

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

---

**Определение специфической  
активности пробиотиков**

**ОФС.1.7.2.0009.15  
Вводится впервые**

---

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы испытания специфической активности пробиотических производственных штаммов и пробиотиков на их основе, которая определяется количеством жизнеспособных бактерий и активностью кислотообразования или их антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам.

Таким образом, описанные в настоящей статье микробиологические методы позволяют определить следующие показатели специфической активности испытуемого препарата или штамма:

- количество жизнеспособных бактерий в 1 дозе<sup>1</sup> иммунобиологического лекарственного препарата (ИЛП) (раздел 1);
- активность кислотообразования (раздел 2);
- антагонистическая активность (раздел 3).

**ОБЩАЯ ЧАСТЬ**

Требования к специфической активности испытуемого препарата касаются определения количества живых бактерий в 1 дозе лекарственного средства, кислотообразующей активности штаммов-продуцентов, входящих в лакто- и бифидосодержащие пробиотики для медицинского применения, и определения уровня антагонистической активности испытуемого препарата. Контроль испытуемого препарата по показателю «Количество жизнеспособных бактерий в одной дозе лекарственного средства» является обязательным при отработке новых технологий производства лекарственного

средства, предварительном и сертификационном контроле, оценке качества и проверке стабильности лекарственных форм в процессе установления срока годности. Определение количества живых микроорганизмов в испытуемой дозе проводят методом серийных разведений, при необходимости, с последующим высевом на питательные среды (Человеческая доза – доза испытуемого препарата, указанная на этикетке или в инструкции по медицинскому применению (листочку-вкладыше)).

. При проведении контроля поликомпонентных или комбинированных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех видов или штаммов, входящих в состав препарата.

Показатель «Активность кислотообразования» является обязательным при контроле штаммов-продуцентов, входящих в состав лакто- и бифидосодержащих пробиотиков, при предварительном и сертификационном контроле, при оценке качества и проверке стабильности лекарственных форм в процессе установления срока годности.

Показатель «Антагонистическая активность» является обязательным при контроле колисодержащих и споровых пробиотиков для медицинского применения и производственных штаммов. Уровень антагонистической активности ИЛП в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют методом отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов.

Производственные штаммы контролируются не реже 1 раза в год.

#### **Питательные среды, используемые в испытаниях**

Для выращивания микроорганизмов, входящих в пробиотики для медицинского применения, используют адекватную для данного вида бактерий и для данной методики питательную среду (если нет других указаний в нормативной документации):

- для лактобактерий – МРС- 2, МРС- 4, МРС- 5, МРС- 1; для ацидофильных лактобактерий – стерильное обезжиренное молоко;

- для бифидобактерий – полужидкую модифицированную печеночную среду Блаурокка, среду Блаурокка с натрия азидом, МРС-5;
- для кишечной палочки – среду Эндо, мясопептонный агар (МПА), среду Гаузе № 2 агаризованную;
- для энтерококков – МПА, среду № 1;
- для бактерии рода *Bacillus* – среду Гаузе № 2 агаризованную, МПА, полусинтетическую среду с дрожжевым диализатом.

Питательные среды для проведения испытаний готовят в соответствии с приведенными ниже указаниями. Также могут использоваться эквивалентные коммерчески доступные среды при условии, что они выдерживают испытания на ростовые свойства. Необходимое значение рН питательных сред устанавливают при температуре  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .

#### *Среда МРС-1*

В 200 мл воды очищенной последовательно растворяют:

- |  |          |
|--|----------|
| • марганец сернокислый   | 0,05 г   |
| • цистеин солянокислый или L-цистин  | 0,10 г   |
| • магний сернокислый   | 0,200 г  |
| • калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный  | 2,00 г   |
| • аммония цитрат   | 2,00 г   |
| • натрия ацетат (натрий уксуснокислый)   | 5,00 г   |
| • печеночный экстракт <sup>а)</sup> (1:1)  | 100,0 мл |
| • дрожжевой аутолизат <sup>б)</sup> с содержанием<br>• аминного азота $(0,15 \pm 0,03) \%$ | 50,0 мл  |
| • пептон сухой ферментативный  | 10,00 г  |
| • гидролизат обезжиренного молока <sup>в)</sup>  | 500,0 мл |
| • полисорбат 80  | 1,00 мл  |
| • глюкоза  | 20,00 г  |

Доводят объем среды водой очищенной до 1000 мл; рН среды  $(6,4 \pm 0,2)$ . Питательную среду разливают в пробирки по 10 , 25 или 30 мл и

стерилизуют при температуре  $(120 \pm 2) ^\circ\text{C}$  в течение  $(15 \pm 1)$  мин. Срок хранения готовой стерильной среды 2 мес при температуре от 2 до  $8 ^\circ\text{C}$  или не более 1 мес при температуре от 18 до  $25 ^\circ\text{C}$ .

Примечание.

<sup>а)</sup> Приготовление печеночного экстракта с содержанием аминного азота  $(0,050 \pm 0,005) \%$ .

- Печень говяжья 1,0 кг
- Вода очищенная 1000 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре  $(112 \pm 5) ^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 1)$  мин (процесс стерилизации валидируется).

Приготовление: 1,0 кг свежей говяжьей печени очищают от жира, пленок и протоков, нарезают кубиками размером  $(3 \times 3 \times 3)$  см, заливают 1 л воды очищенной и кипятят в течение 1,5 – 2 ч. Остывший отвар фильтруют через марлевый фильтр (ткань «миткаль»), количество отвара доводят водой очищенной до 1 л, разливают в бутылки и стерилизуют при температуре  $120 \pm 2 ^\circ\text{C}$  в течение  $15 \pm 1$  мин. Срок хранения печеночного экстракта при температуре от 2 до  $8 ^\circ\text{C}$  не более 6 мес или не более 3 мес при комнатной температуре.

<sup>б)</sup> Приготовление дрожжевого аутолизата с содержанием аминного азота  $(0,15 \pm 0,03) \%$ .

- Дрожжи хлебопекарные 1000 г
- Вода питьевая 4000 мл
- Хлороформ 40 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре  $(112 \pm 5) ^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 1)$  мин.

<sup>в)</sup> Приготовление гидролизата обезжиренного молока по Богданову.

- Молоко коровье пастеризованное, нежирное ( $\text{pH } 6,7 \pm 0,1$ ) 1000 мл
- Панкреатин 1,0 г
- Хлороформ 5,0 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре  $(112 \pm 5) ^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 1)$  мин.

*Среда МРС-2*

- Марганец сернокислый 0,05 г
- Цистеин солянокислый или L-цистин 0,10 г
- Магний сернокислый 0,20 г
- Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный 2,00 г
- Аммония цитрат 2,00 г

• Натрия ацетат	5,00 г
• Печеночный экстракт (1:1)	100,0 мл
• Дрожжевой аутолизат с содержанием аминного азота (0,15 ± 0,03) %	50,0 мл
• Пептон сухой ферментативный	10,00 г
• Гидролизат обезжиренного молока	500,0 мл
• Полисорбат 80	1,00 мл
• Глюкоза	20,00 г
• Агар микробиологический	1,00 г
• Вода очищенная	до 1000 мл

Значение рН готовой среды (6,4 ± 0,2). Питательную среду разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при температуре (120 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 2 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С.

#### *Среда МРС-4*

В 200 мл воды очищенной последовательно растворяют:

• Марганец сернокислый	0,05 г
• Цистеин солянокислый или L-цистин	0,10 г
• Магний сернокислый	0,200 г
• Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный	2,00 г
• Аммония цитрат	2,00 г
• Натрия ацетат	5,00 г
• Печеночный экстракт (1:1)	100,0 мл
• Дрожжевой аутолизат с содержанием аминного азота (0,15 ± 0,03) %	50,0 мл
• Пептон сухой ферментативный	10,00 г
• Гидролизат обезжиренного молока	500,0 мл
• Полисорбат 80	1,00 мл
• Глюкоза	20,00 г

- Агар микробиологический 19,0 г

Доводят объем среды водой очищенной до 1000 мл (рН 6,4±0,2). Питательную среду стерилизуют в автоклаве при температуре (120 ± 2) °С в течение (15 ± 1) мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до 8 °С в стерильных герметичных флаконах или не более 3 мес при температуре от 18 до 25 °С.

#### *Среда МРС-5*

- Марганец сернокислый 0,05 г
- Цистеин солянокислый или L-цистин 0,10 г
- Магний сернокислый 0,200 г
- Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный 2,00 г
- Печеночный экстракт (1:1) 100,0 мл
- Дрожжевой аутолизат с содержанием аминного азота (0,15±0,03) % 50,0 мл
- Пептон сухой ферментативный 10,00 г
- Гидролизат обезжиренного молока 500,0 мл
- Полисорбат 80 1,00 мл
- Глюкоза 20,00 г
- Агар микробиологический 15,0 г
- Вода очищенная до 1000 мл.

Питательную среду (рН 7,0) стерилизуют в автоклаве при температуре (120±2) °С в течение (15±1) мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до 8 °С в стерильных герметичных контейнерах (флаконах) или не более 3 мес при температуре от 18 до 25 °С.

#### Примечание.

Приготовление обезжиренного стерильного молока рН (6,7±0,3); показатель кислотности не более 18 °Т:

- Молоко сухое обезжиренное 80 г
- Вода очищенная до 1000 мл

Разливают в пробирки по 10 , 25 или 30 мл и стерилизуют при температуре (112 ± 5) °С в течение (60±1) мин (процесс стерилизации

валидируется). Срок хранения обезжиренного стерильного молока 2 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С.

*Модифицированная печеночная среда Блаурокка*

- Печеночная вода (1:2) с содержанием аминного азота (100 ± 20) мг% 1000 мл
- Пептон сухой 10 г
- Натрия хлорид 5 г
- Лактоза 10 г
- Цистеин 0,1 г
- Агар микробиологический 0,75 г

Устанавливают требуемое значение pH (7,2 ± 0,2) с помощью 20 % раствора натрия гидроксида. Питательные среды разливают в пробирки по 10, 25 или 30 мл и стерилизуют при температуре (112 ± 5) °С в течение (60 ± 1) мин (процесс стерилизации валидируется). Срок хранения питательной среды 2 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С. После 14 сут хранения перед использованием для снижения содержания растворенного кислорода среду следует однократно регенерировать путем нагревания пробирок на водяной бане при температуре 70 – 80 °С в течение 10 – 15 мин.

Примечание.

Приготовление печеночной воды с содержанием аминного азота (100±20) мг %.

- Печень говяжья 0,5 кг
- Вода очищенная 1000 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре (112 ± 5) °С в течение (20 ± 1) мин (процесс стерилизации валидируется).

0,5 кг свежей говяжьей печени очищают от жира, пленок и протоков, нарезают кубиками размером (3×3×3) см, заливают 1 л воды очищенной и кипятят в течение 1,5 – 2 ч. Остывший отвар фильтруют через марлевый фильтр (ткань «миткаль»), количество отвара доводят водой очищенной до 1 л, разливают в бутылки и стерилизуют при температуре (112 ± 5) °С в течение (20 ± 1) мин. Срок хранения – не более 6 мес при температуре от 2 до 8 °С или не более 3 мес при температуре от 18 до 25 °С.

### *Среда Блаурокка с азидом натрия*

- Среда Блаурокка 1000 мл
- Натрия азид 0,1 г

Среду перемешивают, разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют при температуре  $(112 \pm 5)$  °С в течение  $(20 \pm 1)$  мин. Срок хранения питательной среды 1 мес при температуре от 2 до 8 °С.

### *Среда Гаузе №2 агаризованная*

- Бульон Хоттингера<sup>1)</sup> с содержанием аминного азота 700 мг% 30 мл
- Пептон сухой 5 г
- Натрия хлорид 5 г
- Глюкоза 10 г
- Агар микробиологический 30 г
- Вода очищенная до 1000 мл

Примечание.

Приготовление бульона Хоттингера (содержание аминного азота 700 мг%).

- Гидролизат Хоттингера 24,0 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Вода очищенная до 1000 мл

Стерилизация в автоклаве при температуре  $(112 \pm 5)$  °С в течение  $(20 \pm 1)$  мин. Срок хранения питательной среды в течение 6 мес при температуре от 2 до 8 °С в стерильных герметичных контейнерах (флаконах).

### *Полусинтетическая среда с дрожжевым диализатом агаризованная*

- Марганец хлористый 4-водный или марганец сернокислый 0,01 г
- Железо(III) сернокислое 7-водное 0,01 г
- Магний сернокислый 7-водный или магния хлорид 6-водный 0,1 г
- Кальция хлорид 0,08 г
- Пептон сухой 0,5 г
- Дрожжевой диализат с содержанием азота аминного 150 мг % 5,0 мл
- Глюкоза 10,0 г
- Агар микробиологический 20-30 г
- Вода очищенная до 1000 мл.



Стерилизация в автоклаве при температуре  $(112 \pm 5) ^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 1)$  мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до  $8 ^\circ\text{C}$  в стерильных герметичных контейнерах (флаконах).

#### *Мясопептонный агар (МПА)*

- Пептон 10,0 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Мясная вода 300–500 мл
- Агар микробиологический 13–20 г

В мясную воду вносят 10 г пептона и 5 г натрия хлорида, кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения добавленных ингредиентов. Приготовленный бульон фильтруют, устанавливают рН 7,2–7,4 и добавляют измельченный агар в количестве, зависящем от его качества и назначения среды. После добавления агара среду кипятят на слабом огне при постоянном перемешивании до полного растворения агара. Разливают в пробирки и флаконы, стерилизуют при температуре  $120 ^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 1)$  мин. После стерилизации среда, остывая, уплотняется.

Срок хранения готовой среды (рН  $7,3 \pm 0,2$ ) 6 мес при температуре от 2 до  $8 ^\circ\text{C}$  или не более 1 мес при температуре от 18 до  $25 ^\circ\text{C}$ .

#### *Мясопептонный бульон (МПБ)*

- Пептон 10,0 г
- Натрия хлорид 5,0 г
- Мясная вода 1000 мл.

В мясную воду вносят 10 г пептона и 5 г натрия хлорида, кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения добавленных ингредиентов. Приготовленный бульон фильтруют, устанавливают рН 7,2–7,4 и разливают в пробирки и флаконы. Стерилизуют при температуре  $120 ^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 1)$  мин. Срок хранения питательной среды 6 мес при температуре от 2 до  $8 ^\circ\text{C}$  или не более 1 мес при температуре от 18 до  $25 ^\circ\text{C}$ .

Примечание.

Приготовление мясной воды (1:2).

- Мясо–говядина (фарш) 500 г
- Вода очищенная 1000 мл

Стерилизация при температуре 121 °С в течение 20 мин. Срок хранения 2 мес при температуре от 2 до 8 °С и не более 1 мес при температуре от 18 до 25 °С.

Перед испытанием, в случае использования плотной питательной среды, по 10–15 или 20–25 мл расплавленной агаризованной питательной среды (при температуре около 45 °С) разливают в стерильные чашки Петри диаметром 9 или 12 см (соответственно), оставляют на горизонтальной поверхности и дают среде застыть. Поверхность агаризованных сред перед посевом подсушивают для удаления конденсационной воды и проверки стерильности. Чашки Петри с питательными средами помещают закрытыми и перевернутыми вверх дном в термостат при температуре  $(37 \pm 1)$  °С на 48 ч. Агар Эндо подсушивают 40 мин в ламинарном шкафу с открытыми крышками.

## **Раздел 1. Определение количества жизнеспособных бактерий в 1 дозе ИЛП**

В настоящем разделе изложены общие принципы определения количества живых бактерий в пробиотиках для медицинского применения методом десятикратных разведений с высевом на плотные питательные среды (метод Коха) и глубинного чашечного метода или в жидкие и полужидкие среды (метод предельных разведений). Результаты количественного определения микроорганизмов выражаются в колониобразующих единицах (КОЕ).

### ***Отбор и подготовка образцов для анализа***

От каждой испытуемой серии препарата пробиотика методом случайной выборки отбирают по 3 испытуемых образца.

Испытания проводят, соблюдая правила асептики.

Каждый образец в отдельности разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида и перемешивают пипеткой 8–10 раз.

*Особенности подготовки испытуемого образца в зависимости от лекарственной формы (если нет других указаний в нормативной документации):*

1. *Лиофилизаты (флаконы)* – каждый образец в отдельности ресуспензируют стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида (из расчета 1 мл на 1 дозу) и перемешивают пипеткой 8–10 раз, получая исходное разведение.
2. *Порошки* – содержимое пакета (саше) асептически пересыпают в стерильную колбу вместимостью 250 мл, добавляют 100 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают путем энергичного встряхивания в течение 10 мин, получая разведение 1:100 ( $10^{-2}$ ).
3. *Таблетки* – каждый образец в отдельности предварительно растирают в стерильной ступке стерильным пестиком до гомогенного состояния и дробно добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8–10 раз, получая исходное разведение.
4. *Капсулы* – каждый образец в отдельности вносят в стерильные пробирки, добавляют 10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробирки с капсулами помещают на водяную баню при температуре  $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Через 10–30 мин содержимое пробирок перемешивают до гомогенного состояния, получая разведение 1:10 ( $10^{-1}$ ).
5. *Суппозитории* – каждый образец в отдельности помещают в стерильные пробирки и добавляют предварительно нагретый до температуры  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида до общего объема 10 мл в зависимости от величины средней массы суппозитория испытуемой серии (например, при массе 1,1 г добавляют 8,9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, а при массе 2 г – 8 мл физиологического раствора). Пробирки с суппозиториями помещают на водяную баню при температуре  $(39 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Через 10–30 мин содержимое пробирок

перемешивают до гомогенного состояния, получая разведение 1:10 ( $10^{-1}$ ).

### *Методика испытания*

Испытание проводят методом последовательных десятикратных разведений, соблюдая правила асептики. Для этого 1 мл микробной суспензии испытуемого образца (исходное разведение, разведения  $10^{-1}$  или  $10^{-2}$ ) вносят пипеткой в пробирку, содержащую 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем новой пипеткой 10–15 раз перемешивают, получая следующее разведение ( $10^{-2}$  или  $10^{-3}$ ), и затем 1 мл суспензии переносят в следующее разведение. Титрование проводят до разведений, из которых будет произведен высев на питательные среды. Для каждого разведения используют отдельную пипетку.

В случае, если образец содержит 1 дозу, 0,5 мл микробной суспензии испытуемого образца (исходное разведение) пипеткой вносят в пробирку, содержащую 4,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Затем новой пипеткой 10–15 раз перемешивают, получая следующее разведение ( $10^{-1}$ ) и 1 мл суспензии переносят в пробирку с 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, получая разведение  $10^{-2}$ . Титрование проводят до разведений, из которых будет произведен высев на питательные среды. Для каждого разведения используют отдельную пипетку.

В зависимости от биологических свойств бактерий, входящих в состав испытуемого образца, используют соответствующую методику испытания.

## **1. Высев на плотные питательные среды**

### ***1.1 Метод Коха***

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца из 2 последних разведений (степень разведения зависит от количества КОЕ в 1 дозе исследуемого препарата) по 0,1 мл микробной суспензии высевают на чашки Петри с питательной средой (по 2 чашки на каждое разведение). Суспензию равномерно распределяют по поверхности среды шпателем Дригальского или с помощью стеклянных бус до полного

впитывания (высыхания) суспензии. Чашки закрывают и помещают перевернутыми вверх дном в термостат для инкубации.

Посевы инкубируют при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 24–96 ч в адекватных, в зависимости от вида микроорганизма, условиях (аэробных, микроаэрофильных или анаэробных). При инкубировании в анаэробных или микроаэрофильных условиях чашки Петри с посевами помещают в анаэростат и создают необходимую газовую атмосферу.

Данный метод может быть использован при определении количества живых бактерий каждого вида в поликомпонентных пробиотиках при условии, что бактерии, входящие в состав препарата, образуют визуально различимые по форме и другим признакам колонии.

### ***1.2. Глубинный чашечный метод***

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца из 2 последних разведений (степень разведения зависит от количества КОЕ в исследуемом препарате) по 1,0 мл микробной суспензии стерильной пипеткой вместимостью 1,0 мл вносят в чашки Петри диаметром 90 мм (по 2 чашки на каждое разведение). Добавляют 20–25 мл расплавленной и охлажденной до температуры  $42,5 \pm 2,5 ^\circ\text{C}$  агаризованной питательной среды, закрывают и быстро осторожно перемешивают вращательно-поступательными движениями, не отрывая дна чашки от поверхности стола и не допуская попадания среды на крышку чашки. После застывания агара чашки Петри переворачивают вверх дном и инкубируют в адекватных условиях при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение необходимого для данного микроорганизма времени.

#### *Учет результатов*

По окончании инкубации производят подсчет выросших на чашках Петри колоний и вычисляют содержание живых бактерий в 1 дозе испытуемого образца. При подсчете учитывают чашки, на которых выросло не менее 15 колоний.

Пример расчета содержания живых микробных клеток в 1 дозе

испытуемого образца:

– из разведения  $10^{-7}$  выросло 42 и 45 колоний; среднее арифметическое равно  $(42+45) : 2 = 43,5$ ;

– из разведения  $10^{-6}$  выросло 410 и 450 колоний; среднее арифметическое равно  $(410+450) : 2 = 430$ ;

– количество живых бактерий в 1 дозе равно:

$$(43,5 \cdot 10^7 + 430 \cdot 10^6) : 2 \cdot 10 = 4325000000 = 4,3 \cdot 10^9.$$

Умножают среднюю арифметическую числа колоний на степень разведения и в том случае, если высев на чашку Петри сделан в объеме 0,1 мл, умножают на коэффициент 10 для пересчета на 1,0 мл.

## **2. Метод предельных разведений с последующим высевом на жидкие и полужидкие питательные среды**

### ***2.1. Пробирочный метод наиболее вероятных чисел (определение количества живых ацидофильных лактобактерий)***

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  (степень разведения зависит от количества КОЕ в испытуемом образце) высевают по 1 мл микробной суспензии от каждого разведения в 2 пробирки с 9 мл стерильного обезжиренного молока. Отмечают, из какого именно разведения сделан посев. Разведение  $10^{-6}$  препарата в 0,9 % растворе натрия хлорида соответствует разведению  $10^{-6}$  в молоке. Для контроля среды добавляют 4 незасеянные пробирки с молоком. Засеянные и контрольные пробирки инкубируют при температуре  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 3–4 сут.

По окончании инкубации определяют количество пробирок со свернувшимся молоком. Из сгустка с культурой готовят мазки и окрашивают по Граму. Если в мазках видны характерные бактерии и отсутствует посторонняя микрофлора, то данное разведение учитывают, как содержащее микроорганизмы данного вида. В случае сквашивания молока в контрольных пробирках и при обнаружении посторонней микрофлоры в мазках, контроль проводят на новой партии среды.

### *Учет результатов*

При подсчете количества живых особей используют таблицу Мак-Креди (табл. 1). Сначала составляют числовую характеристику. Она состоит из 3 цифр: на первое место (слева) ставят цифру, равную числу пробирок со свернувшимся молоком, взятых в том последнем разведении, где молоко свернулось во всех пробирках (например, 2 пробирки разведения  $10^{-6}$ ).

Следующие две цифры обозначают число пробирок со свернувшимся молоком в 2 последующих разведениях (например, в 1 пробирке разведения  $10^{-7}$  и в 1 пробирке разведения  $10^{-8}$ ).

Числовая характеристика результата будет 211.

По таблице Мак-Креди находят вероятное число, соответствующее полученной цифровой характеристике (в нашем случае 13), умножают его на разведение, которому соответствует первая цифра числовой характеристики (в данном примере –  $10^{-6}$ ). Тогда количество живых особей микроорганизмов в 1 дозе составляет  $13 \cdot 10^6 = 1,3 \cdot 10^7$ .

Таблица 1 – Таблица Мак-Креди, используемая при подсчете количества живых ацидофильных лактобактерий

Числовая характеристика	Наиболее вероятное число микроорганизмов при посеве в 2 параллельные пробирки
200	2,5
201	5,0
202	-
210	6,0
211	13,0
212	20,0
220	25,0
221	70,0

### ***2.2. Пробирочный метод учета колоний в полужидкой среде***

Из разведений препарата  $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$  (степень разведения зависит от количества КОЕ в испытуемом образце) высевают по 1 мл микробной суспензии в пробирки, содержащие 9 мл полужидкой

питательной среды. Отмечают, из какого именно разведения сделан посев. Разведение  $10^{-6}$  препарата в 0,9 % растворе натрия хлорида соответствует разведению  $10^{-6}$  в питательной полужидкой среде.

Посевы инкубируют при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в зависимости от вида микроорганизма в течение 1–6 сут. По окончании инкубации отмечают разведения, в которых имеется рост типичных колоний для данного вида микроорганизмов.

#### *Учет результатов*

В ряду последовательных десятикратных разведений испытуемого образца в полужидкой питательной среде должно наблюдаться 10-кратное уменьшение количества колоний микроорганизмов.

Количество живых бактерий в дозе испытуемого препарата вычисляют путем умножения количества колоний в пробирке на величину разведения микробной суспензии в данной пробирке (объем вносимого материала в 1,0 мл дает коэффициент умножения 1, который не влияет на конечный результат при вычислении).

### **3. Определение количества живых бактерий в поликомпонентных пробиотиках**

#### ***3.1 Комбинированный метод (определение количества бифидо- и колибактерий)***

Для определения количества живых бактерий в составе препарата пробиотика из соответствующих последовательных десятикратных разведений испытуемого образца в 0,9 % растворе натрия хлорида (с  $10^{-1}$  по  $10^{-9}$ ) проводят высевы на среду Блаурокка с натрия азидом (учет бифидобактерий) и на среду Эндо (учет колибактерий).

Для определения количества бифидобактерий по 1 мл микробной суспензии из разведений  $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$  высевают в пробирки, содержащие 9 мл полужидкой питательной среды Блаурокка с азидом натрия (отмечая разведение, из которого сделан посев). При этом учитывают, что разведение



$10^{-6}$  препарата в 0,9 % растворе натрия хлорида соответствует разведению  $10^{-6}$  в среде Блаурокка с азидом натрия. Посевы в среде Блаурокка с азидом натрия инкубируют при температуре  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 4 – 5 сут.

Для определения количества кишечных палочек делают посев по 0,1 мл микробной суспензии из разведений испытуемого образца  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  на чашки Петри со средой Эндо (по 2 чашки от каждого разведения). Суспензию равномерно распределяют по поверхности среды Эндо шпателем Дригальского до полного впитывания (высыхания) суспензии. Чашки закрывают и помещают перевернутыми вверх дном в термостат для инкубации. Посевы на среде Эндо инкубируют при температуре  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  в течение 18–24 ч.

#### *Учет результатов*

В среде Блаурокка с натрия азидом по окончании инкубации отмечают разведения, в которых имеется рост колоний в виде «гвоздиков». Количество живых бактерий в дозе вычисляют путем умножения количества колоний в пробирке на величину разведения микробной суспензии в данной пробирке.

На среде Эндо по окончании инкубации производят подсчет выросших на чашках Петри колоний и вычисляют содержание живых бактерий в 1 дозе препарата. При подсчете учитывают чашки, на которых выросло не менее 15 колоний. Пример для расчета аналогичен описанному в подразделе 1.

## **Раздел 2. Активность кислотообразования**

Кислотообразующую активность штаммов-продуцентов, входящих в состав лакто- и бифидосодержащих пробиотиков для медицинского применения определяют по титруемой кислотности при культивировании бактерий в адекватной питательной среде. Испытание количественного определения кислотообразующей активности проводят методом кислотно-основного титрования.

Для выращивания бифидобактерий используют полужидкую модифицированную печеночную среду Блаурокка, для лактобактерий – МРС-

1 или стерильное обезжиренное молоко, если нет других указаний в нормативной документации.

***Реактивы, используемые в испытании:***

- титрованный 0,1 М раствор натрия гидроксида;
- индикатор – 1% раствор фенолфталеин.

***Особенности отбора и подготовки образцов для анализа***

От каждой испытуемой серии лекарственного средства, независимо от ее объема, методом случайной выборки отбирают по 2 образца. В случае, если испытуемый образец (т.е. таблетка/капсула/суппозиторий) содержит 1 дозу, то в 1 образец объединяют 3 таблетки/капсулы/суппозитория.

Испытания проводят, соблюдая правила асептики.

*Особенности подготовки испытуемого образца в зависимости от лекарственной формы (если нет других указаний в нормативной документации):*

1. *Лиофилизаты* – испытуемый образец (каждый образец в отдельности) разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу препарата и перемешивают пипеткой 8–10 раз.

По 2,5 мл полученной суспензии каждого образца вносят в пробирки вместимостью 50 мл, содержащие по 25 мл питательной среды. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$  и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации зависят от вида микроорганизма).

2. *Таблетки* – каждый образец в отдельности предварительно растирают (асептически) в ступке до гомогенного состояния и дробно добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8–10 раз.

По 2,5 мл полученной суспензии каждого образца вносят в пробирки вместимостью 50 мл, содержащие по 25 мл питательной среды. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре  $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$  и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации зависят от вида

микроорганизма).

3. *Порошки* – содержимое саше асептично пересыпают в пробирку, вместимостью 50 мл, содержащую 25 мл питательной среды, и перемешивают. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации зависят от вида микроорганизма).
4. *Капсулы* – каждый образец в отдельности вносят в пробирки вместимостью 50 мл, содержащие по 30 мл питательной среды адекватной для вида микроорганизма, входящего в состав препарата. Пробирки помещают на водяную баню при температуре  $(39 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Через 20–30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации зависят от вида микроорганизма).
5. *Суппозитории* – каждый образец в отдельности вносят в пробирки вместимостью 50 мл, содержащие по 30 мл питательной среды, адекватной для вида микроорганизма, входящего в состав препарата. Пробирки помещают на водяную баню при температуре  $(39 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Через 20–30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния. Пробирки с посевами испытуемых образцов помещают в термостат при температуре  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  и инкубируют в течение 48 – 72 ч (сроки инкубации определяются видом микроорганизма).

#### Примечание.

После окончания инкубации суспензию в пробирках освобождают от липофильной суппозиторной основы одним из следующих способов:

- сразу после окончания инкубирования при температуре посевов  $(38 \pm 1) ^\circ\text{C}$  стерильной пипеткой удаляют растопленный верхний слой жира;
- пробирки охлаждают при температуре от 2 до 8  $^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 5)$  мин, затем застывшую суппозиторную основу снимают асептически пастеркой с загнутым концом или бактериологической петлей.

#### *Методика испытания*

Уровень кислотообразования определяют в каждом из 2 образцов.

После окончания инкубации содержимое пробирки перемешивают отдельной пипеткой 8–10 раз. Каждую пробу в объеме 10 мл вносят в отдельную коническую колбу или стакан вместимостью 100 мл.

Штаммы-продуценты, выращенные в стерильном обезжиренном молоке, образуют сгусток. Образовавшийся сгусток разбивают путем тщательного перемешивания (10-12 раз) пипеткой вместимостью 10 мл. После этого 10 мл микробной суспензии переносят из пробирки с культуральной средой в коническую колбу вместимостью 100 мл, содержащую 20 мл воды очищенной. Колбу интенсивно встряхивают для равномерного перемешивания содержимого, затем прибавляют 2–3 капли 1% раствора фенолфталеина.

Полученную суспензию титруют 0,1 М раствором натрия гидроксида до появления стойкого слабо-розового окрашивания и достижения рН (8,5±0,1) (контролируют потенциометрически), при этом учитывают количество миллилитров 0,1 М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование.

#### *Учет результатов*

Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т) и вычисляют по формуле:

$$^{\circ}\text{T} = A \cdot K \cdot 10,$$

где:  $A$  – количество миллилитров 0,1М раствора натрия гидроксида, пошедшее на титрование 10 мл исследуемой микробной суспензии;

$K$  – поправка к титру 0,1 М раствора натрия гидроксида;

10 – объем микробной суспензии, мл.

Пример расчета: на титрование 10 мл микробной суспензии пошло 10,6 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, где  $K = 1,03$ , тогда:

$$\text{T} = 10,6 \cdot 1,03 \cdot 10 = 109,18 \text{ } ^{\circ}\text{T}$$

Вычисляют средний показатель из 2 параллельных проб от каждого

образца (пробирки) и средний показатель из 2 образцов (пробирок) при условии, если показатель активности кислотообразования каждого из них был не ниже регламентированного.

### **Раздел 3. Антагонистическая активность**

Антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов оценивают как у штаммов-продуцентов, так и у препаратов пробиотиков, полученных на их основе. Определение антагонистической активности штаммов-продуцентов, входящих в пробиотики для медицинского применения, проводят с помощью метода отсроченного антагонизма.

При проведении испытания применяют питательную среду, адекватную для данного вида бактерий (если нет других указаний в нормативной документации):

- для лактобактерий и бифидобактерий – среду МРС-5;
- для кишечной палочки и споровых пробиотиков – среду Гаузе № 2.

#### ***Тест-штаммы микроорганизмов***

Тест-штаммы микроорганизмов, используемые в испытании, приведены в табл. 2. Их получают в лиофилизированном виде (в ампулах) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» (если нет других указаний в нормативной документации) с сертификатом соответствия (паспортом на штамм).

Таблица 2 – Тест-штаммы микроорганизмов, используемых в испытаниях по отсроченному антагонизму

Тест-штамм микроорганизма	Номер штамма
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 (FDA 209P)
<i>Escherichia coli</i>	O157
<i>Shigella flexneri</i>	170, 337
<i>Shigella sonnei</i>	5063
<i>Proteus mirabilis</i>	H-237 или 56/10
<i>Proteus vulgaris</i>	177 или 401

*Восстановление лиофилизированных тест-штаммов микроорганизмов*

Ампулы с тест-культурами микроорганизмов вскрывают в асептических условиях в соответствии с инструкцией производителя.

Для восстановления жизнеспособности культуры необходимо не менее двух пересевов на адекватной питательной среде (соответствующей потребностям используемого микроорганизма) с инкубацией в стандартных условиях. Для получения изолированных колоний второй пересев культуры тест-штамма проводят на адекватной плотной питательной среде при инкубации в стандартных условиях.

Температура инкубации посевов бактерий ( $32,5 \pm 2,5$ ) °С, грибов – ( $22,5 \pm 2,5$ ) °С, если нет других указаний в нормативной документации.

По окончании инкубации изучают морфологию выросших колоний, микроскопируют мазки, окрашенные по Граму, изучают биохимические свойства с использованием тест-систем, разрешенных к использованию. Тест-штамм микроорганизма должен обладать типичными морфологическими, тинкториальными, культуральными, биохимическими свойствами в соответствии с представленным сертификатом коллекции.

Тест-штаммы микроорганизмов в лиофилизированном виде хранятся при температуре ( $6 \pm 2$ ) °С в течение 24 мес.

Допускается не более 5 пассажей от исходной культуры.

*Приготовление тест-штаммов микроорганизмов для испытания* Для испытания используют культуры, выращенные в течение ( $22 \pm 2$ ) ч, второго или третьего пассажа, которые инкубируют на адекватной плотной питательной среде в адекватных условиях. Выросшую чистую культуру смывают 0,9 % раствором натрия хлорида с поверхности плотной питательной среды. Полученную суспензию собирают в стерильную посуду (флакон, пробирку и т.д.). Доводят концентрацию микробных клеток в полученной суспензии в соответствии со стандартным образцом мутности 5

ОЕ в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток».

#### *Отбор и подготовка образцов для анализа*

Методом случайной выборки отбирают образцы от каждой серии препарата. Посевы проводятся в стерильных условиях.

Пробиотические производственные штаммы-продуценты (лиофилизаты) восстанавливают до первоначально высушенного объема (но не менее  $10^7$  микробных клеток/мл), добавляя в лиофилизат стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида.

*Особенности подготовки испытуемого образца препарата пробиотиков в зависимости от лекарственной формы (если нет других указаний в нормативной документации):*

1. *Лиофилизаты* – разводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8–10 раз.
2. *Таблетки* – предварительно растирают в ступке (асептически) до гомогенного состояния мелко добавляют 0,9 % раствор натрия хлорида из расчета 1 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8–10 раз.
3. *Порошки* – содержимое пакета (саше) высыпают в пробирку, содержащую 25 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, и перемешивают путем энергичного встряхивания в течение 10 мин.
4. *Капсулы* – содержимое капсулы вносят в пробирку, добавляют 1 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида и перемешивают до гомогенного состояния.
5. *Суппозитории* – вносят в пробирку, добавляют до общего объема 10 мл стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида, предварительно нагретый до температуры  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Пробирки с суппозиториями помещают на водяную баню при температуре  $(39 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . Через 10–30 мин содержимое пробирок перемешивают до гомогенного состояния и освобождают от жировой основы (как описано выше в разделе 2).

#### *Методика испытания*

Полученную суспензию испытуемого образца перемешивают и

высевают бактериологической петлей диаметром  $(3,5 \pm 0,5)$  мм на 6 чашек Петри с питательной средой, проводя по 2 параллельных штриха длиной, равной диаметру чашки.

После инкубирования в течение 48–96 ч при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в адекватных (аэробных, микроаэрофильных или анаэробных) условиях в зависимости от вида микроорганизма к выросшей культуре испытуемого образца подсевают культуры тест-штаммов (в соответствии с требованиями нормативной документации). Подсев тест-штаммов производят петлей диаметром  $(1,75 \pm 0,25)$  мм в направлении, перпендикулярном зоне роста изучаемого микроорганизма, и не касаясь его. Чашки Петри перевернутые вверх дном инкубируют при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в течение 18–20 ч (если нет других указаний в нормативной документации).

Контролем роста тест-штаммов служит их параллельный посев на чашки с той же питательной средой без испытуемой культуры.

#### *Учет результатов*

Учитывают величину зоны отсутствия роста тест-штамма, выраженную в мм. Чем больше величина угнетения роста тест-культур, тем выше антагонистическая активность испытуемого штамма.

Если нет других указаний в нормативной документации, антагонистическую активность штаммов-продуцентов, входящих в пробиотики для медицинского применения, считают высокой, если:

- зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 20 мм – для штаммов-продуцентов, входящих в лактосодержащие пробиотики;
- зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 15 мм – для штаммов-продуцентов, входящих в коли-, бифидосодержащие пробиотики.
- зоны угнетения роста тест-штаммов не менее 10 мм - для штаммов-продуцентов, входящих в споросодержащие пробиотики