

Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм

С. М. Суханова, З. Е. Бердникова*, А. С. Тихонова

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

Актуальной проблемой безопасности биологических лекарственных препаратов (БЛП) остается контаминация микоплазмами, источниками которой могут быть ткани и органы доноров, вирусные сборы, компоненты питательных сред, трипсин, сыворотки крови животных, а также персонал, занимающийся изготовлением медицинских препаратов. В настоящее время в связи с расширением спектра выпускаемых БЛП возрастает необходимость повышения чувствительности и специфичности методик их анализа. В Российской Федерации оценку качества готовой формы препарата на присутствие микоплазм микробиологическим (культуральным) методом проводят с использованием сложных питательных сред, чувствительность которых зависит от качества используемого белкового сырья, ингредиентов и реактивов. Ростовые свойства сред, согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд., определяют с помощью одного тест-штамма — *Mycoplasma arginini* G230 (ОСО *M. arginini* G230). Цель работы — анализ современных отечественных и зарубежных требований к оценке качества питательной среды, используемой в испытании на присутствие микоплазм, для актуализации и совершенствования методики ее оценки в Российской Федерации. Установлено, что безусловным преимуществом рекомендаций отечественной фармакопеи является возможность применения полужидкой питательной среды, не требующей создания специальных аэробных или анаэробных условий инкубации, позволяющей определять количество колоний и титр микоплазм в испытуемом материале при подтверждении ее ростовых свойств с помощью ОСО тест-штамма *M. arginini* G230. Выявленные в ходе анализа отличия отечественных и зарубежных требований к оценке качества питательной среды позволили разработать предложения по совершенствованию отечественной методики, заключающиеся в расширении спектра используемых тест-штаммов и создании соответствующих стандартных образцов.

Ключевые слова: биологические лекарственные препараты; контаминация микоплазмами; безопасность; отраслевой стандартный образец; оценка чувствительности питательной среды; экспертиза качества; *Mycoplasma*; *Acholeplasma*

Для цитирования: Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Тихонова АС. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019;19(3):161–168. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168>

Контактное лицо: Бердникова Зинаида Евтропиевна; Berdnikova@expmed.ru

Ways to Improve Quality Control of Culture Medium Used for Mycoplasma Detection

S. M. Sukhanova, Z. E. Berdnikova*, A. S. Tikhonova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

An urgent safety concern associated with biological products is contamination with mycoplasmas, which may originate from donor tissues and organs, virus harvests, culture medium components, trypsin, animal blood serum, as well as be transmitted by personnel involved in the manufacture of medicines. Currently, due to an increase in the range of biologicals available, there is a need for more sensitive and specific test methods. In the Russian practice, microbiological (culture-based) testing of finished pharmaceutical products for mycoplasma contamination is performed using complex culture media whose sensitivity depends on the quality of proteins, ingredients, and reagents used. Growth promotion properties of the media are determined according to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed., using a single test strain — *Mycoplasma arginini* G230 (*M. arginini* G230 industry reference material). The aim of the study was to analyse current Russian and foreign requirements for the quality control of culture media that are used for mycoplasma detection, in order to update and improve the quality control procedure in Russia. It was demonstrated that a compelling advantage of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation is the possibility of using a semi-liquid culture medium which does not require special aerobic or anaerobic incubation conditions and allows for quantification of mycoplasma colonies and determination of mycoplasma titre in culture medium while testing its growth promotion properties using reference *M. arginini* G230 test strain. The analysis revealed some differences in Russian and foreign requirements for quality evaluation of culture media. These differences were taken into account when developing recommendations for improvement of the Russian test procedure, i.e. enlarging the range of test strains used and development of respective reference standards.

Key words: biological products; mycoplasma contamination; safety; industry reference material; assessment of culture medium sensitivity; quality control

For citation: Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Tikhonova AS. Ways to improve quality control of culture medium used for mycoplasma detection. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):161–168. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168>

***Corresponding author:** Berdnikova Zinaida Evtropievna; berdnikova@expmed.ru

Проблема контаминации микоплазмами биологических лекарственных препаратов (БЛП) остается актуальной не только для производителей, но и для потребителей лекарственных средств. Широкое распространение микоплазм обусловлено их способностью использовать в качестве источников питания разнообразные минеральные и органические соединения. Микоплазмы растут как на искусственных средах, так и паразитируя на поверхности мембран и внутри клеток млекопитающих и птиц¹. Помимо заболеваний у человека микоплазмы могут вызывать инфекционные поражения у животных, ткани и органы которых используются в производстве БЛП. Опасность применения контаминированных БЛП состоит в том, что в организме человека микоплазмы способны вызывать острые респираторные и урогенитальные заболевания, артрит и иммунодефицитные состояния, в том числе онкогенные [1]. Наибольшее беспокойство вызывает тот факт, что, обладая высокой специфичностью в отношении вида естественного хозяина, микоплазмы оказываются неспецифичными в отношении вида клеток, инфицируемых *in vitro*, что приводит к загрязнению культур клеток-субстратов производства БЛП. Микоплазмы являются основными контаминантами клеток, используемых для производства БЛП. Около 95% контаминации приходится на *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinis*, *M. orale* и *Acholeplasma laidlawii* [2–4]. Риски, возникающие при использовании потенциально опасного сырья, обуславливают необходимость проведения тщательного входного контроля, кроме того, обнаружение контаминирующего агента в процессе производства или на стадии готового препарата до розлива (полуфабриката) неизбежно связано не только с финансовыми затратами, но и с проведением дополнительных мероприятий, направленных на выяснение причин и источника заражения.

Для выпуска безопасных и эффективных лекарственных препаратов, получаемых с использованием первичных и перевиваемых клеточных культур различного происхождения, сывороток крови животных, вирусных штаммов, трипсина и других компонентов биологического происхождения, исключительно важным является использование надежных и чувствительных методов контроля, позволяющих выявлять источники микоплазменной контаминации [5]. В настоящее время для обнаружения микоплазм в исследуемом материале используют прямые и косвенные методы. Наиболее чувствительным, простым и экономичным методом, рекомендованным для оценки качества препарата, является микробиологический (культуральный) метод, основанный на культивировании исследуемого образца в селективных жидких и агаровых питательных средах в условиях, учитывающих потребности соответствующих видов микоплазм. В Российской Федерации, согласно

требованиям Государственной фармакопеи XIV изд., испытание на присутствие микоплазм² микробиологическим (культуральным) методом проводится с использованием питательной среды лабораторного приготовления, чувствительность которой определяют с помощью отраслевого стандартного образца (ОСО) тест-штамма *M. arginini* G230. Данный вид является возбудителем микоплазмоза у животных. Необходимо отметить, что особенностью современного производства лекарственных средств является расширение спектра препаратов, действующее вещество которых получено из различных биологических источников и для оценки качества которых используются биологические методы. Вследствие чего достоверная оценка качества и безопасности используемых для этих целей материалов, характеризующихся не только разнообразием и вариабельностью свойств, но и возможным загрязнением, обуславливает актуальность и необходимость повышения чувствительности и специфичности методик их тестирования.

Цель работы — анализ современных отечественных и зарубежных требований к оценке качества питательной среды, используемой в испытании на присутствие микоплазм, для актуализации и совершенствования методики ее оценки в Российской Федерации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить данные литературы о рисках микоплазменной контаминации в производстве БЛП;
- провести сравнительный анализ требований Государственной фармакопеи Российской Федерации и ведущих зарубежных фармакопей к проведению испытания на присутствие микоплазм, а также к порядку подтверждения ростовых свойств питательных сред, используемых для проведения испытания на присутствие микоплазм культуральным (микробиологическим) методом;
- определить основные направления совершенствования методики оценки качества питательной среды, используемой для проведения испытания на присутствие микоплазм.

Для решения поставленных задач в работе использовали материалы ведущих зарубежных фармакопей, в том числе Европейской фармакопеи (ЕФ)³, фармакопеи США (ФСША)⁴, Государственной фармакопеи Республики Беларусь (ГФ РБ)⁵, технических докладов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)⁶, а также Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ)⁷, в которых регламентированы требования к испытанию на присутствие микоплазм.

Микоплазмы представляют собой мельчайшие прокариотические организмы (0,3–0,8 мкм), лишенные ригидной клеточной стенки и окруженные цитоплазматической мембраной. Они со-

¹ Борхсениус СН, Чернова ОА. Микоплазмы. Л.: Наука; 1989.

² Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2; 2018.

³ 2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia 9th ed.

⁴ <63> Mycoplasma Tests. USP 41–NF 36; 2018.

⁵ 2.6.7. Микоплазмы. Государственная фармакопея Республики Беларусь. II изд. Т. 1; 2013.

⁶ WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 872, 1998.

⁷ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2; 2018.

держат рибосомы, РНК, ДНК и способны к независимому развитию и воспроизводству. Размеры микоплазм приближаются к размерам крупных вирусов, но, в отличие от них, процесс воспроизводства микоплазм может протекать вне живых клеток. Микоплазмы являются мембранными паразитами, конкурирующими с клетками организма-хозяина за аминокислоты, сахара, нуклеиновые кислоты, и, препятствуя их нормальному метаболизму, вызывают в системе *in vitro* различные хромосомные нарушения. Продукты метаболизма микоплазм (перекись водорода, супероксидные радикалы) оказывают токсическое и гемолитическое действие на мембраны клеток и эритроциты. Микоплазмы, способные прикрепляться к поверхности клеток хозяина, приводят к колонизации тканей и развитию воспалительных процессов [6]. Некоторые виды микоплазм потенциально патогенны для человека, животных и птиц. К их числу следует отнести *M. mycoides* — возбудитель пневмонии крупного и мелкого рогатого скота, *M. agalactiae* — возбудитель ревматоидного синдрома мелкого рогатого скота, *M. pneumoniae* — возбудитель острых респираторных заболеваний и первичной атипичной пневмонии человека, обладающий высокой гемолитической активностью. Достаточно часто микоплазменное инфицирование заканчивается хроническим заболеванием [7]. В таблице 1 представлены данные о патогенности для человека наиболее часто встречающихся видов микоплазм.

Широкое распространение микоплазмозов у крупного рогатого скота, сопровождающихся длительной персистенцией возбудителя в крови и органах переболевших животных, приводит к тому, что органы, ткани и сыворотки крови часто становятся источниками контаминации микоплазмами питательных сред и клеточных культур, используемых для репликации вирусов при производстве БЛП [8, 9]. В таблице 2 представлены примеры вакцин, при производстве которых используются клеточные культуры различных животных и человека.

Зараженные микоплазмами клеточные культуры, сыворотка крови животных, используемая в качестве компонента пита-

тельных сред для выращивания клеточных культур, трипсин, вспомогательные материалы и производственный персонал остаются основными источниками контаминации [10]. Особую настороженность вызывает широкое распространение микоплазмоза, протекающего без внешне выраженных клинических проявлений. Так, например, непатогенный вид *M. orale*, обитающий в норме в полости рта человека, является наиболее часто встречающимся контаминантом клеточных культур (до 70%). Не менее распространенный контаминант *A. laidlawii* (до 30%) обнаруживается почти у всех видов животных, включая птиц, домашний скот, а также у больных и здоровых людей. В настоящее время пристальное внимание ученых привлекает также изучение феномена формирования устойчивости *M. orale* и *A. laidlawii* к антибиотикам⁸. Анализ данных литературы указывает на разнообразные пути и источники заражения клеточных культур микоплазмами, а также широкий спектр видов и штаммов микоплазм, выявляемых при микоплазмозах человека и животных.

Несмотря на высокую распространенность, выявление микоплазм в исследуемом материале представляет собой достаточно сложную задачу в связи с наличием у них особых требований к питательным веществам и условиям культивирования. Среда должны содержать не только традиционные источники азота, углерода, но и различные витамины, аминокислоты и другие богатые питательными веществами компоненты биологического происхождения. Ростстимулирующими свойствами для большинства микоплазм обладают холестерин и другие липиды, известны также аргининзависимые и глюкозоферментирующие виды микоплазм. Тем не менее встречаются микоплазмы, в частности принадлежащие к роду *Acholeplasma*, которые не требуют для своего роста стерола. Являясь строгими аэробами либо облигатными анаэробами, большинство микоплазм лучше растут в атмосфере, содержащей углекислый газ и пониженную концентрацию кислорода. Учитывая требовательность микоплазм к условиям культиви-

Таблица 1. Данные о патогенности для человека некоторых видов микоплазм [7]
Table 1. Data on pathogenicity of some Mycoplasma species for humans [7]

Вид микоплазм <i>Mycoplasma species</i>	Локализация Site	Характер инфекционного процесса Nature of the infectious process
<i>Mycoplasma orale</i>	Респираторный тракт Respiratory tract	Воспаление верхних дыхательных путей Upper respiratory tract infection
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Урогенитальный и респираторный тракты Urogenital and respiratory tracts	Воспалительные заболевания тазовых органов, верхних дыхательных путей Pelvic and upper airway inflammatory diseases
<i>M. pneumoniae</i>	Респираторный тракт Respiratory tract	Воспаление верхних дыхательных путей, трахеобронхит, атипичная пневмония, нереспираторные проявления Upper respiratory tract infection, tracheobronchitis, atypical pneumonia, nonrespiratory symptoms
<i>M. hominis</i>	Урогенитальный тракт Urogenital tract	Пиелонефрит, воспалительные заболевания тазовых органов, послеродовая лихорадка, пороки развития плода Pyelonephritis, pelvic inflammatory diseases, postpartum fever, fetal congenital abnormalities
<i>M. genitalium</i>	Урогенитальный тракт Urogenital tract	Негонококковый уретрит, простатит (урогенитальный микоплазмоз) Non-gonococcal urethritis, prostatitis (urogenital mycoplasma infection)
<i>M. fermentans</i>	Урогенитальный и респираторный тракты Urogenital and respiratory tracts	Воспалительные заболевания респираторного тракта, ревматоидный артрит Respiratory tract inflammation diseases, rheumatoid arthritis
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Урогенитальный тракт Urogenital tract	Негонококковый уретрит, простатит, сальпингит, вагинит, мочекаменная болезнь. Бесплодие, преждевременные роды, спонтанные аборты, мертворождение Non-gonococcal urethritis, prostatitis, salpingitis, vaginitis, kidney stone disease. Infertility, preterm delivery, spontaneous abortion, still birth

⁸ Борхсениус СН, Чернова ОА. Микоплазмы. Л.: Наука; 1989.

Таблица 2. Клеточные культуры — субстраты производства вирусных вакцин⁹
Table 2. Cell cultures used as substrates for viral vaccines production⁹

Наименование иммунобиологического лекарственного препарата Immunobiological product	Предприятие-производитель (страна) Manufacturing company (country)	Клеточные культуры — субстраты производства Cell cultures — production substrates
Вакцина коревая культуральная живая Live, cell-derived measles vaccine	АО «НПО Микроген» (Россия) АО «Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen» (Russia)	Первичная культура клеток эмбрионов перепелов Primary quail embryo cells
Вакцина паротитная культуральная живая Live, cell-derived mumps vaccine	АО «НПО Микроген» (Россия) АО «Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen» (Russia)	
Вакцина паротитно-коревая культуральная живая Live, cell-derived measles and mumps vaccine	АО «НПО Микроген» (Россия) АО «Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen» (Russia)	
Вакцина клещевого энцефалита культуральная сухая Dried, cell-derived tick-borne encephalitis vaccine	ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Россия) Chumakov FSC R&D IBP RAS (Russia)	Первичная культура клеток эмбрионов кур Primary chick embryo cells
КОКАВ вакцина антирабическая концентрированная KOKAV concentrated antirabies vaccine	АО «НПО Микроген» (Россия) АО «Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen» (Russia)	Первичная культура клеток почек сирийских хомячков Primary Syrian golden hamster kidney cells
Вакцина против краснухи культуральная живая Live, cell-derived rubella vaccine	АО «НПО Микроген» (Россия) АО «Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen» (Russia)	Диплоидная культура клеток легкого эмбриона человека MRC-5 MRC-5, diploid human cell culture line composed of fetal lung fibroblasts
Хаврикс® (вакцина против гепатита А инактивированная) HAVRIX® (Hepatitis A vaccine, inactivated)	ГлаксоСмитКляйн Байолоджикалз С. А. (Бельгия) GlaxoSmithKline Biologicals S. A. (Belgium)	
Аваксим 80 (вакцина для профилактики гепатита А инактивированная, адсорбированная) AVAXIM 80 (Hepatitis A vaccine, inactivated, adsorbed)	Санофи Пастер С. А. (Франция) Sanofi Pasteur S. A. (France)	
Имовакс Полио® (вакцина для профилактики полиомиелита инактивированная) IMOVAX Polio® (Polio vaccine, inactivated)	Санофи Пастер С. А. (Франция) ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Россия) Sanofi Pasteur S. A. (France) Chumakov FSC R&D IBP RAS (Russia)	
Геп-А-ин-Вак (вакцина гепатита А культуральная очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая) HEP-A-IN-VAC (Hepatitis A cell-derived, purified vaccine, concentrated, adsorbed, inactivated, liquid)	АО «Вектор БиАльгам» (Россия) АО «Vektor BiAlgam» (Russia)	Перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартышки 4647 4647, African green monkey kidney cell line

рования, в 1975 году Комитет экспертов ВОЗ¹⁰ для проведения испытания на отсутствие микоплазм рекомендовал подбирать питательные среды в зависимости от определенных условий, например от тканей, в которых размножился вирус, или от животных — продуцентов сывороток крови, или от необходимых для роста потенциальных контаминантов веществ, например дрожжевого экстракта. Для обеспечения пищевых потребностей микоплазм было предложено использовать среды, содержащие фракции сывороток крови, богатые липидами (стеролом и фосфолипидами). Ростовые свойства этих сред

в каждом испытании рекомендовано оценивать с помощью контрольных культур (стеролазависимых и стеролазависимых) штаммов микоплазм.

В нашей стране проведение испытаний иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) на присутствие микоплазм было начато в конце 1960-х — начале 1970-х годов. Особенно сложной оказалась задача разработки состава питательной среды, предназначенной для выявления микоплазм в исследуемых образцах. Наибольшее признание и распространение получила предложенная Г. Я. Каган и И. В. Раковской

⁹ Государственный реестр лекарственных средств.

¹⁰ Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. Серия технических докладов ВОЗ 530; 1975.

среда, питательной основой которой служил триптический пепард сердца крупного рогатого скота¹¹. В качестве источника азота, углерода, витаминов и аминокислот в состав среды входил мясной экстракт, а источником предшественников нуклеиновых кислот служил экстракт дрожжей. Непосредственно перед использованием к готовой питательной среде требуется добавление 15–20% стерильной неинaktivированной сыворотки крови лошади. Для выявления микоплазм в среде этого состава не требовалось создания специальных условий. Инкубация проводилась при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 14 сут. Жидкая питательная среда и полужидкая среда, содержащая 0,3% агара, предназначены для накопления и выделения микоплазм соответственно. Уникальная способность полужидкой питательной среды, содержащей пониженную концентрацию агара (0,3%), формировать колонии микоплазм в виде «светлого облачка, ажурной паутинки или пушистых комочков» в толще полужидкой среды, обеспечивала возможность подсчитывать количество колоний при визуальном просмотре в проходящем свете и определять титр микоплазм в испытуемом материале. К тому же состав этой питательной среды позволял создавать оптимальные условия, необходимые для выделения и культивирования различных видов микоплазм. Для подтверждения наличия микоплазм предназначалась плотная питательная среда, содержащая 1,3% агара, на которой колонии микоплазм, наблюдаемые при малом увеличении микроскопа, вырастали в форме «яичницы-глазуньи» диаметром 0,1–0,3 мм с выпуклым вросшим в агар центром и ажурной периферией¹².

В связи с тем, что в качестве компонентов среды использовали нестандартное сырье биологического происхождения, не менее важной для выбора партий среды с высоким уровнем чувствительности являлась проблема стандартизации условий оценки ее пригодности. ВОЗ для получения эффективных и безопасных лекарственных средств рекомендует при проведении испытаний применять соответствующие стандарты¹³. Использование биологических стандартных образцов позволяет сопоставлять полученные данные, достигая единообразия и уменьшая вариабельность при проведении тестирования БЛП. Необходимость стандартизации метода контроля питательных сред лабораторного приготовления, качество которых может варьировать в зависимости от качества используемых ингредиентов, оказывая влияние на результаты контроля, послужила предпосылкой разработки ОСО тест-штамма *M. arginini* G230. Выбор тест-штамма для определения чувствительности среды был обусловлен тем, что аргининзависимый штамм *M. arginini* как наиболее часто встречающийся контаминант клеточных культур и препаратов сывороток крови животных обладал, во-первых, повышенными пищевыми потребностями, а во-вторых, выдерживал процедуру лиофилизации с последующим практически 100% восстановлением первоначального количества жизнеспособных клеток. Это позволяет исключить стадии дополнительных пересевов по восстановлению культуры, что, в свою очередь, приводит к снижению риска ее повреждения и контаминации, и не только повышает достоверность и точность испытания,

но и упрощает процедуру анализа. Разработанный лиофилизированный стандартный образец тест-штамма *M. arginini* G230 (титр $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) был изготовлен в соответствии с основными принципами приготовления и утверждения эталонов для биологических материалов, изложенными комитетом экспертов ВОЗ¹⁴, и сохранял стабильность свойств при длительном хранении. Простота и удобство его использования, не требующие проведения при каждом контроле дополнительной процедуры по стандартизации концентрации микробной взвеси, позволяют получать требуемое количество КОЕ титрованием лиофильно высушенного ОСО в физиологическом растворе методом десятикратного разведения от 10^{-1} до 10^{-10} . Критерием пригодности среды является наличие визуально обнаруживаемого роста тест-штамма *M. arginini* G230 из разведений 10^{-7} , 10^{-6} (10 – 100 КОЕ) не позднее 7 сут инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ¹⁵. Методика, обеспечивающая возможность выбора наиболее чувствительных серий питательной среды, и использование ОСО тест-штамма *M. arginini* G230 в качестве эталона при оценке ее качества позволили стандартизовать условия проведения испытания на присутствие микоплазм.

Результаты исследований послужили основой для разработки национальных требований к проведению испытаний клеточных культур — субстратов производства, вирусных банков, а также готовых форм лекарственных препаратов на присутствие микоплазм микробиологическим методом, которые были внесены в МУК 4.1/4.2.588–96¹⁶, а затем в нормативные документы на соответствующие препараты.

Развитие методов оценки качества биологических препаратов привело к дальнейшему совершенствованию испытания на присутствие микоплазм. В нашей стране требования к проведению испытания внесены в ГФ РФ XIV изд.¹⁷, в которой установлены нормативные требования и изложен порядок проведения испытания на присутствие микоплазм для посевных (исходных) клеток, клеточных культур мастер банка, рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур, вспомогательных материалов (трипсин, сыворотка крови животных), вирусных банков, вирусных сборов, готового лекарственного препарата до розлива, готовой лекарственной формы препарата, которые согласно нормативной документации не должны содержать микоплазмы. Согласно этим требованиям тестирование на присутствие микоплазм проводят микробиологическим (культуральным) методом и методом индикаторной клеточной культуры (цитохимическим) с использованием флюоресцирующего красителя ДНК. Как правило, двумя методами испытание на присутствие микоплазм проводят для посевных (исходных) клеток, клеточных культур мастер банка и рабочих банков, производственных и контрольных клеточных культур, вирусные банки, вирусные сборы, готовый препарат до розлива и готовую форму препарата тестируют только микробиологическим методом.

Согласно требованиям ГФ РФ XIV изд. для проведения испытания БЛП на присутствие микоплазм микробиологическим методом, как и ранее, предусмотрено использование

¹¹ Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2. М.: Гриф и К; 2012.

¹² Каган ГЯ. Современные проблемы учения о микоплазменных инфекциях. Клин: Медицина; 1983.

¹³ Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. Серия технических докладов ВОЗ 760; 1990.

¹⁴ Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов. Серия технических докладов ВОЗ 530; 1975.

¹⁵ Бердникова ЗЕ. Разработка и стандартизация методов выявления микоплазм-контаминантов медицинских биологических препаратов: дис. ... канд. биол. наук. М.; 1991.

¹⁶ МУК 4.1/4.2.588–96 Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям.

¹⁷ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2; 2018.

Таблица 3. Тест-штаммы микроорганизмов, рекомендуемые для оценки ростовых свойств питательных сред, предназначенных для испытания вакцин различного назначения на наличие микоплазм

Table 3. Test strains recommended for evaluation of growth promotion properties of culture media used for testing various vaccines for the presence of mycoplasmas

Наименование тест-штамма микроорганизма Test strains	Характеристика вакцины Vaccine characteristics
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Вакцины для медицинского и ветеринарного применения, в процессе производства которых используются антибиотики Vaccines for human use and veterinary vaccines whose production involves the use of antibiotics
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Вакцины, в процессе производства которых используются материалы, субстраты птичьего происхождения. Вакцины, предназначенные для применения в птицеводстве Vaccines whose production involves the use of materials and substrates of avian origin. Vaccines to be used in the poultry industry
<i>M. hyorhinis</i> <i>M. heopneumoniae</i>	Вакцины для ветеринарного назначения, кроме применяемых в птицеводстве Veterinary vaccines with the exception of poultry vaccines
<i>M. orale</i>	Вакцины для медицинского и ветеринарного назначения Vaccines for human use and veterinary vaccines
<i>M. pneumoniae</i> , <i>M. fermentans</i>	Вакцины для медицинского применения Vaccines for human use
<i>M. synoviae</i>	Вакцины, предназначенные для применения в птицеводстве. Вакцины, в процессе производства которых используются материалы, субстраты птичьего происхождения Poultry vaccines. Vaccines whose production involves the use of materials and substrates of avian origin

полужидкой среды Каган. При необходимости для накопления микоплазм может быть использована жидкая среда Каган, а для подтверждения наличия микоплазм — плотная среда, содержащая агар в концентрации 1,3%. Ростовые свойства приготовленной партии питательной среды также проверяют с помощью ОСО одного тест-штамма *M. arginini* G230, однако допускается использование и музейных тестовых штаммов микроорганизмов в зависимости от типа испытуемого препарата: *A. laidlawii*, *M. gallisepticum*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. synoviae* при условии использования соответствующих по ростовым свойствам питательных сред. Конкретные прописи рекомендуемых сред и требования к штаммам или наименованию коллекций не приводятся.

Для совершенствования испытания на присутствие микоплазм нами был проведен детальный анализ требований регуляторных органов зарубежных стран. Испытание на присутствие микоплазм, так же как и в ГФ РФ XIV изд., рекомендовано проводить с помощью двух методов: микробиологического метода (посев на питательные среды) и метода индикаторной клеточной культуры (цитохимического), окрашиванием ДНК микоплазм флюоресцирующим красителем. Виды тестируемых материалов и методы их исследования, указанные в зарубежных фармакопеях и ГФ РФ, совпадают. Сравнение отечественных и зарубежных требований к условиям проведения испытания цитохимическим методом показало, что они не имеют существенных различий и согласуются с требованиями, изложенными в ОФС 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм¹⁸. Контроль клеточных культур на присутствие микоплазм цитохимическим методом позволяет выявлять трудно культивируемые виды микоплазм и рекомендован во всех изученных документах для скрининга питательных сред¹⁹. Метод представляет собой сложную многоступенчатую процедуру, предусматривающую получение монослоя производственной или другой клеточной культуры, чувствительной к микоплазмам, фиксирование, окра-

шивание специфическим флюоресцирующим красителем ДНК и просмотр в люминесцентном микроскопе.

В связи с тем, что испытание БЛП микробиологическим методом является более простым, обладающим достаточно высокой чувствительностью и специфичностью, в фармацевтическом анализе различных стран метод находит более широкое применение. Сравнение отечественных и зарубежных требований к методике проведения исследования испытуемого материала микробиологическим методом показало наличие ряда расхождений. Основные отличия затрагивают требования к используемым питательным средам и оценке их ростовых свойств. Согласно требованиям практически всех зарубежных фармакопей испытание на присутствие микоплазм проводят при температуре (36 ± 1) °С с использованием жидких и плотных питательных сред, предусматривающих создание для плотных сред специальных микроаэрофильных условий (атмосфера азота, содержащая 5–10% CO₂). В состав сред, рекомендуемых для обнаружения микоплазм, в качестве основных компонентов входят бульон из экстракта говяжьего сердца и сыворотка крови свиньи или лошади (среды Фрея, Хейфика, Фриса). Полужидкие среды, аналогичные среде Каган, в зарубежных фармакопеях для испытания на присутствие микоплазм не используются. В зависимости от вида предполагаемого контаминанта в среды рекомендовано добавлять необходимые аминокислоты, витамины и антибиотики. Оценка их ростовых свойств в зависимости от испытуемого материала и назначения лекарственного средства определяют, используя не стандартные образцы, как предложено в ГФ РФ XIV изд., а с помощью тест-штаммов: *M. orale*, *A. laidlawii*, *M. gallisepticum*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. pneumoniae*, *M. synoviae*, являющихся изолятами культур микоплазм, выделенных из патогенного материала, прошедших не более 15 пассажей и хранящихся в замороженном или лиофилизированном состоянии. Плотная среда, предназначенная для оценки качества БЛП, выдерживает испытание,

¹⁸ Общая фармакопейная статья 1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 2; 2018.

¹⁹ WHO Expert committee on biological standardization. WHO Technical Report Series 872, 1998. 2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia 9th ed.

аналогично требованиям ГФ РФ, при наличии роста каждого тест-микроорганизма при посеве не более 100 КОЕ. Качество жидкой среды для накопления микоплазм оценивается по наличию роста на плотной среде материала, пересейного, по крайней мере, 1 раз с бульона, в который было первоначально внесено также не более 100 КОЕ. Изучение требований зарубежных фармакопей (ЕФ, ФСША, ГФ РБ), представленных в таблице 3, свидетельствует, что при определении качества вакцин для медицинского применения ростовые свойства питательных сред рекомендовано оценивать в отношении наиболее чувствительных штаммов самых распространенных видов контаминирующих микоплазм — *M. orale* (аргининзависимый) и *A. laidlawii* (глюкозоферментирующий), а также патогенных для человека — *M. pneumoniae* и *M. fermentans*.

По требованиям ФСША в качестве положительного контроля и для подтверждения ростовых свойств каждой серии питательной среды рекомендовано использовать как минимум два тест-штамма, один из которых должен быть глюкозоферментирующим (*M. pneumoniae* или аналогичный), а другой — аргининзависимым (*M. orale* или аналогичный).

Таким образом, в настоящее время основным отличием зарубежных требований от требований ГФ РФ к оценке качества питательных сред при проведении испытания БЛП на наличие микоплазм является использование большего числа наиболее значимых для безопасности вакцин тест-штаммов. Однако безусловным преимуществом рекомендаций отечественной фармакопеи является возможность применения полужидкой питательной среды, не требующей создания специальных аэробных или анаэробных условий инкубации, позволяющей определять количество колоний и титр микоплазм в испытуемом материале, при подтверждении ее ростовых свойств с помощью стандартного образца тест-штамма *M. arginini* G230, обладающего способностью дифференцировать партии питательной среды по их чувствительности.

Заключение

Анализ требований Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. и ведущих зарубежных фармакопей к порядку подтверждения ростовых свойств питательных сред, используемых для проведения испытания на присутствие микоплазм культуральным (микробиологическим) методом, показал, что отечественная нормативная база в части оценки качества питательных сред для выявления микоплазм нуждается в актуализации и совершенствовании с учетом международных требований. В качестве основного направления совершенствования отечественной методики целесообразно рассматривать разработку стандартных образцов для более широкого спектра тестовых штаммов и, в первую очередь, чувствительных к составу питательной среды *M. orale* и *A. laidlawii*, а также патогенных для человека *M. pneumoniae* и *M. fermentans*. Использование новых стандартных образцов позволит не только гармонизировать отечественные и международные требования к оценке пригодности питательной среды для проведения испытания, но и стандартизировать условия проведения оценки, а также повысить качество и безопасность биологических лекарственных препаратов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project

No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Прозоровский СВ, Раковская ИВ, Вульфович ЮВ. Медицинская микоплазмология. М.: Медицина; 1995. [Prozorovskiy SV, Rakovskaya IV, Vul'fovich YuV. *Medical mycoplasmaology*. Moscow: Meditsina; 1995 (In Russ.)]
2. McGarrity GJ, Kotani H, Butler GH. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, eds. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1992. P. 445–54.
3. Чернов ВМ, Чернова ОА, Санчес-Вега ХТ, Колпак АИ, Ильинская ОН. Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов. *Acta Naturae*. 2014;6(3):43–54. [Chernov VM, Chernova OA, Sanchez-Vega JT, Kolpakov AI, Ilinskaya ON. Mycoplasma contamination of cell cultures: vesicular traffic in bacteria and control over infectious agents. *Acta Naturae*. 2014;6(3):43–54 (In Russ.)]
4. Olarerin-George AO, Hogenesch JB. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(5):2535–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv136>
5. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2016;(2):38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YuV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality standards for immunobiological medicinal products — new texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2016;(2):38–41 (In Russ.)]
6. Савичева АМ, Шипицына ЕВ, Башмакова МА. Генитальные микоплазмы — проблемы диагностики и лечения. *Клиническая дерматология и венерология*. 2008;(6):80–90. [Savicheva AM, Shipitsyna EV, Bashmakova MA. Genital Mycoplasmas are the problems of diagnosis and treatment. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology*. 2008;(6):80–9 (In Russ.)]
7. Потатуркина-Нестерова НИ, Немова ИС, Магомедова АМ, Нестеров АС. Патогенный потенциал микоплазм, эпидемиологически ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. *Фундаментальные исследования*. 2012;(1):89–92. [Potaturkina-Nesterova NI, Nemova IS, Magomedova AM, Nesterov AS. Pathogenic mycoplasma potential epidemiologically associated with inflammatory diseases of urinogenital tract. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental research*. 2012;(1):89–92 (In Russ.)]
8. Подчерняева РЯ, Урываев ЛВ, Дедова АВ, Дедова ЛВ, Ионова КС, Михайлова ГР и др. Определение микоплазм и вируса бычьей диареи в коллекционных клеточных линиях. *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*. 2011;27:80–8. [Podchernyaeva RYa, Uryvaev LV, Dedova AV, Dedova LV, Ionova KS, Mikhaylova GR, et al. Determination of mycoplasmas and bovine diarrhea virus

- in collection cell lines. *Kletochnye kul'tury. Informatsionnyy byulleten'* = *Cell Culture. News Bulletin*. 2011;27:80–8 (In Russ.)]
9. Сухинин АА, Макавчик СА, Кузьмин ВА, Фогель ЛС, Орехов ДА, Карпенко ЛЮ, Кан ФЛ. *Методические рекомендации по профилактике и ликвидации микоплазмозов сельскохозяйственных животных, в том числе птиц*. СПб: ФГБОУ ВО СПбГАВМ; 2017. [Sukhinin AA, Makavchik SA, Kuz'min VA, Fogel' LS, Orekhov DA, Karpenko LYu, Kan FL. *Guidelines for the prevention and elimination of mycoplasmosis of farm animals, including birds*. St. Petersburg: FGBOU VO SPbGAVM; 2017 (In Russ.)]
10. Колокольцова ТД, Сабурина ИН. Патологические аспекты микоплазменной контаминации клеточных культур. *Патогенез*. 2013;11(3):29–31. [Kolokoltsova TD, Saburina IN. Pathologic aspects of mycoplasma contamination of cell cultures. *Patogenez = Pathogenesis*. 2013;11(3):29–31 (In Russ.)]

Об авторах / Authors

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук. *Svetlana M. Sukhanova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Бердникова Зинаида Евтропиевна, канд. биол. наук. *Zinaida E. Berdnikova*, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9865-4250>

Тихонова Александра Сергеевна. *Aleksandra S. Tikhonova*

Поступила 31.07.2019

После доработки 26.08.2019

Принята к публикации 26.08.2019

Received 31 July 2019

Revised 26 August 2019

Accepted 26 August 2019