

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Бифидосодержащие пробиотики

ОФС.1.7.1.0003.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики, содержащие бифидобактерии (далее по тексту «бифидосодержащие пробиотики»).

Бифидосодержащие пробиотики содержат один или несколько видов живых бактерий рода *Bifidobacterium*, обладающих антагонистической активностью по отношению к широкому спектру патогенных и условно-патогенных бактерий, за счет продукции антибиотикоподобных веществ (бактериоцинов, микроцинов) и продуктов метаболизма (молочной, уксусной и других органических кислот).

Бифидосодержащие пробиотики по составу подразделяются на:

- *Монокомпонентные* полученные на основе одного производственного штамма бактерий рода *Bifidobacterium* (например, штаммы бактерий *Bifidobacterium bifidum* 1, 791, ЛВА-3, *B.adolescentis* МС-42);
- *Поликомпонентные* полученные на основе нескольких производственных штаммов бифидобактерий или состоящие из бактерий, принадлежащих к различным родам и семействам (например, штаммы бактерий *B. bifidum* 1 и *Escherichia coli* М-17; *B.longum* ВВ-46 и *Enterococcus faecium* Cernelle SF 68), дополняющие или потенцирующие друг друга по

ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам;

- *Сорбированные* полученные на основе одного или нескольких штаммов микроорганизмов, сорбированных на частицах активированного угля, кремния диоксида коллоидного или других сорбентах (например, бактерии штамма *B. bifidum* 1, сорбированные на угле);

- *Комбинированные* в состав которых помимо одного или нескольких видов микроорганизмов входят активные компоненты иной природы (например, лизоцим, инулин, действующие вещества лекарственных растений, витамины, микроэлементы, гормоны и др.), оказывающие терапевтическое воздействие на организм человека (например, сочетание в препарате бактерий штамма *B. bifidum* 1 и лизоцима).

Производственные штаммы бактерий рода *Bifidobacterium*

Штаммы рода *Bifidobacterium*, используемые для производства бифидосодержащих пробиотиков, депонируют в официальных коллекциях (табл. 1).

Производственные штаммы рода *Bifidobacterium* проверяют по культуральным, тинкториальным, морфологическим и биохимическим свойствам (табл. 2 и 3), безопасности (*in vitro* и *in vivo*) (табл. 4). Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» и «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», которые могут быть дополнены молекулярно-генетическими методами.

Таблица 1– Производственные штаммы рода *Bifidobacterium*, используемые в производстве бифидосодержащих пробиотиков, зарегистрированных в РФ

Название производственного штамма бактерий рода <i>Bifidobacterium</i>	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 1	<ul style="list-style-type: none"> Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), коллекционный номер штамма № 900791 Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 79
<i>B. bifidum</i> 791	<ul style="list-style-type: none"> ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-3300 Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 80
<i>B. bifidum</i> ЛВА-3	<ul style="list-style-type: none"> ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-3299 Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 81
<i>B. adolescentis</i> МС-42	<ul style="list-style-type: none"> ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-1987 Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора №210
<i>B. longum</i> В379М	<ul style="list-style-type: none"> ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита ЦМПМ № В-2000 Государственная коллекция микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора № 79
<i>B. longum</i> ВВ-46	<ul style="list-style-type: none"> Chr.Hansen Culture Collection, Дания, номер депозита – 15958
<i>B. longum</i> DSM 20219 или ATCC 15707 типа E194	<ul style="list-style-type: none"> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH DSM (Германская коллекция микроорганизмов и культур клеток), номер депозита – DSM 20219 American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур), номер депозита ATCC 15707 типа E194 ВНИИ Генетика Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, номер депозита – АС 1665

Таблица 2 – Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

Название штамма	Описание морфологических, тинкториальных и культуральных свойств
<i>B. bifidum</i> 1	<p>В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные неподвижные палочки длиной от 4,0 до 5,0 мкм с бифуркацией или утолщением на одном или двух концах, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений.</p> <p>Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 72 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка, казеиново-дрожжевой (КД-5), гидролизатно-молочной (ГМ)– бактерии вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноза); отдельные колонии бифидобактерий при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «гвоздей» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу.</p> <p>Оптимальная температура роста бифидобактерий $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$, фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 44 — 48 ч. При посеве культуры, предварительно выращенной на печеночной среде Блаурокка или КД-5, в обезжиренное молоко в объеме 5 — 10 % при инкубации в течение 72 – 96 ч штамм <i>B. bifidum</i> 1 вызывает только закисление молока (до 40 – 50 °Т) без свертывания.</p>
<i>B. bifidum</i> 791 и ЛВА-3	<p>В мазках, окрашенных по Граму, должны обнаруживаться грамположительные неподвижные палочки длиной от 4,0 до 5,0 мкм, которые располагаются в виде отдельных клеток или скоплений и имеют бифуркацию или утолщение на одном или обоих концах клетки.</p> <p>Строгие анаэробы; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образуют круглые мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка, казеиново-дрожжевой (КД-5), гидролизатно-молочной (ГМ) – бактерии вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноза); отдельные колонии бифидобактерий штамма <i>B. bifidum</i> ЛВА-3 при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «гвоздей» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу.</p> <p>Отдельные колонии бифидобактерий штамма <i>B. bifidum</i> 791 при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму «комет» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу.</p> <p>Оптимальная температура роста для обоих штаммов $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$, фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 16 –24 ч. При посеве каждого из штаммов, предварительно выращенных на печеночной среде Блаурокка или КД-5, в обезжиренное молоко в объеме 5 — 10 % после инкубации в течение 24 ч происходит сквашивание молока с образованием сгустка.</p>
<i>B. adolescentis</i> МС-42	<p>В мазках, окрашенных по Граму, должны быть грамположительные неподвижные зернистые палочки прямые или изогнутые с утолщением или ветвлением на одном или двух концах длиной от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений.</p> <p>Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые</p>

	<p>мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка, казеиново-дрожжевой (КД-5), гидролизатно-молочной (ГМ) – бактерии вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноза); отдельные колонии бифидобактерий при росте на печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «зерен» или «гвоздей» белого цвета, образующих при встряхивании крошковатую массу.</p> <p>Оптимальная температура роста бифидобактерий $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$; фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 56 – 72 ч.</p>
<i>B. longum</i> B379M	<p>В мазках, окрашенных по Граму, должны определяться грамположительные неподвижные полиморфные палочки с раздвоениями или булавовидными утолщениями на одном или двух концах длиной от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений.</p> <p>Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка, казеиново-дрожжевой (КД-5), гидролизатно-молочной (ГМ) – бактерии вырастают в виде рыхлой массы, оставляя прозрачной верхнюю часть среды (зона аэробноза); отдельные колонии бифидобактерий при росте на печеночной среде Блаурокка имеют шаровидную форму белого цвета и образуют при встряхивании крошковатую массу.</p> <p>Штамм хорошо растет в обезжиренном молоке, образуя равномерный стусток через 18 – 20 ч инкубации при $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$.</p> <p>Оптимальная температура роста бифидобактерий $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$; фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 16 – 20 ч.</p>
<i>B. longum</i> BB-46	<p>В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные неподвижные слабо или сильно набухшие, иногда деформированные палочки размером от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений.</p> <p>Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 48 – 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые прозрачные белые колонии 1 мм в диаметре.</p> <p>Оптимальная температура роста бифидобактерий $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$.</p>
<i>B. longum</i> DSM 20219	<p>В мазках, окрашенных по Граму, должны быть грамположительные неподвижные слабо или сильно набухшие, иногда деформированные палочки длиной от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений.</p> <p>Строгий анаэроб; в анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 48 – 56 ч инкубации при температуре $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$ образует круглые белые прозрачные колонии 1 мм в диаметре.</p> <p>Оптимальная температура роста бифидобактерий $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.</p>

Таблица 3– Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

Свойства	Штаммы бактерий рода <i>Bifidobacterium</i>					
	<i>B. bifidum</i>			<i>B. adolescentis</i> МС-42	<i>B. longum</i> В379М	<i>B. longum</i> ВВ-46 и DSM 20219
	1	791	ЛВА-3			
Ферментирует без образования газа:						
-глюкозу	+	+	+	+	+	+
- лактозу	+	+	+	+	+	+
-мальтозу				+	+	+
-маннозу	-	-	-	+	+	+
-целлобиозу	±	±	±	± слабо	±	±
-сахарозу	+	+	+	+ медленно	+	+
-арабинозу	-	-	-	-	-	-
-ксилозу	-	-	-	-	-	-
-инулин	-	-	-	-	-	-
- сорбит	-	-	-	-	-	-
-салицин	-	-	-	-	-	-
Оптимальная температура для роста (38 ± 1) °С	+	+	+	+	+	+
Разжижает желатин	-	-	-	-	-	-
Сквашивает молоко	-	+	+	+		
Продуцирует каталазу	-	-	-	-	-	-
Гемолитическая активность	-	-	-	-	-	-
Адгезивная активность	+	+	+	+	+	+
Активность кислотообразования при культивировании в печеночной среде Блаурокка °Т	100	100	100	не ниже 120	не ниже 120	100
Антагонистическая активность (зоны задержки роста тест-штаммов в мм на среде МРС-5 в анаэробных условиях)	не менее 15	не менее 10	15	не менее 20	не менее 15	не менее 10

Примечание: «+» положительный; «-» отрицательный; «+/-»-замедленно положительный

Таблица 4 – Изучение безопасности штаммов бактерий рода *Bifidobacterium*

Штамм бактерий	Безвредность		Вирулентность		Токсичность		Токсигенность	
	Вводимая доза, $\times 10^{10}$ КОЕ/0,5 мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводимая доза, $\times 10^9$ КОЕ/0,5 мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводимая доза, $\times 10^9$ КОЕ/мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводимая доза, мл	Кол-во живых/павших мышей
<i>B. bifidum</i> 1, 791 и ЛВА-3	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	10	10/0		
<i>B. adolescentis</i> МС-42	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0		
	10	10/0	10	10/0	10	10/0	1,0	10/0
<i>B. longum</i> В379М	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0		
	10	10/0	10	10/0	10	10/0	1,0	10/0
<i>B. longum</i> ВВ-46 и DSM 20219	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0		
	10	10/0	10	10/0	10	10/0	1,0	10/0

ПРОИЗВОДСТВО

Производство бифидосодержащих пробиотиков основано на культивировании производственного штамма (или штаммов) бактерий рода *Bifidobacterium* методом глубинного культивирования в оптимальной питательной среде с соблюдением определенных технологических параметров, обеспечивающих оптимальные условия для накопления биомассы бифидобактерий и сохранения их пробиотических свойств; последующая стадия производства пробиотиков – лиофилизация биомассы в защитной среде.

При производстве бифидосодержащих пробиотиков проводят валидацию технологического процесса и методов контроля, которые в соответствии с требованиями правил организации производства и контроля качества лекарственных средств доказывают, что конкретная методика, процесс, оборудование, исходное сырье, деятельность или система действительно приводят к ожидаемым и повторяемым результатам, и гарантируют, что лекарственное средство изготовлено в соответствии со

своим составом, не содержит контаминантов, маркировано надлежащим образом, упаковано и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

При производстве бифидосодержащих пробиотиков особое значение имеет постоянное выполнение на всех этапах производства внутрипроизводственного анализа основных показателей качества для оценки их воспроизводимости, осуществляется контроль качества готовой продукции при выпуске и в течение всего срока хранения.

Бифидосодержащие пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизат, капсулы, таблетки, суппозитории и порошки.

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного средства лекарственной формы таблетки оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки», «Капсулы», «Суппозитории» и «Порошки».

Описание. Приводится описание внешнего вида соответствующей лекарственной формы лекарственного средства и, при необходимости, органолептических свойств.

Подлинность. Подлинность подтверждают следующими методами – микроскопическим (окраской мазков по Граму), культурально-морфологическим (описание вида колоний выросших на адекватных питательных средах) и/или бактериологическим (подтверждается специфической биологической активностью). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Время восстановления препарата (для лиофилизатов, порошков). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» либо по методике, описанной в нормативной документации, с указанием времени получения восстановленного препарата

(для лиофилизатов – не более 5 мин, для порошков – не более 20 мин, если в нормативной документации нет других указаний).

Время распадаемости (для таблеток и капсул). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

Указывают применяемый растворитель (среда распадаемости), его объем и, при необходимости, условия проведения испытаний (температура, перемешивание, встряхивание, использование дисков и пр.)

Время распадаемости для таблеток не должно превышать 15 мин, для капсул – 20 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Температура плавления или **время полной деформации** (для суппозиториев). Для суппозиториев, изготовленных на липофильной основе, определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиториев на липофильной основе».

Указывают применяемый растворитель, его объем, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание, использование водяной бани).

При проведении теста «Температура плавления» или «Время полной деформации» учитывают, что время расплавления для суппозиториев и мазей должно быть не более 20 мин, если в нормативной документации не указаны другие требования.

pH (для лиофилизатов, порошков, капсул и таблеток). Указывается допустимый интервал значений pH. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». В случае определения pH после растворения следует указать растворитель и его объем.

Потеря в массе при высушивании. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании».

Показатель потери в массе при высушивании должен составлять (если нет других указаний в нормативной документации) для:

- лиофилизатов – не более 3,5 %;
- капсул – не более 3,5 %;
- таблеток – не более 4,5 %;
- порошков – не более 5,0 %.

Средняя масса и отклонения от средней массы (для таблеток, порошков, суппозитория и содержимого капсул). Приводятся требования к средней массе и максимально допустимые отклонения от средней массы в соответствии с ОФС «Однородность массы дозированных лекарственных форм».

Специфическая безвредность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются требования и критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля (порода/линия, пол), их количество; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность наблюдения; учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не приведены другие требования.

Бифидосодержащие пробиотики должны соответствовать нормативным требованиям, изложенным в ОФС «Микробиологическая чистота» (если в нормативной документации не приведены другие требования):

- категория 5.3.А (лиофилизаты, порошки);
- категория 5.3.Б (таблетки, капсулы, суппозитории).

В нормативных документах на пробиотики для детей введены более строгие нормы, а именно:

- для детей (от 3 мес до 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы и др.), ректально (суппозитории) – не более 10 аэробных бактерий в 1 единице препарата/в г; при отсутствии в 1 единице препарата энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и дрожжевых и плесневых грибов;
- для детей (от 1 года) для приема внутрь (таблетки, капсулы), ректально (суппозитории) – не более 50 аэробных бактерий в 1 г препарата; при отсутствии в 1 единице препарата энтеробактерий, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, дрожжевых и плесневых грибов.

Указывают используемые питательные среды, количество и объем испытуемого материала, условия инкубации и ее продолжительность, учет результатов.

Специфическая активность. Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в 1 дозе лекарственного средства и активностью кислотообразования (или антагонистической активностью) в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

В 1 дозе препарата должно содержаться (если нет других указаний в нормативной документации) не менее 10^7 КОЕ бифидобактерий.

Активность кислотообразования штамма-продуцента, входящего в испытуемый препарат, должна быть не менее 100 °Т (если нет других указаний в нормативной документации).

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе препарата бифидосодержащих пробиотиков проводят методом серийных разведений в полужидкой модифицированной печеночной среде Блаурокка (если в нормативной документации не приведены другие среды) с последующей инкубацией в адекватных условиях. При проведении контроля поликомпонентных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех штаммов, входящих в препарат.

Кислотообразующую активность штаммов-продуцентов, входящих в состав бифидосодержащих пробиотиков, определяют по титруемой кислотности при культивировании бактерий в адекватной питательной среде. Количественное определение кислотообразующей активности проводят методом кислотно-основного титрования.

Производственные штаммы и штаммы для контроля. Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

В разделе должна содержаться информация:

1. Наименование производственных штаммов и штаммов для контроля, обоснование для включения в производство (депонирование в официальных коллекциях).

2. Производственные штаммы и штаммы для контроля должны быть проверены на отсутствие контаминации и соответствующим образом охарактеризованы по биологическим и биохимическим свойствам.

Контроль качества производственных пробиотических штаммов и штаммов для контроля пробиотиков рекомендуется проводить не реже 1 раза в год, если в нормативной документации нет других указаний.

Упаковка и маркировка. В соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты».

Транспортирование и хранение. При температуре от 2 до 8 °С, если нет иных указаний в нормативной документации. Указывают условия транспортирования и хранения, обеспечивающие стабильность лекарственного препарата.