalized with acute gastroenteritis to mammalian orthoreoviruses found in bats in Europe. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51(11): 3818-3825.
10. Thimmasandra Narayanappa A., Sooryanarain H., Deventhiran J. et al. A novel pathogenic Mammalian orthoreovirus from diarrheic pigs and Swine blood meal in the United States. *MBio.* 2015, 6(3): e00593-00515.

Поступила 31.05.18

Контактная информация: Файзулов Евгений Бахтиерович, к.б.н., 105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, р.т. (495)674-45-84

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Н.А.Михайлова, Д.А.Воеводин, А.В.Поддубиков

КОРРЕКЦИЯ ДИСБИОЗА — ОСНОВА РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Эффективность регенерации обеспечивается нормальным течением обменных и регуляторных реакций, поэтому регенеративная терапия должна быть направлена на выявление и устранение причин дисметаболизующих воздействий. Микробиоценоз является неотъемлемой частью целостного организма человека, принимает участие в реализации всех обменных реакций носителя. Коррекция дисбиоза способствует восстановлению регенеративных процессов, для развития этого направления необходима разработка нового поколения пробиотических препаратов.

Журн. микробиол., 2018, № 5, С. 107—113

Ключевые слова: регенеративная медицина, микробиоценоз, дисбиоз, пробиотики, метабиотики