УДК 615.07:579.887:604
https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107

Оригинальная статья | Original article

Check for updates

CC BY 4.0

Стандартизация микробиологического метода выявления микоплазменной контаминации в биологических лекарственных препаратах: разработка стандартного образца *Acholeplasma laidlawii* PG8

С.М. Суханова ✉, З.Е. Бердникова, О.В. Фадейкина

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

✉ *Суханова Светлана Михайловна; suhanovasm@expmed.ru*

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Выявление микоплазм является одной из наиболее сложных проблем при контроле микробной контаминации биологических лекарственных препаратов (БЛП). Для обнаружения микоплазм в БЛП и стандартизации микробиологического метода контроля необходимы высокочувствительные питательные среды и фармакопейные стандартные образцы (ФСО) тест-штаммов различных видов микоплазм.

ЦЕЛЬ. Разработка и аттестация нового фармакопейного стандартного образца *Acholeplasma laidlawii* PG8 для проведения испытаний биологических лекарственных препаратов на присутствие микоплазм микробиологическим методом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Разработку ФСО проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) с использованием штамма *A. laidlawii* PG8 (ГКПМ 930002, ATCC 23206, NCTC 10116), питательной среды Каган, сыворотки крови лошади. Аттестация ФСО включала определение значения титра штамма *A. laidlawii* PG8 методом наиболее вероятных чисел и испытания по следующим показателям качества: «Описание», «Наличие вакуума», «Время растворения», «Внешний вид растворенного образца», «Стерильность», «Потеря в массе при высушивании», «Однородность массы (средняя масса и отклонение от средней массы)».

РЕЗУЛЬТАТЫ. Проведена разработка ФСО *A. laidlawii* PG8 и составлена спецификация ФСО. Приготовлены лиофилизированные образцы основного и рабочего банков культуры *A. laidlawii* PG8. Установлено, что процедура лиофилизации не оказывает существенного воздействия на жизнеспособность штамма. Показана стабильность значений титра штамма (10^8 КОЕ/мл), культуральных и физико-химических свойств образцов по критически важным для обеспечения качества и надежности показателям в течение двух лет хранения при температуре минус 20–30°C. Аттестованы три серии ФСО *A. laidlawii* PG8. Значения титра серий ФСО варьировались от $10×10^8$ до $21×10^8$ КОЕ/мл. Показана сопоставимость разработанного ФСО со стандартным образцом Европейской фармакопеи BRP *A. laidlawii*, серия 1 (титр $2{,}45×10^6$ КОЕ/мл). На основании результатов исследований ФСО *A. laidlawii* PG8 включен в Реестр ФСО ГФ РФ.

ВЫВОДЫ. Разработан и аттестован новый ФСО *A. laidlawii* PG8. ФСО может быть использован для оценки ростовых свойств питательных сред, определения наличия ингибирующего действия, а также в качестве положительного контроля при испытаниях БЛП и биологических материалов, применяемых в их производстве, на присутствие микоплазм микробиологическим методом согласно требованиям ГФ РФ. Внедрение ФСО будет способствовать стандартизации и повышению качества контроля БЛП, а также гармонизации требований ГФ РФ с международными стандартами.

© С.М. Суханова, З.Е. Бердникова, О.В. Фадейкина, 2026
Издатель ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Ключевые слова: микоплазмы; *Acholeplasma laidlawii*; микробная контаминация; биологические лекарственные препараты; контроль качества; стандартный образец; ФСО; микробиологический метод; питательная среда; стандартизация; гармонизация

Для цитирования: Суханова С.М., Бердникова З.Е., Фадейкина О.В. Стандартизация микробиологического метода выявления микоплазменной контаминации в биологических лекарственных препаратах: разработка стандартного образца *Acholeplasma laidlawii* PG8. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2026;26(1):97–107. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).
Потенциальный конфликт интересов. Фадейкина О.В. является членом редакционной коллегии журнала *«БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение»* с 2025 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Standardizing microbiological method to detect mycoplasma contamination in biological products: development of *Acholeplasma laidlawii* PG8 reference standard

Svetlana M. Sukhanova ✉, **Zinaida E. Berdnikova**, **Olga V. Fadeikina**

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

✉ *Svetlana M. Sukhanova; suhanovasm@expmed.ru*

ABSTRACT

INTRODUCTION. Mycoplasmas are one of the most challenging types of microbial contamination to detect in biological products (BP). Detecting micoplasmas in the BPs and standardizing microbiological control method necessitates highly sensitive culture media and pharmacopeial reference standards (RS) for test strains of various mycoplasmas.

AIM. This study aimed to develop and certify the new pharmacopeial reference standard *Acholeplasma laidlawii* PG8 for mycoplasma identification in the BPs using the microbiological method.

MATERIALS AND METHODS. *A. laidlawii* PG8 (NCPM 930002, ATCC 23206, NCTC 10116) strain, Kagan's medium, and horse serum was used to develop the reference standard in compliance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (SP RF). The certification included determination of strain titre by the most probable number method and quality tests for: Description, Vacuum, Reconstitution time, Description of dissolved sample, Sterility, Loss on drying, and Mass homogeneity (average mass and average deviation).

RESULTS. Development and specification of *A. laidlawii* PG8 reference standard was completed. Lyophilised samples of the master and working bank of *A. laidlawii* PG8 strain culture were prepared. It was established that the lyophilization process does not significantly affect strain viability. The stability of strain titers (10^8 CFU/mL), cultural, and physicochemical properties of the samples was demonstrated for critical quality and reliability indicators during two years of storage at -20 to -30°C. Three batches of *A. laidlawii* PG8 RS were certified. The calculated titer values ranged from 10×10^8 to 21×10^8 CFU/mL. The pharmacopoeial reference standard is found to be comparable to the European Pharmacopoeia reference standard *A. laidlawii* BRP, batch 1 (titer 2.45×10^6 CFU/mL). As a result of the conducted research, *A. laidlawii* PG8 RS was included in the Register and Collection of Reference Standards of the Russian Pharmacopoeia.

CONCLUSIONS. A new *A. laidlawii* PG8 reference standard has been developed and certified that can be used to evaluate the nutritive properties of culture media; determine the inhibitory effects; and serve as a positive control in BP and material tests for the presence of mycoplasmas using the microbiological method in accordance with SP RF requirements. Introducing the new RS will contribute to standardization and improve BP control, as well as harmonization of the Russian compendial requirements with the international standards.

Keywords: mycoplasma; *Acholeplasma laidlawii*; microbial contamination; biological products; quality control; reference standard; pharmacopoeial reference standard; microbiological method; culture media; standardization; harmonization

For citation: Sukhanova S.M., Berdnikova Z.E., Fadeikina O.V. Standardizing microbiological method to detect mycoplasma contamination in biological products: development of *Acholeplasma laidlawii* PG8 reference standard. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(1):97–107. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00061-26-00 (R&D Registry No. 124022200103-5).
Disclosure. O.V. Fadeikina has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2025. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Надежность и достоверность выявления микоплазменной контаминации на всех этапах производства биологических лекарственных препаратов (БЛП) необходимы для обеспечения их качества и безопасности. Микоплазмы способны инфицировать клеточные культуры и вакцинные препараты, изменяя характеристики культуры, используемой для производства вакцин, и конечного продукта, что обусловливает необходимость применения особых приемов для их выявления[1] [1–6].

Государственная фармакопея Российской Федерации (ГФ РФ)[2], Европейская фармакопея[3], Фармакопея США[4], Британская[5], Индийская[6] и Китайская фармакопеи[7] рекомендуют для обнаружения микоплазм в загрязненных клеточных субстратах и вирусных штаммах применять метод прямого культивирования и метод индикаторной клеточной культуры. Международные экспертные организации, включая Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ)[8], Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency)[9], Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)[10], рассматривают метод прямого культивирования как основной для тестирования банка клеток, посевной партии вирусов, контрольных клеточных культур, контроля вирусного сбора, нерасфасованной (bulk) партии или готовой серии вакцины[11] [4].

Проведение испытаний предполагает использование питательных сред, характеристики которых зависят от качества биологических компонентов, что влияет на результаты. Поэтому обязательным условием испытаний является достаточный рост штаммов микоплазм на выбранной питательной среде (ПС). Используемые микроорганизмы должны представлять распространенные виды-контаминанты клеточных культур [7]: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. pneumonia*, *M. synoviae*. Для адекватной оценки исследуемых образцов в качестве тест-штаммов рекомендуется применять микроорганизмы, выделенные из патогенного материала, или использовать соответствующие фармакопейные стандартные образцы (ФСО), например стандартные образцы (СО) биологических препаратов Европейской фармакопеи (biological reference preparations, BRP)[12] с ограниченным числом пассажей [8]. Стандартизация методов контроля

1 ГОСТ Р 70610-2022. Национальный стандарт Российской Федерации. Яйца куриные инкубационные для иммунобиологических производств. Технические условия.
2 ОФС.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. 11th ed. Suppl. 11.5; 2024.
4 <63> USP 46–NF41 Mycoplasma tests. United State Pharmacopeia; 2025.
5 Test for absence of mycoplasmas. British Pharmacopoeia. Vol. 1; 2024.
6 2.7.4. Test for absence of mycoplasmas. Indian Pharmacopoeia. Vol. 1; 2022.
7 3301 Test for mycoplasma. Pharmacopoeia of the Peoples' Republic of China. Vol. III; 2020.
8 Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards, Annex 2, TRS No 932. WHO; 2004.
9 VICH GL34: Biologicals: testing for the detection of Mycoplasma contamination (EMA/CVMP/VICH/463/2002). EMA; 2013.
10 Руководства ICH для фармацевтической отрасли. Качество: практическое руководство. СПб: ЦОП «Профессия»; 2017.
11 ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.
2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia. 11th ed. Suppl. 11.5; 2024.
<63> USP46-NF41 Mycoplasmas. United State Pharmacopeia; 2025.
12 Ph. Eur. Reference Standard – LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf

БЛП и материалов, используемых в процессе их производства, представляет собой эффективный способ обеспечения качества и безопасности выпускаемого продукта[13]. Применение СО для оценки пригодности ПС и определения наличия антимикробного действия самого БЛП позволяет повысить сопоставимость и воспроизводимость результатов для более полной и объективной оценки качества, а также упростить процедуру анализа.

Согласно требованиям ГФ РФ для проведения испытания на присутствие микоплазм рекомендовано использовать СО штаммов, прежде всего *Mycoplasma arginini* G230, или, в зависимости от типа испытуемого препарата, другие виды микоплазм[14], которые на российском рынке отсутствуют. Ранее авторы обосновали необходимость расширения спектра новых СО штаммов, включая широко распространенный штамм, ферментирующий D-глюкозу, и устойчивый к антибиотикам *A. laidlawii* [9].

Создание новых российских ФСО тест-штаммов микоплазм в условиях ограниченного доступа к зарубежным СО является актуальной задачей. Ее решение позволит усовершенствовать существующую методику испытаний и гармонизировать требования ГФ РФ с международными стандартами.

Цель работы — разработка и аттестация нового фармакопейного стандартного образца *Acholeplasma laidlawii* PG8 для проведения испытаний БЛП на присутствие микоплазм микробиологическим методом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали штамм *A. laidlawii* PG8 (ГКПМ 930002, ATCC 23206, NCTC 10116) из коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), полученный из лаборатории микоплазм и L-форм бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (штамм предоставлен Aarhus University, Дания). Использовали лиофилизированные образцы серии «0» (основной банк) и трех рабочих серий кандидата в ФСО — тест-штамма *A. laidlawii* PG8 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); питательные среды: жидкую и полужидкую Каган (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), согласно требованиям ГФ РФ[15]; сыворотку крови лошади нормальную для культивирования микоплазм (кат. № 1.1.5.2, ООО «БиолоТ», Россия); ФСО.3.2.00378 *M. arginini* 230 с действующим сроком годности (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России); стандартный образец Европейской фармакопеи BRP *A. laidlawii,* серия 1[16].

Оборудование

Использовали аттестованное оборудование: термостат ТС-1/20 СПУ («Смоленское СКТБ СПУ», Россия); термошкаф (инкубатор) тип В 115 (Binder GmbH); шкаф ламинарный II класса БАВп-01-1,2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия); морозильная камера «Саратов 127» (ООО «СЭПО-ЗЭМ», Россия); дозатор пипеточный с переменным объемом доз, одноканальный (ДПОПц-1-10-5000, ООО «Ленпипет», Россия).

Методы

Лиофилизацию культуры штамма *A. laidlawii* PG8 проводили на аппарате Epsilon 2-4 LSCplus (Martin Christ, Германия). Образцы хранили при температуре минус 20–30°C.

Качество лиофилизированных образцов оценивали по следующим показателям:

- «Описание», «Время растворения» и «Внешний вид восстановленного образца» — визуально;
- «Наличие вакуума» (в упаковке для контроля попадания воздуха и предотвращения ухудшения свойств культуры) — визуально в поле высокочастотного разряда[17];
- «Стерильность» (отсутствие посторонней микрофлоры) — методом прямого посева[18];
- **«**Потеря в массе при высушивании» — весовым методом[19];
- **«**Однородность массы (средняя масса и отклонение от средней массы)» — весовым методом[20] (для оценки точности проводимого розлива, косвенно показывающего равномерность распределения клеток между экземплярами серии).

[13] ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).
[14] ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
[15] Там же.
[16] Ph. Eur. Reference Standard — LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf
[17] ОФС.1.8.1.0002 Иммунобиологические лекарственные препараты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.
[18] ОФС.1.2.4.0003.15 Стерильность. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.
[19] ОФС.1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.
[20] ОФС.1.4.2.0009 Однородность массы дозированных лекарственных форм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

Значение титра (количественный показатель концентрации живых клеток) определяли на полужидкой ПС методом наиболее вероятных чисел (НВЧ), используя десятикратные разведения. Каждое разведение высевали в три пробирки и инкубировали при температуре 37±1°C в течение 7 сут. Регистрировали предельные контрольные разведения, в которых отмечали наличие роста микоплазм, принимая их за значение титра. Расчет титра проводили методом предельных разведений с использованием таблицы Мак-Креди[21]. При аттестации титр штамма серии «0» (основной банк) устанавливали посевом 10 образцов на двух партиях ПС, а трех рабочих серий — посевом 5 образцов с последующим расчетом среднего арифметического значения КОЕ/мл.

Критерии приемлемости результатов значения титра. С учетом специфики методики и изменчивого состава ПС значения коэффициента титра в пределах одного порядка (например, $2{,}5\times10^8$, $4{,}5\times10^8$) считали сопоставимыми. Анализ проводили по значениям контрольных разведений (не менее 10^7) без учета коэффициента.

Оценку стабильности образцов проводили после лиофилизации и через 6, 12, 18 и 24 мес. хранения при температуре минус 20–30°C.

Ростовые свойства питательных сред определяли согласно требованиям ГФ РФ[22] с использованием ФСО.3.2.00378 *M. arginini* 230.

Статистическая обработка результатов. Рассчитывали среднее арифметическое значение ($X_{ср}$) НВЧ микроорганизмов и относительное стандартное отклонение [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

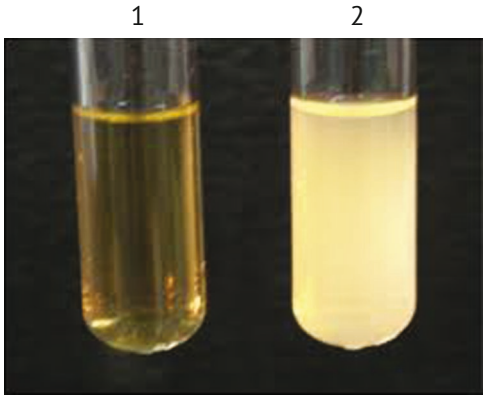
Анализ стандартного образца Европейской фармакопеи A. laidlawii

С учетом значимости Европейской фармакопеи для гармонизации российских фармакопейных стандартов в работе были определены основные характеристики BRP *A. laidlawii*[23]. Экспертный совет Европейской фармакопеи рекомендовал его в качестве тестового микроорганизма для проверки ростовых свойств ПС при испытании методом прямого посева, особенно для вакцин, в производстве которых использовались антибиотики[24]. Установлено, что BRP *A. laidlawii*, серия 1, представляет собой замороженную суспензию штамма, прошедшего менее 15 пассажей от исходного клона, выделенного из культуры кератиновых клеток [8]. Предполагаемый расчетный титр серии составляет $2{,}45\times10^6$ КОЕ/мл, с допустимым диапазоном от $3{,}89\times10^5$ до $1{,}55\times10^7$ КОЕ/мл, в условиях хранения при температуре не выше минус 60°C. При подготовке к испытанию в образце подтверждают титр и используют установленное разведение (согласно Европейской фармакопее, не более 100 КОЕ) для посева на ПС.

Приготовление и изучение свойств образцов штамма A. laidlawii PG8 серии «0» — кандидата в ФСО

Для получения серии кандидата в ФСО лиофилизированную культуру штамма *A. laidlawii* PG8 (ГКПМ 930002, ATCC 23206, NCTC 10116) инкубировали в ПС с сывороткой крови лошади при температуре 37±1°C. Через 24–48 ч наблюдали микробный рост, характеризующийся незначительным помутнением и равномерной опалесценцией среды по сравнению с прозрачной контрольной средой . Морфологические свойства соответствовали паспортным данным штамма[25].

Для накопления биомассы культуру инкубировали до 4 сут, отмечая при этом увеличение помутнения *(рис. 1)*. Затем полученную суспензию разделяли на аликвоты объемом 1 мл и подвергали лиофилизации. Приготовленные



Фотография выполнена авторами / The photograph was taken by the authors

Рис. 1. Рост штамма *A. laidlawii* PG8 серии «0» на жидкой питательной среде Каган: 1 — контроль (незасеянная среда), 2 — культура *A. laidlawii* PG8.

Fig. 1. Growth of *A. laidlawii* PG8 strain (series "0") on liquid Kagan's medium: 1, control (uninoculated medium), 2, *A. laidlawii* PG8 culture.

[21] ГОСТ 54653-2011. Удобрения органические. Методы микробиологического анализа.
[22] ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
[23] Ph. Eur. Reference Standard — LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf
[24] 2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia. 11th ed. Suppl. 11.5; 2024.
[25] Паспорт штамма *Acholeplasma laidlawii* ГКПМ 930002. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

образцы герметизировали и хранили при температуре минус 20–30°С. Изучали морфологические свойства и определяли титр образцов штамма до и после лиофилизации согласно ГФ РФ на полужидкой ПС Каган[26]. Значения титра, рассчитанного на двух партиях ПС до и после лиофилизации, представлены в *таблицах 1* и *S1* (опубликована на сайте журнала[27]).

Для оценки влияния лиофилизации на концентрацию штамма проведен сравнительный анализ титра для исходного образца и образца, подвергшегося процедуре лиофилизации. Анализ показал незначительные различия полученных значений в пределах одного порядка: от $2{,}5\times10^8$ до $15{,}0\times10^8$ КОЕ/мл до лиофилизации и от $5{,}2\times10^8$ до $9{,}3\times10^8$ КОЕ/мл после лиофилизации *(табл. 1, S1)*. Это свидетельствует о приемлемости и сходимости полученных результатов. При оценке влияния среды (две партии ПС) показана стабильность среднего значения НВЧ на уровне около 108 КОЕ/мл. Рост микоплазм наблюдался при максимальных разведениях 10^{-8}–10^{-9}, что свидетельствовало о минимальном влиянии лиофилизации на жизнеспособность культуры.

Лиофилизированные образцы были дополнительно охарактеризованы по показателям «Потеря в массе при высушивании» и «Однородность массы». Значение показателя «Потеря в массе при высушивании» составило 3,53% при норме не более 5%[28]. Однородность массы, оцененная как относительное стандартное отклонение от средней массы образца, была равна 1,62% при средней массе образца 1,0042±0,0163 г[29]. Полученные результаты подтвердили соответствие лиофилизатов требованиям ГФ РФ[30].

При изучении воздействия условий хранения на устойчивость характеристик культуры было установлено, что после 6 мес. хранения при температуре минус 20–30°С параметры образцов оставались сопоставимы с исходными. Титр сохранился на уровне 15×10^8 КОЕ/мл *(табл. S2,* опубликована на сайте журнала[31]). Среднее содержание клеток в 1 мл культуры варьировало в узком диапазоне в пределах 10^8, что свидетельствовало об однородности суспензии, точности розлива и высокой выживаемости культуры *A. laidlawii* PG8. Расчет титра образцов серии «0» после 6 мес. хранения представлен в *таблице S2*.

Анализ показателей качества образцов серии «0», включая сохранение концентрации микробных клеток на уровне 10^8–10^9 КОЕ/мл в течение

Таблица 1. Определение титра штамма *A. laidlawii* PG8 серии «0» по таблице Мак-Креди (до лиофилизации)
Table 1. Titre determination of *A. laidlawii* PG8 strain, batch "0", using McCrady's table (prior to lyophilisation)

Номер пробирки *Test tube number*	**Разведение** *Dilution*	**Наличие роста *A. laidlawii* PG8 на 7 сут инкубации (три повторности)** *Growth of the A. laidlawii PG8 on Day 7 of incubation (in triplicate)*	
		Партия среды 79 *Medium batch 79*	**Партия среды 154** *Medium batch 154*
1–8	10^{-1}–10^{-8}	+ + +	+ + +
9	10^{-9}	– – –	+ + –
10	10^{-10}	– – –	– – –
Предельное разведение *Limiting dilution*		10^{-8}	10^{-9}
Числовая характеристика (Мак-Креди) *Numerical interpretation (McCrady)*		300	320
НВЧ в трех повторностях, КОЕ/мл *MPN in triplicate, CFU/mL*		$2{,}5\times10^8$	$15{,}0\times10^8$
Среднее арифметическое НВЧ, КОЕ/мл *MPN arithmetic mean, CFU/mL*		$8{,}7\times10^8$	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. «+» — наличие роста микоплазм; «–» — отсутствие роста микоплазм; НВЧ — наиболее вероятное число; КОЕ — колониеобразующая единица.
Note. +, growth of mycoplasmas; –, no growth of mycoplasmas; MPN, most probable number; CFU, colony-forming unit.

[26] ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
[27] https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s1
[28] ОФС. 1.2.1.0010.15 Потеря в массе при высушивании. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.
[29] ОФС.1.4.2.0009 Однородность массы дозированных лекарственных форм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.
[30] ОФС.1.4.1.0031 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.
[31] https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s2

6 мес. хранения, и сравнение с характеристиками BRP *A. laidlawii,* серия 1[32], позволили установить ключевые критерии оценки качества СО. На основании этого разработана спецификация и изготовлены три рабочие серии образцов из серии «0» (основной банк штамма *A. laidlawii* PG8) для дальнейших исследований стабильности.

Разработка спецификации ФСО A. laidlawii PG8

С учетом российских и международных требований к СО БЛП и лиофилизатам[33] [11, 12], опыта аттестации и применения ФСО.3.2.00378 *M. arginini* 230 [9, 13], а также характеристик BRP *A. laidlawii*[34], авторами были установлены требования к показателям качества и составлена спецификация ФСО ГФ РФ *A. laidlawii* PG8. В спецификацию включены методы анализа, нормы и критические показатели для оценки качества образцов и проведения их аттестации на соответствие требованиям к ФСО *(табл. 2)*.

Дальнейшую аттестацию и оценку образцов проводили согласно разработанной спецификации.

Приготовление рабочих серий штамма A. laidlawi PG8 и аттестация кандидатов в ФСО

Рабочие серии получали из образцов основного банка после 6 мес. хранения по аналогичной процедуре. При высеве разведений 10^{-1}–10^{-9} на полужидкую ПС образцов всех трех серий через 96 ч (4 сут) инкубации наблюдали характерный рост в виде колоний светло-желтого цвета как в зоне посева, так и по всей глубине ПС, соответствующий паспортным данным и культуральным свойствам образцов основного банка *(рис. 2)*.

В рамках аттестации образцы трех рабочих серий были проанализированы по параметрам спецификации. Результаты аттестации показали их сопоставимость и воспроизводимость, в первую очередь по титру штамма *(табл. 3)*.

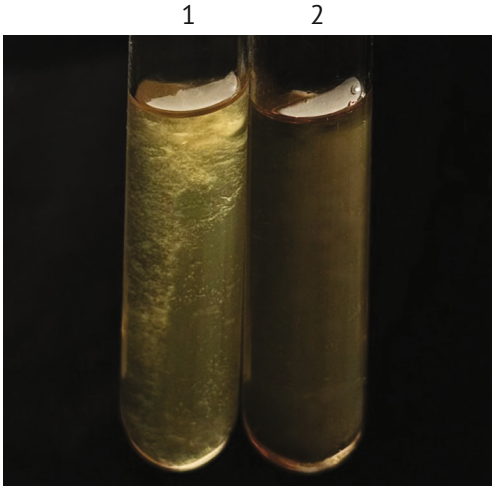
Оценка значения титра до и после лиофилизации подтвердила незначительное влияние процедуры на устойчивость культуры *A. laidlawii* PG8 *(табл. 4)*.

Для проверки пригодности полученных образцов согласно процедуре, принятой в Европейской фармакопее [8], образцы были переданы на экспертизу в независимую лабораторию (Департамент контроля качества ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» ФМБА России). Результаты экспертизы подтвердили полное соответствие качества образцов рабочей серии 1 заявленным требованиям спецификации: выявление характерного роста тест-штамма после инкубации рабочих разведений на полужидкой среде Каган в течение 7 сут при температуре 37±1°С.

В связи с отсутствием отклонений от установленных нормативных требований, серии были признаны пригодными в качестве ФСО для исследования стабильности.

Изучение стабильности свойств образцов основного банка и рабочих серий тест-штамма A. laidlawii PG8

Стабильность лиофилизированных образцов основного банка и трех рабочих серий *A. laidlawii* PG8 оценивали после 6, 12, 18 и 24 мес. хранения при температуре минус 20–30°С на пяти случайно отобранных образцах каждой серии *(табл. 4)*. Условия хранения не оказали значимого влияния на культуральные свойства.



Фотография выполнена авторами / The photograph was taken by the authors

Рис. 2. Рост штамма *A. laidlawii* PG8 рабочей серии 1 на полужидкой питательной среде Каган: 1 — культура *A. laidlawii* PG8, 2 — контроль (незасеянная среда).

Fig. 2. Growth of *A. laidlawii* PG8 strain (working bank batches 1) on semi-liquid Kagan's medium: 1, *A. laidlawii* PG8 culture, 2, control (uninoculated medium).

[32] Ph. Eur. Reference Standard — LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf

[33] Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. TRS No 932. WHO; 2004.
ГОСТ ISO Guide 35-2015. Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации).
ОФС.1.4.1.0031 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд.; 2023.

[34] Ph. Eur. Reference Standard — LEAFLET. *Acholeplasma laidlawii* BRP batch 1. https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000693_1.pdf

Таблица 2. Спецификация фармакопейного стандартного образца *A. laidlawii* PG8
Table 2. Specification of *A. laidlawii* PG8 reference standard

Показатель *Parameter*	Метод *Method*	Норма *References*
Описание (внешний вид) лиофилизата *Description before reconstitution*	Визуальный *Visual*	Лиофилизированная мелкопористая масса светло-желтого цвета в виде рыхлой таблетки *Light-yellow finely porous lyophilised mass in the form of a friable tablet*
Наличие вакуума (герметизация) *Vacuum (container integrity)*	Визуальный (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.7.1.0018.18) *Visual (SP RF XV, OFS. 1.7.1.0018.18)*	Свечение в поле высокочастотного разряда должно быть голубым или розово-голубым *Blue or pink and blue glow in the high-frequency discharge*
Время растворения *Reconstitution time*	Визуальный *Visual*	Время растворения в 1 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида не должно превышать 1 мин *Reconstitution time in 1 mL sterile 0.9% sodium chloride solution is less than 1 min*
Описание восстановленного образца *Description after reconstitution*	Визуальный *Visual*	Суспензия светло-желтого цвета, без осадка и примесей *Light-yellow suspension free of precipitation and impurities*
Стерильность *Sterility*	Метод прямого посева (ГФ РФ XIV изд., ОФС.1.2.4.0003.15) *Direct inoculation (SP RF XIV, OFS.1.2.4.0003.15*	Бактерии и грибы должны отсутствовать *No bacteria or fungi present*
Однородность массы дозированной лекарственной формы (средняя масса и отклонение от средней массы) *Mass homogeneity of the weighed dosage forms (average mass and deviation)*	Весовой (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.4.2.0009) *Weighing (SP RF XV, OFS.1.4.2.0009)*	Не более 5% *Not more than 5%*
Потеря в массе при высушивании *Loss on drying*	Весовой (ГФ РФ XV изд., ОФС.1.2.1.0010) *Weighing (SP RF XV, OFS.1.2.1.0010)*	Не более 5% *Not more than 5%*
Титр, КОЕ/мл *Titre, CFU/mL*	Метод предельных разведений с составлением числовой характеристики по таблице Мак-Креди или по среднему арифметическому значению *Titre calculation by the most probable number method, with numerical interpretation using McCrady's table or the arithmetic mean*	Не ниже 1×10^7 *Not less than 1×10^7*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. ГФ РФ — Государственная фармакопея Российской Федерации, ОФС — общая фармакопейная статья, КОЕ — колониеобразующая единица.
Note. SP RF, State Pharmacopoeia of the Russian Federation; OFS, general pharmacopoeial chapter; CFU, colony-forming unit.

Характер и скорость микробного роста во всех образцах в течение срока хранения оставались неизменными и соответствовали паспортным данным штамма. Титр штамма без учета числовых значений коэффициента стабильно сохранялся в пределах одного порядка (10^8 КОЕ/мл). Количественные показатели также демонстрировали сравнимые значения в пределах неопределенности измерений.

Таким образом, в течение двух лет хранения характеристики всех серий образцов штамма *A. laidlawii* PG8 оставались стабильными и соответствовали спецификации.

На основании результатов аттестации разработаны Паспорт и Инструкция по применению ФСО *A. laidlawii* PG8. Данный ФСО, предназначенный для контроля БЛП на присутствие микоплазм в соответствии с требованиями ОФС.1.7.2.0031.15[35], утвержден Приказом № 297 от 25.12.2024 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и внесен в Реестр ФСО ГФ РФ под реестровым номером ФСО.3.2.00473[36].

Разработанный ФСО *A. laidlawii* PG8 предназначен для использования в испытаниях БЛП на присутствие микоплазм микробиологическим методом согласно требованиям ОФС.1.2.4.003.15.

[35] ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд.; 2018.
[36] Реестр Фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации. https://www.regmed.ru/produkt-n-service/fso/fso-registry/fso-of-biological-origin/

Таблица 3. Результаты аттестации образцов рабочих серий 1, 2 и 3 тест-штамма *A. laidlawii* PG8
Table 3. Certification results of working bank batches 1, 2, 3, test strain *A. laidlawii* PG8

Показатель *Parameter*	**Требование спецификации** *Specification requirement*	**Результат аттестации образцов** *Samples*		
		Рабочая серия 1 *Batch 1*	**Рабочая серия 2** *Batch 2*	**Рабочая серия 3** *Batch 3*
Описание лиофилизата *Description before reconstitution*	Лиофилизированная мелкопористая масса светло-желтого цвета в виде рыхлой таблетки *Light-yellow finely porous lyophilised mass in the form of a friable tablet*	Соответствует *Complies*	Соответствует *Complies*	Соответствует *Complies*
Описание восстановленного образца *Description after reconstitution*	Суспензия светло-желтого цвета, без осадка и примесей *Light-yellow suspension free of precipitation and impurities*	Соответствует *Complies*	Соответствует *Complies*	Соответствует *Complies*
Наличие вакуума *Presence of vacuum*	Свечение в поле высокочастотного разряда должно быть голубым или розово-голубым *Blue or pink-blue glow in the high-frequency discharge*	Розово-голубое свечение *Pink and blue glow*	Розово-голубое свечение *Pink and blue glow*	Розово-голубое свечение *Pink and blue glow*
Время растворения *Reconstitution time*	Время растворения в 1 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида не должно превышать 1 мин *Reconstitution time in 1 mL sterile 0.9% sodium chloride less than 1 min*	Соответствует *Complies*	Соответствует *Complies*	Соответствует *Complies*
Стерильность *Sterility*	Посторонние бактерии и грибы должны отсутствовать *No extraneous bacteria or fungi present*	Соответствует *Complies*	Соответствует *Complies*	Соответствует *Complies*
Средняя масса (г) и отклонение от средней массы (RSD, %) *Average mass (g) and deviation (RSD, %)*	Не более 5% *Not more than 5%*	0,05272±0,00079 RSD=1,5%	0,0505±0,00111 RSD=2,1%	0,0489±0,0019 RSD=3,8%
Потеря в массе при высушивании, % *Loss on drying, %*	Не более 5% *Not more than 5%*	2,91	1,9	2,9
Титр, КОЕ/мл *Titre, CFU/mL*	Не ниже 1×10^7 Not less than 1×10^7	21×10^8	19×10^8	10×10^8

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. КОЕ — колониеобразующая единица; RSD — относительное стандартное отклонение.
Note. CFU, colony-forming unit; RSD, relative standard deviation.

С помощью ФСО возможна оценка пригодности партии питательной среды с уровнем чувствительности не более 100 КОЕ. В испытаниях могут применяться любые ПС, обладающие рост-стимулирующими свойствами в отношении *A. laidlawii* PG8, включая рекомендованную ГФ РФ полужидкую среду Каган. Данная среда обеспечивает минимальные анаэробные условия, благоприятные для выделения и культивирования как аргининзависимых (*M. arginini* G230), так и глюкозоферментирующих (*A. laidlawii* PG8) микоплазм, а также среда позволяет использовать лиофилизированные образцы ФСО *A. laidlawii* PG8 без предварительного накопления на других средах, что упрощает методику тестирования образцов.

Введение ФСО *A. laidlawii* PG8 в процедуру микробиологических испытаний БЛП расширяет спектр обнаруживаемой контаминации. ФСО может применяться для оценки качества лекарственных средств и ветеринарных препаратов, в производстве которых использовались антибиотики, а также для оценки иных материалов животного и растительного происхождения, включая сухие питательные среды, потенциально контаминированные микоплазмами. В качестве альтернативы не исключается возможность использования ФСО тест-штамма *A. laidlawii PG8* при разработке метода ПЦР диагностики микоплазменной контаминации в различных материалах биологического происхождения.

Таблица 4. Стабильность титра тест-штамма *A. laidlawii* PG8 после хранения при температуре минус 20–30 °C
Table 4. Assessment of the culture titre stability of strain *A. laidlawii* PG8 stored at -20 to -30 °C

Серия *Batch*	Титр штамма *A. laidlawii* PG8, КОЕ/мл *The strain titer A. laidlawii PG8, CFU/mL*					
	Микробная суспензия до лиофилизации *Microbial suspension prior to lyophilisation*	Образцы после лиофилизации *Samples, post-lyophilisation*	Образцы после 6 мес. хранения *6 months of storage*	Образцы после 12 мес. хранения *12 months of storage*	Образцы после 18 мес. хранения *18 months of storage*	Образцы после 24 мес. хранения *24 months of storage*
Основной банк *Master bank*	12×10^8	$7{,}2\times10^8$	15×10^8	10×10^8	$2{,}9\times10^8$	$2{,}9\times10^8$
Рабочая серия 1 *Working bank batch 1*	25×10^8	21×10^8	23×10^8	23×10^8	21×10^8	73×10^8
Рабочая серия 2 *Working bank batch 2*	45×10^8	19×10^8	18×10^8	73×10^8	67×10^8	44×10^8
Рабочая серия 3 *Working bank batch 3*	25×10^8	10×10^8	13×10^8	10×10^8	25×10^8	11×10^8

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

ВЫВОДЫ

1. Приготовлены лиофилизированные образцы основного и рабочего банков культуры штамма *A. laidlawii* PG8.
2. Показана стабильность аттестованных значений титра штамма (10^8 КОЕ/мл), культуральных и физико-химических свойств образцов по критически важным для обеспечения качества и надежности показателям в течение двух лет хранения при температуре минус 20–30°C.
3. Разработан и аттестован новый ФСО *A. laidlawii* PG8 для оценки ростовых свойств питательных сред, определения ингибирующего действия препаратов и использования в качестве положительного контроля при испытаниях на присутствие микоплазм согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации. По характеристикам ФСО *A. laidlawii* PG8 сопоставим со стандартным образцом Европейской фармакопеи BRP *A. laidlawii,* серия 1.
4. На основании результатов аттестации ФСО *A. laidlawii* PG8 включен в Реестр ФСО Государственной фармакопеи Российской Федерации.
5. Внедрение в практику ФСО, предназначенного для стандартизации микробиологического метода выявления контаминации в БЛП, будет способствовать повышению качества контроля БЛП и позволит гармонизировать российские и международные подходы в отношении лекарственных средств, контаминированных различными видами микоплазм.

Литература/References

1. David SA, Volokhov DV, Ye Z, Chizhikov V. Evaluation of Mycoplasma inactivation during production of biologics: egg-based viral vaccines as a model. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(9):2718–28. https://doi.org/10.1128/AEM.02776-09
2. Гладин ДП, Козлова НС, Эйдельштейн ИА и др. Микоплазмы. Биологические свойства (лекция). *Российские биомедицинские исследования*. 2023;8(4):103–15. Gladin DP, Kozlova NS, Edelstein IA, et al. Mycoplasmas. Biological properties (lecture). *Russian Biomedical Research*. 2023;8(4):103–15 (In Russ.). https://doi.org/10.56871/RBR.2023.58.16.012
3. Леонович ОА. Микоплазма: свойства, методы обнаружения и дезактивации клеточных культур и штаммов вирусов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2024;60(5):435–44. Leonovich OA. Mycoplasma: Properties, detection and decontamination methods of cell cultures and viral strains (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2024;60:785–93 (In Russ.). https://doi.org/10.1134/S0003683824604943
4. Kalaivani M, Chaudhary P, Goyal M, et al. Current regulatory and pharmacopoeial status of mycoplasma testing in concern with vaccines safety for human use. *J Basic Clin Pharma*. 2021;12(S4):001.
5. Medvedeva ES, Mouzykantov AA, Kostenko VV, et al. Adaptation to antimicrobials and pathogenicity in mycoplasmas: Development of ciprofloxacin-resistance and evolution of virulence in Acholeplasma laidlawii. *Dokl Biochem Biophys*. 2021;501(1):444–8. https://doi.org/10.1134/S1607672921060028
6. Думченко НБ, Семенцова АО, Нечаева ЕА. Изучение контаминации микоплазменными инфекциями культур клеток насекомых из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. *Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология*. 2023;(3):19–29. Dumchenko NB, Sementsova AO, Nechaeva EA. Research of contamination with mycoplasma infections of cell FBSI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor. *PNRPU Bulletin. Chemical Tecnology and*

Biotechnology. 2023;(3):19–29 (In Russ.). EDN: JUIIMN
7. Rottem S, Kosower NS, Kornspan JD. Contamination of tissue cultures by mycoplasmas. In: Ceccherini-Nelli L, Matteoli B, eds. *Biomedical Tissue Culture*. 2012. https://doi.org/10.5772/51518
8. Milne C, Daas A. Establishment of European Pharmacopoeia mycoplasma reference strains. *Pharmeuropa Bio*. 2006;(1):57–72. PMID: 17270132
9. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Тихонова АС. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2019;19(3):161–8. Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Tikhonova AS. Ways to improve quality control of culture medium used for mycoplasma detection. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019;19(3):161–8 (In Russ.). https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168
10. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. 4th ed. New York: McGraw–Hill; 1994.
11. Фадейкина ОВ, Волкова РА. Разработка порядка аттестации стандартных образцов биологических лекарственных средств. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017;51(8):44–50. https://doi.org/10.30906/0023-1134-2017-51-8-44-50
Fadeikina OV, Volkova RA. Elaboration of certification procedures for reference standards of biological drugs. *Pharm Chem J*. 2017;51(8):716–21. https://doi.org/10.1007/s11094-017-1680-6
12. Гегечкори ВИ, Шатилина АА, Шульга НА. Биологические стандартные образцы: актуальные вопросы разработки и порядка аттестации. *Эталоны. Стандартные образцы*. 2023;19(3):21–9. Gegechkori VI, Shatilina AA, Shulga NA, et al. Biological reference materials: Topical issues of development and certification procedure. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):21–9 (In Russ.). EDN: RKQAVM
13. Суханова СМ, Бердникова ЗЕ, Фадейкина ОВ и др. Анализ стабильности стандартного образца тест-штамма Mycoplasma arginini G230, используемого при испытании на присутствие микоплазм биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(3):331–46. Sukhanova SM, Berdnikova ZE, Fadeikina OV, et al. Stability analysis of a standard sample of the *Mycoplasma arginini* G230 used in testing for the presence of mycoplasmas of biological drugs. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):331–46 (In Russ.). https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-331-346

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены *таблицы S1* и *S2*.
https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s1
https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s2

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: ***С.М. Суханова*** — сбор и анализ источников литературы, систематизация и интерпретация результатов, формулировка выводов, научное редактирование и критическая переработка текста рукописи; ***З.Е. Бердникова*** — идея исследования, выполнение экспериментальных работ, написание текста рукописи; ***О.В. Фадейкина*** — концепция и дизайн исследования, статистическая обработка результатов.

Благодарности. Коллектив авторов выражает искреннюю благодарность и признательность сотрудникам и руководству иммунобиологического сектора Департамента контроля качества ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактерийных препаратов» ФМБА России, принявших участие в апробации стандартного образца.

Additional information. Tables *S1* и *S2* are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.
https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s1
https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-1-97-107-table-s2

Authors'contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. ***S.M. Sukhanova*** analysed, systematised and interpreted the results, formulated the conclusions, collected and analysed literature data, edited and critically revised the manuscript; ***Z.E. Berdnikova*** conceived the study idea, conducted the experiments, and drafted the manuscript; ***O.V. Fadeikina*** elaborated study concept and design, statistically processed the results, and drafted the manuscript.

Acknowledgments. The authors express their sincere gratitude and appreciation to the Immunobiological Sector of Quality Control Department, Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Sera and Enterprise for the Production of Bacterial Preparations of the Federal Medical and Biologic Agency of Russia, who participated in the standard approbation.

Об авторах / Authors

Суханова Светлана Михайловна, канд. биол. наук / **Svetlana M. Sukhanova,** Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: https://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
Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук / **Olga V. Fadeikina,** Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8473-7442

Поступила 10.09.2025
После доработки 24.11.2025
Принята к публикации 12.12.2025

Received September 10, 2025
Revised November 24, 2025
Accepted December 12, 2025