

2.1.6.25. ИСПЫТАНИЕ НА МИКОПЛАЗМЫ

Испытания на присутствие микоплазм проводят для главного и рабочего банков клеток, контрольных клеток, главной и рабочей посевных культур вирусов с использованием как метода культивирования, так и метода индикаторной клеточной культуры. Если испытание предписано для биомассы вируса, других промежуточных продуктов, готовых нерасфасованных продуктов, лекарственных препаратов (вакцин) используют метод культивирования. Для скрининга питательных сред при необходимости также может быть использован метод индикаторной клеточной культуры.

Метод амплификации нуклеиновых кислот можно использовать в качестве альтернативного метода одному или обоим методам (культивирования и индикаторной клеточной культуры) после проведения соответствующей валидации.

МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

ВЫБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Испытание проводят с использованием достаточного количества различных питательных сред (как жидких, так и полужидких или плотных), которые смогут обеспечить рост в выбранных условиях инкубации минимального количества тех микоплазм, которые могут присутствовать в испытуемых образцах. В качестве индикатора роста микоплазм в жидкие питательные среды добавляют феноловый красный. Выбор питательной среды зависит от питательных свойств, подходящих для представленных ниже микроорганизмов. Ростовые свойства каждой партии питательной среды подтверждают для соответствующих микроорганизмов из списка, представленного ниже. В испытания на присутствие микоплазм в качестве положительного контроля включают не менее одного из следующих штаммов:

- *Acholeplasma laidlawii* (вакцины для медицинского применения и для ветеринарного применения, при производстве которых используют антибиотики);

- *Mycoplasma gallisepticum* (в случае, если при производстве вакцин для медицинского применения используют материал птичьего происхождения или в случае, если вакцины предназначены для домашней птицы);

- *Mycoplasma hyorhinis* (вакцины для ветеринарного применения в случае, если при производстве не используют материал птичьего происхождения);

- *Mycoplasma orale* (вакцины для медицинского применения и для ветеринарного применения);

- *Mycoplasma pneumoniae* (вакцины для медицинского применения) или другие подходящие виды, ферментирующие D-глюкозу, такие как *Mycoplasma fermentans*;

- *Mycoplasma synoviae* (в случае, если при производстве используют материал птичьего происхождения или в случае, если вакцины предназначены для домашней птицы);

- *Mycoplasma arginini* (вакцины для медицинского применения).

Тест-штаммы представляют собой культуры, выделенные из патогенного материала, прошедшие ограниченное количество пассажей (не более 15) и хранящиеся в замороженном или лиофилизированном состоянии. После восстановления проводят идентификацию тест-штамма путем сравнения с типовыми культурами, такими как:

- *A. laidlawii* NCTC 10116, CIP 75.27, ATCC 23206;

- *M. gallisepticum* NCTC 10115, ATCC 19610;

- *M. fermentans* NCTC 10117, CIP 105680, ATCC 19989;

- *M. hyorhinis* NCTC 1013, ATCC 17981;

- *M. orale* NCTC 10112, ATCC 23714;

- *M. pneumoniae* NCTC 10119, ATCC 15531;

- *M. synoviae* NCTC 10124, ATCC 25204;

– *M. arginini* NCTC 10129, ATCC 23838.

В качестве стандартных образцов, содержащих тест-штаммы на ограниченном уровне пассажей, могут быть использованы *СО ФЕАЭС Acholeplasma laidlawii*, *СО ФЕАЭС Mycoplasma fermentans*, *СО ФЕАЭС Mycoplasma hyorhinis*, *СО ФЕАЭС Mycoplasma orale*, *СО ФЕАЭС Mycoplasma synoviae*, *СО ФЕАЭС Mycoplasma arginini* G230.

УСЛОВИЯ ИНКУБАЦИИ

Все посевы на жидких и полужидких питательных средах инкубируют в плотно закрытых емкостях при температуре от 35 °С до 38 °С. Плотные питательные среды инкубируют в микроаэрофильных условиях (в атмосфере азота, содержащего от 5 % до 10 % CO₂, при достаточной для предотвращения высыхания поверхности агара влажности) при температуре от 35 °С до 38 °С.

РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА СРЕД

Испытание на ростовые свойства проводят для каждой партии питательной среды. В чашки Петри диаметром 60 мм, содержащие 9 мл плотной питательной среды, в пробирки, содержащие 10 мл полужидкой среды, или в емкости, содержащие 100 мл жидкой питательной среды помещают не более 100 КОЕ соответствующего тест-штамма микроорганизма. Для каждого тест-штамма микроорганизма используют отдельные емкости, чашки Петри или пробирки. Инкубируют среды и, если применимо, проводят пересевы по 0,2 мл жидкой среды на плотную среду (или по 1,0 мл на полужидкую среду) через установленные промежутки времени (раздел *Испытание на присутствие микоплазм*).

Плотная среда выдерживает испытание, если наблюдается адекватный рост каждого тест-штамма микроорганизма (наблюдаемый рост отличается не более чем в пять раз по сравнению с рассчитанным значением относительно исходного материала).

Жидкая среда выдерживает испытание, если наблюдается адекватный рост на чашках с агаром, по меньшей мере, после первого пересева каждого из тест-штаммов микроорганизмов.

Полужидкая среда выдерживает испытание, если не позднее семи суток инкубации обнаруживается характерный рост тест-штаммов микроорганизмов.

ИНГИБИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Испытание на ингибирующие вещества проводят однократно для каждого наименования испытуемого образца. В случае изменений производственного процесса, способных повлиять на обнаружение микоплазм, необходимо подтвердить отсутствие ингибирующих веществ повторными испытаниями. Для подтверждения отсутствия ингибирующих веществ проводят испытание на определение ростовых свойств среды в присутствии и в отсутствие испытуемого образца.

Если в посевах без испытуемого образца и в его присутствии обнаруживают визуально сравнимый рост микоплазм, делают вывод о том, что испытуемый образец не содержит ингибирующих веществ.

Если в посевах в жидкой и полужидкой среде без испытуемого образца наблюдают рост тест-штамма микроорганизма в более ранние сроки, чем в посевах с испытуемым образцом (более чем в одном пересеве), или рост в присутствии испытуемого образца менее интенсивный или отсутствует, а на плотной среде регистрируют количество колоний менее 1/5 от количества, выросшего на среде без испытуемого образца, считают, что испытуемый образец содержит ингибирующие вещества, которые необходимо нейтрализовать или устранить их действие иным способом. Устранить действие ингибирующих веществ можно, например, разведением в питательной среде перед

испытанием или проведением не менее пяти пассажей клеточных культур без использования антибиотиков или ингибиторов. Если применяют разведение, то используют большие объемы питательной среды, или объем инокулята испытуемого образца разделяют между несколькими емкостями по 100 мл. Эффективность нейтрализации проверяют повторным испытанием на ингибирующие вещества.

ИСПЫТАНИЕ НА МИКОПЛАЗМЫ

Вносят 10 мл испытуемого образца в 100 мл жидкой питательной среды. В случае выявления значительного изменения pH после добавления испытуемого образца, pH регулируют добавлением раствора 80 г/л *натрия гидроксида* Р или раствора 103 г/л *хлороводородной кислоты* Р. Жидкую питательную среду инкубируют 20-21 сут.

Одновременно в качестве отрицательного контроля инкубируют образцы всех используемых в испытании питательных сред. В качестве положительного контроля используют посевы не более 100 КОЕ, по крайней мере, одного из тест-штаммов микроорганизмов на одну из питательных сред. Тест-штаммы микроорганизмов перечислены в разделе *Метод культивирования. Выбор питательной среды* данной общей фармакопейной статьи.

Из жидкой питательной среды через установленные интервалы времени проводят пересев на твердую или полужидкую питательные среды. На чашку Петри с плотной питательной средой помещают 0,2 мл жидкой питательной среды. В пробирку, содержащую не менее 10 мл полужидкой питательной среды, помещают 1,0 мл жидкой питательной среды.

Пересев проводят на 2–4 сут после внесения испытуемого образца в жидкую питательную среду, а также на 6–8 сут, 13–15 сут и на 19–21 сут. С каждой жидкой питательной среды проводят пересев на одну чашку Петри с каждой плотной питательной средой. В случае пересева на полужидкую питательную среду с каждой жидкой питательной среды проводят пересев на 10 пробирок, содержащих по 10 мл той же полужидкой среды. Все посевы инкубируют в течение 14 сут, за исключением пересева на 19–21 сут, который инкубируют семь суток.

Дополнительно жидкие питательные среды просматривают каждые 2–3 сут, и, в случае появления признаков роста микроорганизмов и (или) при обнаружении изменения цвета индикатора, также проводят пересев. Если обнаруживают бактериальную или грибковую контаминацию, испытание считают недействительным. Испытание считают действительным, если, по крайней мере, в одной из чашек Петри (или пробирок с полужидкой средой) с пересевом обнаруживают характерный рост микоплазм.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По окончании инкубации плотные питательные среды исследуют под микроскопом для определения наличия колоний микоплазм, исследование посевов в полужидкой питательной среде проводят путем визуального просмотра пробирки в прямом проходящем свете.

Испытуемый образец выдерживает испытание, если не обнаруживают рост типичных колоний микоплазм ни на одной инокулированной среде. Испытуемый образец не выдерживает испытание, если на любой питательной среде обнаруживают характерные признаки роста микоплазм.

Испытание считают недействительным, если:

- в одном или более отрицательном контроле выявляют рост микоплазм;
- в одном или более положительном контроле не наблюдают роста микоплазм ни на одной чашке (или пробирке в случае использования полужидкой среды) с пересевом.

При обнаружении подозрительных на микоплазмы колоний можно использовать подходящий валидированный метод для их идентификации.

СЛЕДУЮЩИЙ РАЗДЕЛ ПРИВОДИТСЯ ДЛЯ ИНФОРМАЦИИ

Для метода культивирования рекомендованы питательные среды, представленные ниже. Могут быть использованы другие среды в случае подтверждения их способности поддерживать рост микоплазм, продемонстрированной на каждой партии среды в присутствии и в отсутствие испытуемого образца.

Среда Хайфлика (рекомендована для общего обнаружения микоплазм)

Жидкая среда

Бульон из экстракта говяжьего сердца	90,0 мл
Лошадиная сыворотка (инактивированная при температуре 56 °С в течение 30 мин)	20,0 мл
Дрожжевой экстракт (250 г/л)	10,0 мл
Феноловый красный (раствор 0,6 г/л)	5,0 мл
Пенициллин (20 000 МЕ/мл)	0,25 мл
Дезоксирибонуклеиновая кислота (раствор 2 г/л)	1,2 мл
рН среды	7,8

Плотная среда

Готовят так же, как и жидкую среду, представленную выше, заменяя бульон из экстракта говяжьего сердца на агар из экстракта говяжьего сердца (содержит 15 г/л агара).

Среда Фрея (рекомендована для обнаружения *M. synoviae*)

Жидкая среда

Бульон из экстракта говяжьего сердца	90,0 мл
Витамины	0,025 мл
Глюкоза моногидрат (раствор 500 г/л)	2,0 мл
Сыворотка свиная (инактивированная при температуре 56 °С в течение 30 мин)	12,0 мл
β-никотинамидадениндинуклеотид (раствор 10 г/л)	1,0 мл
Цистеина гидрохлорид (раствор 10 г/л)	1,0 мл
Феноловый красный (раствор 0,6 г/л)	5,0 мл
Пенициллин (20 000 МЕ/мл)	0,25 мл

Смешивают β-никотинамидадениндинуклеотида раствор и цистеина гидрохлорида раствор, получившуюся смесь через 10 мин прибавляют к остальным ингредиентам. Доводят рН до значения 7,8.

Плотная среда

Бульон из экстракта говяжьего сердца	90,0 мл
Агар очищенный	1,4 г
Доводят рН до 7,8, стерилизуют автоклавированием, затем прибавляют:	
Витамины	0,025 мл
Глюкоза моногидрат (раствор 500 г/л)	2,0 мл
Сыворотка свиная (инактивированная при температуре 56 °С в течение 30 мин)	12,0 мл
β-никотинамидадениндинуклеотид (раствор 10 г/л)	1,0 мл
Цистеина гидрохлорид (раствор 10 г/л)	1,0 мл
Феноловый красный (раствор 0,6 г/л)	5,0 мл
Пенициллин (20 000 МЕ/мл)	0,25 мл

Среда Фриис (рекомендована для обнаружения микоплазм, кроме микоплазм птичьего происхождения)

Жидкая среда

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса	800 мл
(модифицированный)	
Вода дистиллированная	67 мл
Сердечно-мозговой экстракт	135 мл
Бульон для выявления <i>Pleuropneumonia</i> -подобных микроорганизмов (PPLO)	248 мл

Дрожжевой экстракт (170 г/л)	60 мл
Бацитрацин	250 мг
Метициллин	250 мг
Феноловый красный (раствор 5 г/л)	4,5 мл
Лошадиная сыворотка (инактивированная при температуре 56 °С в течение 30 мин)	165 мл
Свиная сыворотка (инактивированная при температуре 56 °С в течение 30 мин)	165 мл
рН среды	От 7,4 до 7,45
<i>Плотная среда</i>	
Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный)	200 мл
Диэтиламиноэтил декстран (ДЭАЭ-декстран)	200 мг
Агар очищенный	15,65 г
Тщательно перемешивают и стерилизуют автоклавированием. Охлаждают до температуры 100°С и прибавляют 1740 мл жидкой среды, как описано выше	
1. Бульон из экстракта говяжьего сердца:	
Говяжье сердце (для приготовления экстракта)	500 мг
Пептон	10 г
Натрия хлорид	5 г
Вода	до 1000 мл
Стерилизуют автоклавированием.	
2. Витамины	
Биотин	100 мг
Кальция пантотенат	100 мг
Холина хлорид	100 мг
Кислота фолиевая	100 мг
i-инозитол	200 мг
Никотинамид	100 мг
Пиридоксина гидрохлорид	100 мг
Рибофлавин	10 мг
Тиамин гидрохлорид	100 мг
Вода дистиллированная	до 1000 мл
3. Агар очищенный	
Высокоочищенный агар для использования в микробиологии и иммунологии, приготовленный методом ионного обмена, в результате чего получают продукт высокой очистки, прозрачности и прочности. В его состав входят:	
Вода	12,2 %
Зола	1,5 %
Кислотонерастворимая зола	0,2 %
Хлорин	0
Фосфат (в пересчете на P ₂ O ₅)	0,3 %
Общий азот	0,3 %
Медь	0,0008 %
Железо	0,017 %
Кальций	0,28 %
Магний	0,32 %
4. Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный)	
Натрия хлорид	6,4 г
Калия хлорид	0,32 г
Магния сульфат гептагидрат	0,08 г
Магния хлорид гексагидрат	0,08 г

Кальция хлорид безводный	0,112 г
Динатрия гидрофосфата дигидрат	0,0596 г
Калия дигидрофосфат безводный	0,048 г
Вода дистиллированная	до 800 мл
5. Сердечно-мозговой экстракт	
Экстракт телячьих мозгов	200 г
Экстракт говяжьего сердца	250 г
Протеозопептон	10 г
Глюкозы моногидрат	2 г
Натрия хлорид	5 г
Динатрия гидрофосфат безводный	2,5 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
6. Бульон для выявления <i>Pleuropneumonia</i> -подобных микроорганизмов (PPLO бульон)	
Экстракт говяжьего сердца	50 г
Пептон	10 г
Натрия хлорид	5 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
Среда Каган (рекомендована для общего обнаружения микоплазм)	
<i>Жидкая среда</i> (рекомендовано для выделения и культивирования микоплазм и как вспомогательную среду для накопления микоплазм).	
Гидролизат бычьего сердца	жидкий – 200 мл; сухой – 20 г
Мясная вода	400 мл
или мясной экстракт (3,0–3,5 % сухих веществ)	13,0 г
Дрожжевой экстракт (экстракт хлебопекарных дрожжей) (15 % сухих веществ)	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Феноловый красный (раствор 0,6 г/л)	5 мл
Вода	до 1000 мл
pH готовой среды после стерилизации	от 7,7 до 7,9

Полужидкую среду и плотную среду готовят так же, как жидкую среду, представленную выше, но с добавлением соответствующего количества агара: для полужидкой среды – 3,0 г агара на 1,0 л среды, для плотной среды – 13,0 г агара на 1,0 л среды.

Смешивают гидролизат бычьего сердца, мясной экстракт (или мясную воду), экстракт хлебопекарных дрожжей, натрия хлорид и воду очищенную. Доводят pH среды до значения от 8,0 до 8,2 с помощью 40 г/л *натрия гидроксида Р*. Среду кипятят в течение трех–пяти минут, фильтруют. С помощью раствора 103 г/л *кислоты хлороводородной Р* доводят pH до значения от 7,7 до 7,9. Среду разливают во флаконы и стерилизуют автоклавированием при температуре 110 °С в течение 30 мин. Готовые среды хранят при температуре от 2 до 8 °С не более 4 мес.

Перед применением полужидкую среду Каган и плотную среду Каган нагревают на водяной бане до полного расплавления и охлаждают до температуры 40–45 °С. Прибавляют 15 % – 20 % нормальной сыворотки крови лошади без консерванта, предварительно испытанной на стерильность и отсутствие контаминации микоплазмами. При испытании на аргининзависимые микоплазмы в среду Каган вносят стерильный раствор аргинина до конечной концентрации 1 %, при испытании на глюкозоферментирующие микоплазмы – стерильный раствор глюкозы до конечной концентрации 1 %.

МЕТОД ИНДИКАТОРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

Обнаружение различных видов микоплазм данным методом основано на способности флуоресцирующих красителей связываться и окрашивать ДНК микоплазм и клеток.

Микоплазмы обнаруживают преимущественно на поверхности и по границам клеток, а при значительной контаминации и в межклеточном пространстве, в виде однородно окрашенных частиц сферической формы диаметром от 0,1 до 0,3 мкм, или в виде парных, цепочечных, нитевидных образований с характерной флуоресценцией. Митохондрии в цитоплазме клеток также могут быть окрашены, но их легко отличить от микоплазм.

Если на интерпретацию результатов испытания вирусных суспензий влияют значительные цитопатические эффекты, то вирус может быть нейтрализован специфической иммунной сывороткой, не обладающей ингибирующим действием или может быть использована клеточная культура не поддерживающая рост данного вируса.

Для подтверждения отсутствия ингибирующего действия сыворотки проводят испытания положительного контроля в присутствии и в отсутствие специфической иммунной сыворотки.

ВЫБОР ИНДИКАТОРНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

В качестве индикаторной клеточной культуры, как правило, используют клетки линии *Vero* или другую культуру клеток (например, производственную клеточную линию), сопоставимую по чувствительности к микоплазмам. Пригодность используемых клеток проверяют, применяя процедуру, описанную ниже, инокулируя не более 100 КОЕ или КОЕ-подобных микроорганизмов подходящих референсных штаммов *M. hyorhinis* и *M. orale*, например:

- *M. hyorhinis* ATCC 29052;
- *M. orale* NCTC 10112, ATCC 23714;

Клетки считают пригодными, если обнаруживают оба референсных штамма микоплазм. Перед использованием необходимо провести один пересев и культивирование индикаторной клеточной культуры без антибиотиков.

МЕТОДИКА

1. Помещают в сосуд для культивирования суспензию клеток индикаторной культуры с подходящей концентрацией (например, от 2×10^4 до 2×10^5 клеток/мл или от 4×10^3 клеток/см² до $2,5 \times 10^4$ клеток/см²), которая обеспечивает формирование клеточного монослоя через трое суток. Прибавляют 1,0 мл испытуемого образца и инкубируют при температуре от 35 °C до 38 °C.

2. По истечении не менее трех суток инкубации, после формирования полного клеточного монослоя, проводят субкультивирование. Используют суспензию клеток индикаторной культуры с подходящей плотностью, которая обеспечивает формирование клеточного монослоя через 3–5 суток инкубации. Не допускают формирование полного клеточного монослоя, поскольку это затрудняет учет и интерпретацию результатов.

3. Удаляют культуральную среду и промывают клеточный монослой индикаторной культуры *фосфатным буферным раствором pH 7,4 P*, фиксируют подходящим раствором (например, спирт 96 °, или свежеприготовленная смесь: *уксусная кислота ледяная P–метанол P* в соотношении 1:3, если для окрашивания используют краситель *бисбензимида P*).

4. Удаляют фиксирующий раствор, промывают клеточный монослой стерильной *водой P* и высушивают, если окрашивание будет произведено более чем через 1 ч (необходимо избегать возможных дефектов монослоя после высыхания)

5. Окрашивают подходящим флуоресцентным красителем ДНК (например, при окрашивании *бисбензимида рабочим раствором P* подходящее время выдерживания составляет 10 мин).

6. Удаляют краситель и промывают клеточный монослой стерильной *водой P*.

7. При необходимости препараты обрабатывают смесью *глицерина Р* с *фосфатно-цитратным буферным раствором рН 5,5 Р* и исследуют с помощью люминесцентной микроскопии (для бисбензимидового красителя подходят фильтры 330/380 нм (возбуждения) и 440 нм (эмиссии)) при 400-х кратном или более увеличении. Количество необходимых для просмотра микроскопических полей зрения устанавливают при валидации.

УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов испытания на присутствие микоплазм проводят путем микроскопирования окрашенных препаратов в люминесцентном микроскопе. Положительными контрольными образцами могут служить контаминированные микоплазмами культуры клеток, а отрицательными – клеточные культуры, в которых микоплазмы не выявлены. Исследование микроскопической картины испытуемого образца и сравнение с картиной положительного и отрицательного контроля, позволяет идентифицировать внеядерную флуоресценцию микоплазм – контаминантов испытуемого образца. При отсутствии характерного для микоплазм флуоресцирующего свечения испытуемый образец считают прошедшим испытания. Обнаружение характерного для микоплазм флуоресцирующего свечения свидетельствует о контаминации испытуемого образца микоплазмами.

Испытание считается недействительным, если в положительном контроле не обнаруживают характерную для микоплазм флуоресценцию или в отрицательном контроле обнаруживают флуоресценцию характерную для микоплазм.

МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод амплификации нуклеиновых кислот можно использовать для обнаружения нуклеиновых кислот микоплазм, выделенных из испытуемых образцов с помощью специфических праймеров, которые выявляют целевую нуклеиновую кислоту. Амплификация нуклеиновых кислот указывает на присутствие целевой нуклеиновой кислоты, но не на наличие живых микоплазм. Доступно множество различных методик амплификации нуклеиновых кислот, поэтому настоящий раздел не предписывает конкретной методики для проведения данного теста. Используемая методика должна быть валидирована с учетом принципов, представленных в конце этого раздела. Если используют коммерческий набор, определенные элементы проверки могут быть выполнены производителем, и информация предоставлена пользователю. Следует учитывать, что полная информация о праймерах может быть недоступна, а производство набора может быть изменено или прекращено.

Метод амплификации нуклеиновых кислот применяют там, где это предписано в частной фармакопейной статье. Также его используют вместо культурального метода и метода индикаторной клеточной культуры после соответствующей валидации.

Прямую амплификацию нуклеиновых кислот применяют в случаях использования образцов, обладающих цитотоксичностью и в случае необходимости быстрого получения результатов испытания на присутствие микоплазм.

Метод обогащения клеточной культуры с последующей амплификацией нуклеиновых кислот заключается в совместном культивировании испытуемого образца и подходящего клеточного субстрата (как описано в методе индикаторной клеточной культуры) в течение подходящего времени, после чего нуклеиновые кислоты выделяют из клеток и супернатанта и используют для выявления с помощью амплификации нуклеиновых кислот.

ВАЛИДАЦИЯ

Стандартные образцы используют на различных этапах валидации и в качестве контроля при проведении испытания. В качестве стандартных образцов могут быть использованы микоплазмы или нуклеиновые кислоты.

С точки зрения частоты встречаемости в качестве контаминантов и филогенетических взаимосвязей следующие виды представляют собой оптимальный выбор для подтверждения предела обнаружения:

- *A. laidlawii*;
- *M. fermentans*;
- *M. hyorhinis* (в случаях обогащения клеточной культуры используют, например, штамм ATCC 29052);
- *M. orale*;
- *M. pneumonia* или *M. gallisepticum*;
- *M. synoviae* (в случае, если в процессе производства используется птичий материал или происходит контакт с ним);
- *Mycoplasma arginini*;
- *Spiroplasma citri* (при использовании или воздействии насекомых или растительного материала в процессе производства).

Для демонстрации специфичности рекомендовано использовать подходящие спектры видов бактерий, отличных от микоплазм. Наиболее подходящие для верификации роды микроорганизмов, близкие филогенетически к микоплазмам это клостридии, лактобактерии и стрептококки.

Сравнительные испытания для изучения амплификации нуклеиновых кислот в качестве альтернативного метода.

Для каждого тестируемого вида микоплазмы:

- в качестве альтернативы культуральному методу: тест-система для амплификации нуклеиновых кислот должна обнаруживать 10 КОЕ/мл;
- в качестве альтернативы методу индикаторной клеточной культуры: тест-система для амплификации нуклеиновых кислот должна обнаруживать 100 КОЕ/мл.

Для сравнительных испытаний эквивалентный предел обнаружения определяют с учетом количества копий нуклеиновых кислот микоплазмы в испытуемом образце, используя подходящие стандартные образцы микоплазм. Для сравнения эффективности альтернативного метода амплификации нуклеиновых кислот с эффективностью культурального метода и метода индикаторной клеточной культуры должно быть предварительно установлено соотношение между КОЕ и копиями нуклеиновых кислот для стандартных образцов.

КОНТРОЛЬ

Внутренние контроли необходимы для проверки отсутствия ингибирования. Образец для внутреннего контроля может содержать сайт связывания праймера, может быть использована какая-либо другая подходящая последовательность. Его преимущественно прибавляют к испытуемому образцу перед выделением нуклеиновой кислоты и, следовательно, он действует как общий контроль (при экстракции, обратной транскрипции, амплификации, детекции).

Внешние контроли. Образец для внешнего положительного контроля содержит определенное количество копий последовательностей нуклеиновых кислот или КОЕ из одного или более подходящих штаммов микоплазм, выбранных из использованных при валидации условий испытания. Один из положительных контролей устанавливают близко к точке отсечки, чтобы продемонстрировать, что ожидаемая чувствительность достигнута. Образец для внешнего отрицательного контроля не содержит целевые последовательности нуклеиновых кислот и не обязательно представляет ту же самую матрицу, что и в испытуемом образце.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используемые праймеры могут также амплифицировать нуклеиновые кислоты бактерий, не относящихся к микоплазмам, что приводит к ложно-положительным результатам. При валидации устанавливают процедуры для подтверждения положительных результатов, если необходимо.

Следующий раздел приводится для информации

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДОВ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ МИКОПЛАЗМ

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Амплификацию нуклеиновых кислот используют при качественном и количественном выявлении присутствия нуклеиновых кислот. Для обнаружения контаминации микоплазмами различных испытуемых образцов таких, как вакцины и клеточные субстраты подходят качественные методы, которые могут расцениваться как тесты на предельное содержание микоплазм. Данные рекомендации описывают валидацию процедур проведения качественной оценки контаминации микоплазмами. Они также могут быть применены для метода амплификации нуклеиновых кислот, используемого в качестве испытания на предельное содержание микоплазм.

Такие характеристики, как специфичность и предел обнаружения, рассматривают как наиболее важные для валидации аналитической процедуры. Необходимо оценивать робастность аналитической процедуры.

Описываемые ниже требования к валидации применимы к методике амплификации нуклеиновых кислот, включающей все этапы от экстракции нуклеиновой кислоты до обнаружения продуктов амплификации.

В случае использования коммерческих наборов для части или всей аналитической процедуры документально подтвержденная производителем валидация может заменить процедуру валидации пользователя. Перед проведением испытания пользователь должен оценить эффективность коммерческого набора (например, предел обнаружения, робастность, перекрестное обнаружение других классов бактерий).

Амплификация нуклеиновых кислот может быть использована как:

- дополнительный тест (например, для вирусной биомассы, обладающей цитотоксичностью) или для целей контроля в процессе производства;
- альтернативный метод при замене метода индикаторной клеточной культуры или культурального метода.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВАЛИДАЦИИ МЕТОДА АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МИКОПЛАЗМЫ

Определяют специфичность, предел обнаружения и надежность метода.

Специфичность.

Специфичность – это способность однозначно выявлять целевую нуклеиновую кислоту в присутствии компонентов, присутствие которых можно ожидать.

Специфичность амплификации нуклеиновых кислот зависит от выбора праймеров, выбора образцов для испытания финального продукта и строгости условий испытания, как для этапов амплификации, так и для детектирования.

Способность метода амплификации нуклеиновых кислот выявлять большую группу штаммов микоплазм зависит от выбора праймеров, проб и параметров метода. Готовые наборы для амплификации нуклеиновых кислот обычно содержат смеси праймеров. Теоретический анализ праймеров и проб путем сравнения с базами данных не рекомендовано, так как интерпретация результатов может быть затруднительна и может не отражать результаты экспериментов.

Праймеры могут обнаруживать другие виды бактерий, что должно быть задокументировано в валидационном исследовании. Выбор штамма для испытания

основан на последовательностях праймеров или зондов и зависит от теоретической способности наборов для амплификации нуклеиновых кислот выявлять штаммы, филогенетически близкие к микоплазмам. Наиболее подходящими для данной валидации являются грамположительные бактерии родов клостридии, лактобактерии и стрептококки.

Если в ходе валидационного исследования специфичности обнаружена немикоплазменная бактериальная нуклеиновая кислота, должна быть предложена соответствующая стратегия, позволяющая интерпретировать полученные результаты. Например, должен быть проведен второй тест с использованием культурального метода или метода индикаторной клеточной культуры.

Предел обнаружения.

Предел обнаружения методики это наименьшее количество целевой нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть обнаружено без необходимости определения ее точного количества.

Для установления предела обнаружения для аналитической процедуры амплификации нуклеиновых кислот должна быть определена положительная точка отсечения. Положительная точка отсечения – это минимальное количество копий целевой последовательности на объем образца, которое может быть обнаружено в 95 % тестовых запусков. На эту положительную точку отсечения влияет распределение геномов микоплазмы в отдельных тестируемых образцах и такой фактор, как эффективность фермента, и это может привести к различным 95 % пороговым значениям для отдельных аналитических тестов.

Чтобы определить положительную точку отсечения, следует протестировать серию разведений охарактеризованных и откалиброванных (либо в КОЕ, либо в копиях нуклеиновых кислот) собственных рабочих штаммов в разные дни для изучения различий между тестовыми прогонами.

Для подтверждения предела обнаружения оптимальный выбор, с точки зрения частоты встречаемости в качестве контаминантов и филогенетических взаимосвязей, представляют собой следующие виды:

- *A. laidlawii*;
- *M. fermentans*;
- *M. hyorhinis*;
- *M. orale*;
- *M. pneumonia* или *M. gallisepticum*;
- *M. synoviae* (где в процессе производства используется птичий материал или происходит контакт с ним);
- *Mycoplasma arginini*;
- *Spiroplasma citri* (при использовании или воздействии насекомых или растительного материала в процессе производства).

Для каждого штамма должны быть протестированы не менее трех независимых серий 10-кратных разведений, с достаточным количеством повторений в каждом разведении, чтобы получить в общей сложности 24 результата для каждого разведения, что позволит провести статистический анализ результатов.

Например, лаборатория может протестировать три серии разведений в разные дни с восемью повторами для каждого разведения, четыре серии разведений в разные дни с шестью повторениями для каждого разведения или шесть серий разведений в разные дни с четырьмя повторениями для каждого разведения. Чтобы поддерживать количество разведений на приемлемом уровне, следует провести предварительный тест для получения предварительного значения положительной точки отсечения (т.е. максимального разведения, дающего положительный сигнал). Концентрация микоплазм (КОЕ или копии), которые могут быть обнаружены в 95 % тестовых запусков, затем может быть рассчитана с использованием соответствующей статистической оценки.

Эти результаты могут также служить для оценки вариативности аналитической процедуры.

Робастность

Робастность аналитической процедуры является мерой ее способности оставаться незатронутой незначительными изменениями параметров метода, что является показателем ее надежности при обычном использовании. Оценка робастности должна быть рассмотрена на этапе разработки. Метод должен показывать робастность аналитической процедуры в отношении намеренных изменений параметров метода. Для метода амплификации нуклеиновых кислот небольшие изменения в параметрах метода могут иметь решающее значение. Однако робастность метода может быть продемонстрирована в ходе его разработки, когда тестируются небольшие вариации концентраций реагентов (например, магния хлорида, праймеров или дезоксирибонуклеотидов). Также могут быть оценены модификации наборов для экстракции или процедур экстракции и различные типы термоциклеров.

Робастность метода может быть оценена с помощью межлабораторных испытаний.

РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Метод амплификации нуклеиновых кислот используют вместо метода индикаторных клеточных культур и/или культурального метода. В этом случае следует провести исследование сопоставимости. Исследование сопоставимости должно включать в себя, главным образом, сравнение соответствующих пределов обнаружения альтернативного метода и официальных методов. Однако следует также учитывать специфичность (обнаружение штаммов микоплазм, предполагаемые ложноположительные результаты (штаммов контаминантов)). Критерии приемлемости предела обнаружения определяют следующим образом:

- если предполагают использовать альтернативный метод для замены культурального метода, необходимо продемонстрировать, что система амплификации нуклеиновых кислот обнаруживает 10 КОЕ/мл для каждого тестируемого вида микоплазмы, описанного в подразделе *Предел обнаружения* данной общей фармакопейной статьи;

- если предполагают использовать альтернативный метод для замены метода индикаторных клеточных культур, необходимо продемонстрировать, что система амплификации нуклеиновых кислот обнаруживает 100 КОЕ/мл для каждого тестируемого вида микоплазмы, описанного в подразделе *Предел обнаружения* данной общей фармакопейной статьи.

В обоих случаях для подтверждения достижения критериев приемлемости могут быть использованы подходящие стандартные образцы, откалиброванные по количеству копий нуклеиновых кислот и количеству КОЕ. Соотношение между КОЕ и копиями нуклеиновых кислот для стандартных образцов должно быть предварительно установлено, чтобы сравнить эффективность альтернативного метода амплификации нуклеиновых кислот с эффективностью культурального метода или метода индикаторной клеточной культуры.

Для проведения исследования сопоставимости можно использовать одну из следующих двух стратегий:

- выполняют альтернативный метод амплификации нуклеиновых кислот параллельно культуральным методом или методом индикаторной клеточной культуры, чтобы одновременно оценить предел обнаружения обоих методов, используя одни и те же образцы штаммов микроорганизмов;

- сравнивают производительность альтернативного метода амплификации нуклеиновых кислот, используя ранее полученные данные из официальной валидации метода. В этом случае калибровка стандартных образцов, используемых для обеих проверок, а также их стабильность должны быть тщательно задокументированы.

Отчеты об испытаниях сопоставимости должны включать описание всех элементов валидации, описанных в подразделе *Рекомендации по валидации метода амплификации нуклеиновых кислот микоплазмы* данной общей фармакропейной статьи (специфичность, предел обнаружения, вариабельность, а также робастность), чтобы оценить все преимущества и (или) недостатки альтернативного метода амплификации нуклеиновых кислот по сравнению с культуральным методом или методом индикаторной клеточной культуры.