

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Производственные пробиотические
штаммы и штаммы для контроля
пробиотиков**

ОФС.1.7.2.0012.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на штаммы микроорганизмов, используемые для производства пробиотиков для медицинского применения. Для производства пробиотиков для медицинского применения используют производственные штаммы микроорганизмов с подтвержденным клиническим терапевтическим действием, депонированные в национальной или международной коллекции.

В настоящей общей фармакопейной статье изложены требования к отбору, проверке и хранению рекомендуемых штаммов микроорганизмов (система предрегистрационного доклинического изучения безопасности рекомендуемых штаммов), требования к системе надзора за производственными и посевными культурами, используемыми при производстве пробиотиков, требования к биологическим свойствам тест-штаммов микроорганизмов, рекомендуемых для контроля антагонистической активности производственных штаммов и готовых лекарственных форм пробиотиков.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Идентификация и дифференциация бактерий – определение родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизмов и их свойств – наиболее ответственный этап микробиологического исследования. Он

осуществляется на основании изучения комплекса фенотипических и генотипических свойств микроорганизмов.

Организмы, обладающие одинаковыми генотипами, в разных условиях могут отличаться по фенотипу, т.е. может наблюдаться некоторое разнообразие фенотипов.

В ходе идентификации микроорганизмов определяют ряд фенотипических признаков: морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные свойства, антигенная структура, спектр чувствительности к антибиотикам, бактериофагам и бактериоцинам, токсигенность; а также характеризуют их генотип – определяют нуклеотидный состав ДНК и содержание Г+Ц-пар в ДНК, степень гомологии ДНК, профиль плазмидной ДНК, электрофоретип, степень вирулентности.

Идентификацию штаммов по генотипическим признакам проводят по степени ДНК – ДНК-гибридизации и содержанию Г+Ц пар нуклеотидных оснований. В настоящее время приемлемым способом является идентификация 16S рРНК, выявляющая консервативные нуклеотидные последовательности исследуемых микроорганизмов.

При характеристике микроорганизмов следует использовать генетические и фенотипические методы, позволяющие сопоставлять последовательности генов и фенотипические признаки исследуемых культур микроорганизмов с музейными штаммами национальных или международных коллекций.

Для дифференцирования патогенных и апатогенных штаммов внутри вида информативным методом является обнаружение в составе ДНК бактериальной клетки геномных «островков» патогенности. Повышенная их лабильность связана с тем, что они могут входить в состав транспозонов, плазмид и включаться в геном бактериофагов, формируя у разных непатогенных видов бактерий вирулентность.

Все перечисленные исследования должны выполняться в аккредитованной лаборатории с использованием современного оборудования

и технологий.

К пробиотическим производственным штаммам предъявляются следующие требования.

1. Предлагаемый штамм должен быть идентифицирован до вида по фено- и генотипическим признакам и по профилю плазмидной ДНК. Штамм, имеющий R-плазмиды, транспозоны, конвертируемые бактериофаги (профаги), не может быть использован при производстве пробиотиков. При обнаружении других разновидностей плазмид следует представить материалы по характеристике их функциональных свойств. Устойчивость штамма к антибиотикам должна быть обусловлена только хромосомной природой, что необходимо подтверждать при ее выявлении.

2. Генетически модифицированные микроорганизмы должны стабильно экспрессировать клонированные целевые гены и при многократном пассировании *in vivo* на культуре клеток или при введении лабораторным животным должны сохранять исходные биологические свойства. Должны быть экспериментально установлены отсутствие неконтролируемой передачи клонированной ДНК «новым хозяевам» и невозможность широкого распространения их плазмид, следствием чего может быть нарушение микробной экосистемы; т.е. должна быть доказана их биобезопасность. Рекомбинантная ДНК, используемая для получения генетически модифицированных штаммов микроорганизмов, не должна содержать маркеров антибиотикорезистентности.

3. Штамм, независимо от вида и рода, должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, культуральными свойствами без признаков диссоциации. Не допускается образование слизистых колоний пробиотическими производственными штаммами и наличие у них капсул, которые являются признаками вирулентности бактериальных культур. Штамм с неясной характеристикой не может использоваться для производственных целей (раздел 1).

4. Штамм должен быть однороден по физиолого-биохимическим свойствам, охарактеризованным с помощью регламентированных методов или с использованием зарегистрированных тест-систем. Штаммы с неясной биохимической характеристикой не могут быть рекомендованы в качестве производственных (раздел 1).

5. Штамм не должен продуцировать ферменты, относящиеся к факторам патогенности, например, каталазу, гиалуронидазу, фибринолизин, плазмокоагулазу, гемолизин, летициназу С, нейраминидазу и др. (раздел 1).

6. Штамм должен обладать антагонистической активностью по отношению к клиническим свежевыделенным патогенным и условно-патогенным микроорганизмам и сертифицированным тест-штаммам (в соответствии с требованиями нормативной документации). Зона угнетения роста тест-культур должна быть более 10 мм (раздел 2).

7. Штамм не должен обладать высокими адгезивными свойствами (раздел 3).

8. Штамм должен обладать высокой устойчивостью к воздействию желудочного сока, желчи, щелочи или быть защищенным от их воздействия в лекарственной форме пробиотика (раздел 1).

9. Штамм должен быть охарактеризован по способности продуцировать биологически активные вещества (например, ферменты, витамины, кислоты, лизоцим, бактериоцины, антибиотикоподобные вещества и др.) (раздел 1).

10. Штаммы всех видов микроорганизмов, предлагаемые для производства пробиотиков, должны быть невирулентными, нетоксигенными, нетоксичными, безопасными для людей, включая, при необходимости, иммунологическую безопасность. Исследование осуществляют в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков для медицинского применения» (раздел 3).

11. Штаммы, предлагаемые в качестве кандидатов на применение в составе пробиотика, должны быть изучены на лабораторных моделях для

оценки механизма их терапевтического действия при введении способом, рекомендованным для человека.

12. В готовой форме препарата пробиотика оценивают соотношение терапевтической и безопасной дозы (клинические исследования, фаза I – оценка переносимости, безопасности, терапевтического действия, подтверждение механизма действия), сохранение способности к продукции биологически активных веществ, наличие живых микробных клеток на протяжении срока годности экспериментально-производственных серий препарата.

13. Рекомендуемый для изготовления пробиотических препаратов штамм должен быть депонирован в официальной национальной или международной коллекции с указанием источника и даты выделения, характеристики его биологических свойств.

Штаммы, используемые при производстве пробиотиков, должны быть проверены по всем биологическим свойствам в соответствии с регламентированными требованиями. Проверка проводится не реже 1 раза в год.

Подлинность. Штамм должен быть идентифицирован до вида с помощью микробиологических методов (например, микроскопического, бактериологического, биохимического и т.п.), которые могут быть дополнены методами молекулярной биологии (например, амплификация нуклеиновых кислот или секвенирование для подтверждения стабильности генома штамма). Штамм должен обладать однородными морфологическими, тинкториальными, биохимическими и культуральными свойствами без признаков диссоциации.

Специфическая безопасность. Безопасность штамма определяется биологическими методами *in vivo* (например, исследованием безвредности, токсичности, токсигенности, вирулентности и т.п.) в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», которые могут быть дополнены

методами молекулярной биологии для подтверждения стабильности первоначальных биологических свойств.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Испытание выполняют с использованием разнообразных селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост всех вероятных контаминантов. Штамм не должен содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное содержание живых микроорганизмов штамма. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков». Содержание живых микроорганизмов выражают в определенном объеме (в 1 мл, в 1 дозе, в 1 ампуле/флаконе).

Антагонистическая активность. Антагонистическую активность штамма в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют микробиологическим методом, например, методом отсроченного антагонизма на плотной среде по зонам задержки роста тест-штаммов или методом совместного культивирования (определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков»). Штамм должен проявлять антагонистическую активность по отношению к тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не должен угнетать рост представителей нормофлоры. Тест-штаммы должны быть депонированы в национальной или международной коллекции с указанием источника и даты выделения, характеристики биологических свойств. Перечень тест-штаммов для контроля антагонистической активности определяют на основании результатов клинических (лечебное действие) и микробиологических (влияния на определенную группу патогенных и условно-патогенных микроорганизмов) испытаний эффективности и безопасности конкретных групп препаратов.

Кислотообразующая активность. Определение активности кислотообразования препарата проводят титриметрическим методом в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков». Кислотность выражают в градусах Тернера (°Т).

Хранение и упаковка. Производственный штамм, расфасованный в первичную упаковку (ампулы, флаконы), в лиофилизированном виде хранят при температуре, обеспечивающей его стабильность.

Коллекцию производственного штамма хранят при температуре минус 15 °С и ниже. Производственный штамм регистрируют в специальном журнале, в который вносят всю необходимую информацию о движении культуры (посевах) производственного штамма и результаты его контроля. Ответственность за производственный штамм несет определенный назначенный сотрудник.

Производственный штамм, находящийся в коллекции предприятия, проверяется 1 раз в год по всем показателям, утвержденным в разработанной для него нормативной документации.

Этап получения посевной культуры

Посевную культуру микроорганизмов получают из производственного штамма, выращенного на оптимальной питательной среде (не более 4-го пассажа) в соответствующих условиях методом поверхностного или глубинного культивирования с последующей лиофилизацией в количестве, необходимом для обеспечения производства посевной культурой на протяжении 1 года, если в нормативной документации не указаны другие требования.

При необходимости использования штамма при производстве лекарственной формы препарата готовят посевную серию штамма в количестве, необходимом для выпуска определенного количества серий препарата. Для этого из коллекции штаммов берут 2 – 3 ампулы полностью проконтролированного штамма и осуществляют его посев на оптимальные для штамма питательные среды. Для высушивания посевной серии штамма

используют 2 –4 пассаж. Штамм может быть высушен в вакуумных ампулах или во флаконах, обеспеченных вакуумной крышкой. На этикетку ампулы или флакона наносят следующие сведения: наименование штамма, порядковый номер серии, дата лиофилизации, срок годности, номер хранилища или контейнера.

Производственную серию штамма контролируют не реже 1 раза в год по основным показателям качества, указанным в нормативной документации. Результаты контроля фиксируют в специальном журнале и отражают в паспорте штамма.

Посевная культура должна соответствовать следующим требованиям:

Подлинность. Подлинность посевной культуры определяется микробиологическими методами. Культура должна обладать однородными морфологическими и культуральными свойствами без признаков диссоциации.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Испытание выполняют с использованием селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост контаминантов. Культура не должна содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Специфическая безопасность. Посевная культура должна быть безопасна при внутрибрюшинном, внутривенном, пероральном введении мышам с массой тела 15 ± 1 г. Вид испытания определяется индивидуально в зависимости от видовой принадлежности посевной культуры и способа назначения лечебного препарата. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в опытах *in vivo*».

Количественное содержание живых микроорганизмов штамма. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков». Содержание живых микроорганизмов выражают в определенном объеме (в 1 мл, в 1 ампуле/флаконе).

Хранение и упаковка. Посевную культуру хранят в лиофильно высушенном состоянии при температуре, обеспечивающей сохранение первоначальных биологических свойств на протяжении срока годности. На этикетку ампулы (флакона) с высушенным штаммом наносят следующие сведения: наименование и номер штамма, дата лиофилизации, порядковый номер лиофилизации, срок годности.

Посевную серию штамма контролируют не реже 1 раза в год по основным показателям качества, указанным в нормативной документации. Результаты контроля фиксируют в специальном журнале и отражают в паспорте штамма.

Раздел 1. Изучение морфологических, тинкториальных и культуральных свойств пробиотических штаммов

1.1 Изучение морфологии и тинкториальных свойств культур

1.1.1. Микроскопия живых бактерий

Микроскопический метод исследования предусматривает наблюдение за живыми и убитыми микробами в окрашенном и неокрашенном (нативном) состоянии (метод «раздавленной» и «висячей» капли).

1.1.2. Окрашивание бактерий

На обезжиренном предметном стекле готовят мазок из микробной культуры, сушат и фиксируют его над пламенем горелки или химическим способом в смеси Никифорова. Затем окрашивают с помощью готовых наборов красителей или тест-систем, разрешенных к использованию, выбирая наиболее адекватный метод в зависимости от вида изучаемых микроорганизмов (по Граму – для выявления грамотрицательных и грамположительных бактерий; по методу Циля–Нильсена – для окрашивания кислотоустойчивых бактерий и обнаружения спор (в некоторых случаях); по способу Бурри или Бурри–Гинса – для выявления наличия капсул; по способу Ожешко (Ауески) или Пешкова – для выявления спор; по методу Нейссера – для выявления зерен волютина; по Романовскому–Гимзе – для

изучения структуры протоплазмы и ядра клеток эукариотов при необходимости).

1.2 Изучение культуральных свойств штамма

Культуральные свойства характерны для каждого вида бактерий, поэтому являются важным дифференцирующим признаком. Культуральные признаки микроорганизмов определяют характером их роста на плотных, жидких и полужидких питательных средах различного назначения. Посев культур на плотные питательные среды проводят с применением методов, позволяющих получить изолированные колонии.

В паспорте на штамм следует описать размер, форму колоний, характер контура края, рельеф и поверхность колонии, цвет, структуру и консистенцию колонии. Подробно описать характер роста культуры на жидких и полужидких средах. Характеристика культуральных свойств включает также учет особенностей культивирования – температурные границы роста, газовый состав атмосферы, влажность атмосферного воздуха, освещенность, время экспозиции и др. Рост культуры следует изучать при минимальной, оптимальной и максимальной температуре роста, при выращивании в аэробных, анаэробных или микроаэрофильных условиях.

При правильном отборе и поддержании штамма культуры должны сохранять однородность по морфологическим и культуральным свойствам и не проявлять признаков диссоциации клеток и колоний. Не допускается присутствие среди исследуемых штаммов других микроорганизмов, отличающихся по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам от клеток и колоний предлагаемого производственного штамма

1.3 Изучение физиолого-биохимических свойств штамма

1.3.1 Сахаролитические свойства бактерий

Изучение способности бактерий ферментировать углеводы используется для идентификации и дифференциальной диагностики микроорганизмов. Сахаролитическую активность предлагаемого штамма

изучают с помощью зарегистрированных диагностических тест-систем для идентификации бактерий.

Предлагаемый производственный штамм должен полностью соответствовать по этим свойствам типовым штаммам видовой принадлежности согласно современной классификации Определителя бактерий Берджи. Штаммы с неясной характеристикой не могут быть рекомендованы в качестве производственных.

1.3.2 Протеолитические свойства бактерий

В процессе культивирования микроорганизмы выделяют во внешнюю среду различные протеолитические ферменты, которые можно разделить условно на 2 группы. В первую группу следует включить ферменты, относящиеся к факторам патогенности (например, гиалуронидаза, фибринолизин, плазмокоагулаза, гемолизин, лицитиназа С, лизоцим, нейраминидаза). Во вторую группу следует отнести ферменты, принимающие участие в обмене веществ микроорганизмов (дыхании и питании). Они расщепляют белки, пептиды, аминокислоты, в результате чего образуются легкоусвояемые микроорганизмами продукты питания и продукты метаболизма – кислоты, перекиси, индол, сероводород и др.

Для оценки протеолитических свойств первой и второй групп чаще всего используются нижеприведенные методы.

2.1 Ферменты, относящиеся к факторам патогенности

2.1.1 Тест на каталазную активность

Каталазная активность свойственна большинству патогенных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. Облигатные анаэробы и многие микроаэрофилы каталазу не образуют.

Известно, что отсутствие способности образовывать каталазу является характерным признаком молочнокислых бактерий. Однако у некоторых лактобактерий рядом авторов обнаружена каталазная активность в присутствии определенных субстратов или благодаря наличию у них так называемой псевдокаталазной активности. Псевдокаталаза обнаружена у

штаммов *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* при выращивании их на питательном агаре с низким содержанием (до 0,05 %) глюкозы. Собственно каталаза проявляет свою активность на средах с гретой кровью или гематином, тогда как псевдокаталаза – на средах с низкой концентрацией глюкозы (например, на среде Фелтона, содержащей 0,05 % глюкозы). Эти ферменты не образуются при выращивании микроорганизмов на агаре с 1 % глюкозы без добавления гематина или гретой крови. В свою очередь, на активность каталазы не влияет присутствие в среде 2 % глюкозы, а также снижение рН среды с 7,0 до 4,5. Поэтому выявление продукции каталазы и псевдокаталазы осуществляют на следующих средах: основная среда, гематиновый агар, основная среда с 0,05 % глюкозы, основная среда с 1 % глюкозы. Основную среду и гематиновый агар разливают в чашки Петри, основные среды с 0,05 и 1 % глюкозы скашивают в пробирках. Посев испытуемых кисломолочных культур и тест-культуры (каталазо-положительной) осуществляют так, чтобы получить рост отдельных колоний.

Для выявления каталазной активности наносят каплю 10 % раствора водорода пероксида на колонию или приливают к суспензии клеток. Выделение кислорода, хорошо заметное по образованию пузырьков газа, свидетельствует о продукции каталазы исследуемым штаммом.

Положительный контроль – тест-штамм: *S. aureus* ATCC 6538-Р.

Отрицательный контроль – тест-штамм: *E. faecalis* ССМ 4224.

Предлагаемый производственный штамм должен быть каталазо-отрицательным.

Для выявления псевдокаталазы используют среду Фелтона (Felton, et al., 1958).

Примечания.

1. Приготовление основной среды. Мясной экстракт – 0,5 г; пептон – 0,5 г; дрожжевой экстракт – 0,5 г; твин-80 – 0,05 мл; марганца сульфата тетрагидрат – 0,01 г; глюкоза – 1 г; агар микробиологический – 1,5 г; вода очищенная – до 100 мл; рН среды 6,8 – 7,0. Стерилизацию проводят при

температуре 121 °С в течение 15 мин. К 95 мл расплавленной основной среды добавляют 5 мл смеси (1:1) дефибринированной бычьей крови и воды, после чего её прогревают при температуре 100 °С в течение 15 мин для разрушения каталазы крови.

2. Приготовление гематинового агара. Пропись среды аналогична прописи основной среды. Вместо крови добавляют гематин в количестве 50 мкг/мл из основного раствора. Его готовят внесением 50 мг гематина в 10 мл воды очищенной, после чего добавляют 0,1 М раствор натрия гидроксида в объеме, необходимом для растворения гематина. После этого раствор прогревают при температуре 100 °С в течение 15 мин.

3. Приготовление среды Фелтона. Триптон – 1,0 г; глюкоза – 0,05 г; калия фосфат однозамещенный – 0,2 г; натрия хлорид – 0,5 г; дрожжевой экстракт – 0,5 г; агар микробиологический – 1,5 г; вода очищенная – до объема 100 мл; рН 6,8 – 7,0. Среду стерилизуют, разливают в чашки Петри. На этой среде исследуется способность бактерий разлагать водорода пероксид в присутствии незначительных концентраций глюкозы.

2.1.2 Тест на продукцию лецитиназы

Некоторые патогенные и условно-патогенные штаммы микроорганизмов могут продуцировать лецитиназу С (лецитовителлазу), вызывающую деполимеризацию мембран клеток хозяина. Ее наличие определяют по способности бактерий разрушать лецитин, входящий в состав желтка куриного яйца.

В пробирку с бульоном, содержащим желток куриного яйца, вносят 1 петлю суточной культуры, выращенной на плотной питательной среде, и инкубируют при (37 ± 1) °С в течение 24 ч. По истечении срока инкубации регистрируют наличие беловатой мути и всплывающих хлопьев, свидетельствующих о продукции микроорганизмом лецитиназы.

Положительный контроль – *S. aureus* 6538-Р АТСС; *S. aureus* «Жаев», *S. aureus* «Виотко».

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* 14990 АТСС.

Предлагаемый производственный штамм не должен продуцировать лецитиназу.

Примечания.

1. Приготовление бульона с яичным желтком. Один свежий яичный желток асептически вносят в 400 мл стерильного мясопептонного бульона (МПБ), хорошо перемешивают, разливают в стерильные пробирки по 4 – 5 мл и выдерживают в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24 ч для проверки на стерильность (среда в пробирках не должна мутнеть).

2. Приготовление плотной среды для выявления летициназы. Среда предназначена для выявления фермента у стафилококков, иерсиний и некоторых анаэробов.

Состав среды:

- Гидролизат казеина панкреатический 40,0 г
- Натрия гидроортофосфат 5,0 г
- Калия гидроортофосфат 1,0 г
- Натрия хлорид 2,0 г
- Магния сульфат гептагидрат 0,1 г
- Глюкоза 2,0 г
- Агар микробиологический 25,0 г

Вода очищенная до 1000 мл

Ингредиенты смешивают, растворяют при нагревании в 1000 мл воды. Устанавливают pH 7,6, стерилизуют при температуре $121 ^\circ\text{C}$ в течение 15 мин. Основа среды бледно-желтого цвета. К охлажденной до температуры $50\text{--}55 ^\circ\text{C}$ основе добавляют 2 желтка куриного яйца (1 желток на 500 мл среды). Перед использованием яйца тщательно моют в теплой воде, выдерживают 1 ч в 96 % спирте этиловом. Готовую среду разливают в чашки Петри.

3. Приготовление желточно-солевого агара. Среда предназначена для выявления фермента лецитиназы у стафилококков.

Состав среды:

- Мясопептонный агар(МПА) 1000 мл
- Натрия хлорид 90,0 г
- Желточная взвесь (1 желток на 200 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида) 150,0 мл

К охлажденной до температуры $50\text{--}55 ^\circ\text{C}$ основе (солевому агару) добавляют 150 мл желточной взвеси. Готовую среду разливают в чашки Петри.

2.1.3 Определение плазмокоагулазной активности

Некоторые патогенные и условно-патогенные штаммы микроорганизмов могут продуцировать плазмокоагулазу, которую можно выявить в тестах *in vitro* с помощью цитратной кроличьей плазмы, сыворотки крови кролика, взятой из сердца, или на специальных питательных средах, в которые добавлена плазма.

Перед исследованием сухую кроличью цитратную плазму разводят 1:5 стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида, затем 0,5 мл разведенной плазмы вносят в стерильную пробирку и в ней суспендируют одну петлю 18 – 20-часовой агаровой культуры испытуемого микроорганизма. Пробирки помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С и через 1; 2; 3; 18 и 24 ч проверяют наличие сгустка в пробирке вследствие свертывания плазмы. Реакция считается положительной независимо от степени свертывания плазмы. В качестве контроля ставят реакцию с коагулазо-положительным и коагулазо-отрицательным стафилококками, обладающим и не обладающим плазмокоагулазой соответственно.

Положительный контроль – *S. aureus* ATCC 6538-P.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990.

Предлагаемый производственный штамм не должен продуцировать плазмокоагулазу.

2.1.4 Определение фибринолитических свойств

Методика исследования основана на способности микроорганизмов, обладающих фибринолизинем, вызывать растворение сгустка плазмы крови.

В стерильные пробирки вносят 0,1 мл цитратной кроличьей плазмы, 0,4 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, 0,25 мл 18 – 20-часовой бульонной культуры испытуемого штамма и 0,25 мл 0,25 % раствора кальция хлорида. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при температуре (37 ± 1) °С. Если в пробирке после 15 – 20 мин инкубации образуется сгусток (так же, как и в контрольной пробирке, в которую вместо бульонной культуры добавляют стерильную питательную среду), и через 2 ч инкубации не отмечается его разжижение, то считают, что испытуемая культура не обладает фибринолитическими свойствами. Если в пробирке не образуется сгусток, или происходит его разжижение после 2 ч инкубирования в указанных условиях, культура характеризуется наличием фибринолизина.

Положительный контроль – *S. pyogenes* «Гуров».

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990; *S. saprophyticus* 15305.

Предлагаемый производственный штамм не должен продуцировать фибринолизин.

2.1.5 Тест на лизоцим (мурамидазу)

Лизоцимную активность штамма определяют методом, который основан на способности лизоцима расщеплять β -(1-4)-гликозидные связи мукополисахаридного комплекса клеточной стенки эталонного тест-штамма *Micrococcus luteus* (*M. lysodeikticus*).

Готовят плотную среду, содержащую инактивированную культуру *M. luteus* NCTC 2665. Для этого предварительно чистую культуру *M. luteus* выращивают в течение 16 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на чашках Петри с МПА. Выросшую культуру смывают 0,9 % раствором натрия хлорида (3 мл на 1 чашку), автоклавируют 15 мин при температуре 120°C и хранят при температуре от 2 до 8°C . В стерильные чашки вносят расплавленную плотную питательную среду, содержащую автоклавированную суспензию микрококка в концентрации $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл по стандартному образцу (СО) мутности.

Испытуемые пробиотические штаммы выращивают в жидкой (или плотной) питательной среде, используемой для их культивирования. Культуру второго пассажа засевают по одной посевной петле (диаметром 2–3 мм) бляшками на подготовленную подсушенную плотную среду, содержащую убитую культуру микрококка. На 1 чашку наносят не более 5 штаммов на равном расстоянии друг от друга и от краев чашки, посевы инкубируют в течение 2–4 сут при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в аэробных, анаэробных или микроаэрофильных условиях в зависимости от вида испытуемого штамма и регистрируют зону лизиса микрококка вокруг выросших колоний испытуемых штаммов.

О степени лизоцимной активности судят по ширине зоны просветления: низкая – 1 – 3 мм, средняя – 4 – 7 мм, 8 мм и более – высокая.

Положительный контроль – *S. aureus* ATCC 6538-P и *S. pyogenes* Dick I.

Перед проведением испытания целесообразно проверить тест-штамм *M. luteus* на лизируемость лизоцимом. Для этого, используя отраслевой стандарт мутности, готовят микробную взвесь с содержанием 10^9 микробных клеток в 1 мл и разливают ее в 2 пробирки по 1 мл. В одну (опытную) пробирку добавляют 8 мкг лизоцима, растворенного в 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, создавая конечную концентрацию фермента 4 мкг/мл. Во вторую (контрольную) пробирку прибавляют 1 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Пробирки выдерживают при комнатной температуре 30 мин. Культура считается пригодной для работы, если за этот период в опытной пробирке произойдет полный лизис клеток микрококка, что определяют по степени прозрачности содержимого пробирки.

Примечание.

Некоторые виды бактерий нормальной микрофлоры (например, *Lactobacillus fermentum*) при отсутствии других факторов патогенности продуцируют лизоцим, что считается положительным свойством этих бактерий, т.к. определяет его антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

2.1.6 Тест на гемолизин

Некоторые бактерии продуцируют такие факторы патогенности, как гемолизины – вещества, разрушающие эритроциты. В связи с этим продукция гемолизина во многих случаях является маркером вирулентности микроорганизма.

На кровяном агаре колонии гемолизирующих бактерий окружены зонами просветления (гемолиза). Для адекватного определения гемолитической активности следует просматривать чашки с посевами против источника света, т.к. способность образовывать гемолизины (и, соответственно, размеры зон гемолиза) может быть вариабельной. Активность гемолизинов может проявляться в полном или неполном разрушении эритроцитов. Виды гемолиза подразделяют на альфа-, бета- и гамма-гемолиз.

А. Альфа-гемолиз – неполное разрушение эритроцитов с сохранением клеточной стромы. Просветление среды вокруг колоний обычно незначительно; среда вокруг колоний может приобретать зеленовато-коричневую окраску вследствие образования метгемоглобина.

Положительный контроль – *S. aureus* ATCC 6538-P; *S. aureus* 0-15.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990.

Б. Бета-гемолиз – полное разрушение эритроцитов с ферментативным обесцвечиванием гемоглобина. Колонии бактерий окружены прозрачными зонами гемолиза различного размера.

Положительный контроль – *S. aureus* «Лепин»; *S. aureus* 5.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990.

В. Гамма-гемолиз – эритроциты остаются без изменения. Гемолитические свойства микробов проявляются по-разному на средах с дефибринированной кровью человека, барана, кролика или морской свинки.

Положительный контроль – *S. aureus* «Лепин»; *S. aureus* 5.

Отрицательный контроль – *S. epidermidis* ATCC 14990.

Для получения изолированных колоний делают посев штрихом 18-часовой исследуемой культуры. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °C в течение 24 – 48 ч, после чего проводят учет результатов.

Для предохранения гемолизинов от разрушения кислородом посев культуры штрихом можно вначале произвести на питательный агар без крови. Затем на первый слой налить 10 мл расплавленного и остуженного до температуры 48 – 50 °C питательного агара с добавлением 5 % крови. Вокруг погруженных в агар колоний гемолиз проявляется более четко. В некоторых случаях гемолиз лучше выявляется, если после 24 – 48 ч инкубации чашек в термостате их помещают на 18 – 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 °C.

При проведении реакции необходимо учитывать возможное воздействие на эритроциты образующихся в процессе жизнедеятельности ряда бактерий органических кислот (молочной, муравьиной, уксусной и др.),

которые могут вызывать изменения гемоглобина, сходные с гемолизом, т.е. давать ложноположительную реакцию гемолиза. Поэтому следует представить фактические данные, подтверждающие, что данный штамм не продуцирует гемолизины (отсутствие плазмид или участка гена, кодирующих синтез гемолизина).

Предлагаемые производственные штаммы не должны обладать гемолитической активностью.

Примечание.

Приготовление 5 % кровяного агара. К 100 мл растопленного и остуженного до температуры 45–50 °С МПА с 2 % агара микробиологического в его составе (рН 7,4–7,6), соблюдая правила асептики, добавляют 5мл стерильной дефибринированной крови кролика, лошади, барана или человека, не содержащей консервантов или антибактериальных препаратов. Смесь тщательно перемешивают, остерегаясь образования пены, и разливают в стерильные чашки Петри, предварительно подогретые в термостате.

Перед розливом чашки устанавливают на ровную поверхность. Слой агара должен быть одинаковым по всей площади чашки и толщиной не более 3 мм.

2.1.7 Определение гиалуронидазы

Некоторые бактерии образуют гиалуронидазу – фермент, разрушающий гиалуроновую кислоту. Сущность метода состоит в том, что культуральную жидкость, полученную после выращивания испытуемого микроорганизма, смешивают с красителем трипановым синим и вводят внутрикожно животным. Наличие гиалуронидазы определяют путем сравнения площади распространения красителя, введенного в смеси с фильтратом культуральной среды и без нее.

В ходе испытания исследуемый штамм выращивают в селективной жидкой среде в оптимальных для него условиях (температуре и времени экспозиции). По окончании инкубации культуру сначала центрифугируют при 8000 об/мин в течение 30 мин, при необходимости – фильтруют через бактериальные фильтры. Животным – кроликам или морским свинкам – вводят смесь, состоящую из 0,1 мл испытуемого фильтрата и 0,1 мл 10 %

раствора трипанового синего. Результаты учитывают по отношению площади распространения краски в опыте и контроле, определяя индекс диффузии.

Для исключения влияния местного воспаления на распространение краски опыты ставят не только на коже живого кролика (морской свинки), но и на снятой (предварительно депилированной) коже.

Предлагаемый пробиотический штамм не должен продуцировать гиалуронидазу.

3. Ферменты, участвующие в обмене веществ

3.1. Тест на продукцию желатиназы

Метод 1. К питательной среде добавляют желатин (из расчета 10 – 15 г на 100 мл), разливают в пробирки высоким столбиком. Посев испытуемого штамма осуществляют уколом, погружая петлю с культурой вглубь питательной среды. Засеянную культуру инкубируют в термостате при оптимальной для нее температуре в течение 1 – 2 сут. Вместе с опытными пробирками в термостат ставят 2 пробирки с незасеянной желатиновой средой для контроля. При регистрации результатов учитывают интенсивность роста микроорганизма и характер (форму) разжижения среды с желатином.

Метод 2. О продукции желатиназы судят по обесцвечиванию полоски фотопленки, помещенной в пробирку с исследуемой культурой.

Полоски фотопленки размером 25 × 3 мм, освещенной и проявленной, прокладывают кусками фильтровальной бумаги, помещают в чашку Петри и автоклавируют при температуре 110 °С (0,5 атм.) в течение 30 мин.

Исследуемую культуру бактерий засевают в пробирки с МПБ, под пробку пробирки вставляют полоску стерильной фотопленки так, чтобы верхняя часть ее оставалась не погруженной в среду. Посевы инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С. Если культура разжижает желатин, погруженная часть пленки становится прозрачной, а черная пыль редуцированного серебра выпадает на дно пробирки. Большинство бактерий,

продуцирующих желатиназу, обесцвечивают полоску в течение 1сут. При отрицательных результатах посева оставляют в термостате до 7 сут.

Положительный контроль – *Proteus mirabilis* 3177; *P. vulgaris* 24a; *Morganella morganii* 417.

Отрицательный контроль – *Yersinia enterocolitica* № 134.

Предлагаемый производственный штамм не должен разжижать желатин.

Примечание.

Приготовление желатиновой питательной среды. Среда предназначена для определения желатиназы.

Состав среды:

- Бульон Хоттингера 1000 мл
- Желатин пищевой высшего сорта 100,0 г

Желатин вносят в бульон для набухания на 1,5 – 2 ч, нагревают на водяной бане при 40 – 50 °С до полного расплавления. Устанавливают рН 7,2. При необходимости среду фильтруют или осветляют с помощью суспензии куриных яиц (2 яйца, размешанных в двойном объеме холодной воды очищенной, вносят в среду, нагревают до свертывания белка, затем снова фильтруют). Разливают в пробирки по 8 – 9 мл. Стерилизуют при температуре 112 °С в течение 30 мин. Готовая среда имеет желтовато-коричневый цвет.

3.2. Тест на продукцию протеазы

У некоторых видов патогенных бактерий продукция протеазы является одним из факторов патогенности.

О продукции протеазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре, содержащем казеин. Испытуемую культуру засевают штрихом в чашки с казеиновым агаром и инкубируют в термостате при температуре (37±1) °С в течение 18 ч. По окончании инкубации в чашки наливают 5 мл 5 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и наблюдают в течение 3 мин за появлением прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре.

Положительный контроль – *V.cholerae* не-01 № Р-9741.

Предлагаемый производственный штамм не должен обладать протеазой.

Примечание.

Приготовление агара с казеином. Готовят 2 % раствор казеина на 0,1 М буферном растворе трис-гидрохлорида (рН 7,0 – 8,0). Раствор подогревают до температуры $(55 \pm 0,5)$ °С и смешивают в равных объемах с раствором 2 % агара Дифко, охлажденного до той же температуры. Полученный казеиновый агар разливают в чашки Петри с соблюдением условий асептики.

3.3 Тест на продукцию амилазы

О продукции амилазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза крахмала вокруг посевов в картофельном агаре.

Испытуемый штамм засевают штрихом, инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. По окончании инкубирования выросшую культуру в чашках заливают 5 мл раствора Люголя и в течение 5 мин наблюдают за появлением прозрачных светло-коричневых зон вокруг посевов.

Примечание.

Приготовление картофельного агара. Очищенный от кожуры сырой картофель промывают, нарезают ломтиками, заливают водой из расчета 130 г на 1 л воды очищенной, кипятят 30 мин, фильтруют и к фильтрату добавляют 20 г агара микробиологического и 2 г натрия хлорида. Нагревают, помешивая стеклянной палочкой, до полного расплавления агара, если необходимо, снова фильтруют, разливают во пробирки по 10 мл, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве 30 мин при температуре 110 °С (0,5 атм.) в течение 30 мин.

Готовый картофельный агар разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

3.4. Тест на продукцию липазы

О продукции липазы судят по образованию прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре, содержащем твин-20.

Культуру, выращенную на МПБ при температуре (37 ± 1) °С в течение 18–24 ч, высевает штрихом на агаризованную среду с твином-20 и инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. По истечении срока инкубации регистрируют появление или отсутствие прозрачных зон гидролиза вокруг посевов в агаре.

Примечание.

Приготовление агара с твином-20. Готовят 2 % агар на 0,06 М фосфатном буфере (рН 7,4 – 7,6). Твин-20 нагревают на водяной бане до температуры (55 ± 5) °С и вносят в расплавленный агар до конечной концентрации 1 %. Быстро перемешивают встряхиванием и добавляют 10 % раствор кальция хлорида до конечной концентрации 0,1 %. Тщательно перемешивают, разливают в пробирки по 10 мл, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют на кипящей водяной бане в течение 40 мин. После стерилизации разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

3.5 Тест на продукцию аргининдегидрогеназы

Продукцию аргининдегидрогеназы изучают на среде Шеррис. Пробирку со средой Шеррис и контрольную (без аргинина) засевают 18-часовой культурой испытуемого штамма и заливают стерильным вазелиновым маслом. Посевы инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 5 сут. О разложении аргинина свидетельствует появление фиолетовой окраски в опытной пробирке.

Положительный контроль – *S. aureus* 6538-Р АТСС.

Отрицательный контроль – *Y. enterocolitica* № 134.

3.6 Тест на редукцию нитратов

Восстановление нитратов до нитритов осуществляют микроорганизмы, имеющие нитратредуктазу, и использующие нитраты как источник азота. Тест предназначен для идентификации энтеробактерий и некоторых других микроорганизмов.

Редукцию нитратов определяют путем культивирования бактерий на МПБ с 0,2 % раствором KNO_3 при температуре (37 ± 1) °С в течение 7–10 сут, начиная наблюдение за результатами после 24 ч инкубирования. Образование нитритов определяют по крахмально-йодной пробе или с реактивом Грисса.

В первом случае для выявления нитритов к 1 капле раствора, содержащего калий йодистый, крахмал и цинка(II) хлорид, добавляют по 1 капле исследуемой культуры микроорганизмов и раствора

хлористоводородной кислоты. При наличии в среде нитритов наблюдается синее окрашивание.

При выявлении нитритов вторым способом к капле испытуемой культуры добавляют 1 каплю реактива Грисса. Вследствие образования нитритов выявляется красно-розовое окрашивание.

Положительный контроль – *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*.

Отрицательный контроль – *Micrococcus luteus*.

Примечание.

1. Приготовление среды для теста на нитрат-редуктазу.
Питательная среда предназначена для определения способности бактерий редуцировать нитраты до нитритов.

Состав:

- Пептон 5,0 г
- KNO₃ (свободный от KNO₂) 0,2 г
- Вода очищенная 1000 мл

Ингредиенты растворяют в 1000 мл воды очищенной, подогревают, устанавливают рН 7,4, разливают в пробирки по 5,0 мл. Стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин.

2. Приготовление реактива Грисса.

Состав:

Раствор 1.

- Сульфаниловая кислота 8,0 г
- Уксусная кислота (5 N раствор) 1000 мл

Раствор 2.

- Альфа-нафтиламин 5,0 г
- Диметил-альфа-нафтиламин 6,0 г
- Уксусная кислота (5 N раствор) 1000 мл

Реактивы готовят при слабом нагревании с особой осторожностью из-за их токсичности. Хранят при (6 ± 4) °С в герметично закупоренных емкостях из темного стекла. Срок годности 2–3 мес.

3.7 Реакция Фогеса–Проскауэра

Некоторые микроорганизмы при сбраживании глюкозы способны образовывать ацетоин (ацетилметилкарбинол), который выявляют в реакции Фогеса–Проскауэра.

Для постановки реакции Фогеса–Проскауэра культуру выращивают на среде Кларка при температуре (37 ± 1) °С в течение 24–72 ч. Затем к 1 мл микробной культуры добавляют 0,6 мл альфа-нафтола (5 % раствор в

этиловом спирте) и 0,2 мл 40 % раствора калия гидроксида и взбалтывают. При положительной реакции наблюдается вишнево-красное окрашивание.

Положительный контроль – *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*.

Отрицательный контроль – *Escherichia coli*.

Примечание.

1. Приготовление среды Кларка для реакции Фогеса-Проскауэра.

Состав:

- Пептон 0,5 г
- Калия гидроортофосфат 0,5 г
- Глюкоза 0,5 г
- Вода очищенная 80 мл

Перечисленные ингредиенты размешивают при подогревании в течение 20 мин. Фильтруют через бумажный фильтр, охлаждают до температуры 20 °С и доводят объем до 100 мл водой очищенной. Разливают по 5 мл в пробирки и стерилизуют 3 дня текучим паром по 30 мин.

2. Приготовление реактива к реакции Фогеса-Проскауэра

Реактив 1. Навеску 5 г альфа-нафтола растворяют в 100 мл 96 % спирта этилового.

Реактив 2. Навеску 40 г калия гидроксида растворяют в 100 мл воды очищенной.

3.8 Тест на гидролиз мочевины (тест на уреазу)

Тест на уреазу предназначен для дифференциальной диагностики некоторых микроорганизмов и заключается в способности некоторых бактерий гидролизовать мочевины с образованием аммиака и углекислоты. Это приводит к изменению рН среды до щелочных показателей. О наличии уреазы у бактерий судят по покраснению среды, содержащей мочевины.

Готовят бульон с мочевиной: к 100 мл стерильного МПБ (рН 7,0) добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл фенолового красного (1,6 % спиртовой раствор). Разливают по 2 – 3 мл в стерильные пробирки, укупоривают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют текучим паром в течение 10 мин.

В пробирку с бульоном, содержащим мочевины, вносят 1 петлю суточной культуры, выращенной на МПА, инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Изменение окраски среды с желтой до

розово-красной свидетельствует о наличии фермента уреазы и способности испытуемой культуры гидролизовать мочевины.

Положительный контроль – *Y. enterocolitica* № 134; *P. mirabilis* 3177; *P. vulgaris* 24a, *P. vulgaris* 222; *M. morganii* 417.

Отрицательный контроль – *L. monocytogenes* 766, *E. coli*.

3.9 Тест на расщепление тирозина

О разложении тирозина судят по исчезновению кристаллов тирозина вокруг посевов в агаре.

Готовят агар с тирозином: 0,5 г L-тирозина суспендируют в 10 мл воды дистиллированной, помещают в пробирку, укупоривают ватно-марлевой пробкой и автоклавируют при температуре 110 °С (1,5 атм) в течение 30 мин. Охлажденный до температуры (50 ± 5) °С раствор тирозина в стерильных условиях смешивают с 100 мл расплавленного стерильного МПА и разливают по 10 мл в стерильные чашки Петри.

После застывания агара культуру высевают на чашки штрихом и инкубируют в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 24 ч. Наблюдают за исчезновением кристаллов тирозина вокруг посевов в агаре.

Положительный контроль – *P. mirabilis* 3177.

Отрицательный контроль – *Y. enterocolitica* № 134; *P. vulgaris* 24a, *P. vulgaris* 222; *M. morganii* 417.

3.10 Тест на утилизацию цитрата

Тест на утилизацию цитрата используют при дифференциальной диагностике энтеробактерий и близкородственных им микроорганизмов. Для изучения способности бактерий использовать цитрат в своем метаболизме обычно применяют цитратный агар Симмонса или Кристенсена, а также жидкую среду Козера.

Положительный контроль – *P. mirabilis* 3177.

Отрицательный контроль – *Y. enterocolitica* № 134; *P. vulgaris* 24a, *P. vulgaris* 222; *M. morganii* 417.

3.11 Тест на образование аммиака, индола, сероводорода

Многие бактерии обладают протеолитической активностью, о чем можно судить по их способности образовывать аммиак, индол или сероводород в качестве продуктов протеолиза при росте на соответствующих питательных средах. Об образовании этих веществ судят по изменению цвета индикаторов.

Для обнаружения аммиака можно использовать лакмусовую бумагу (индикаторная бумага синееет). Для выявления индолообразования применяют реактивы Эрлиха или Ковача, которые дают сиреневое или малиновое окрашивание при положительном тесте на индол. А для определения способности бактерий образовывать сероводород в качестве индикатора используют раствор свинца уксуснокислого (наблюдается почернение индикаторной полоски).

Кроме того, разработаны коммерческие питательные среды, содержащие индикаторы для выявления продуктов протеолиза бактерий.

3.12 Сквашивающая способность пробиотического штамма

Односуточную культуру исследуемого штамма засевают в стерильное молоко из расчета 3–5 % посевного материала к объему молока. Пробирки с посевным материалом и со стерильным молоком без культуры (контроль) помещают в термостат и инкубируют при оптимальной температуре в течение 2–3 сут. При регистрации результатов учитывают способность культуры сквашивать молоко и образовывать сгусток. Кислотность определяют титриметрическим способом.

Данный метод рекомендован в качестве ориентировочного теста. Ряд штаммов кисломолочных культур могут не сквашивать молоко с образованием сгустков, но продуцируют вещества, изменяющие кислотность питательной среды. Поэтому следует определять активность кислотообразования, показатель которой выражается в градусах Тернера (°Т), по методу, описанному в ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

4. Определение антагонистической активности пробиотических штаммов

Определение антагонистической активности испытуемых производственных пробиотических штаммов проводят методом отсроченного антагонизма в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

5. Определение чувствительности пробиотических штаммов к антибиотикам

Чувствительность производственных пробиотических штаммов к антибиотикам определяют в соответствии с ОФС «Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар».

Исследованию по оценке антибиотикочувствительности подлежат чистые культуры испытуемых микроорганизмов, принадлежность которых к определенному виду подтверждена фено- и генотипическими методами исследования.

6. Определение устойчивости производственного пробиотического штамма к действию желудочного сока и желчи

Производственные штаммы должны быть устойчивы к действию желудочного сока, желчи, повышенному содержанию соли и щелочи при прохождении через желудочно-кишечный тракт для сохранения жизнеспособности культур, вошедших в состав пробиотиков. Если эти свойства у рекомендуемого штамма не обнаружены или снижены, а культура характеризуется продукцией уникальных биологически активных веществ, обладающих терапевтическим действием, следует провести исследования для подбора вспомогательных веществ или лекарственной формы (например, кислотоустойчивые капсулы, таблетки с защитным покрытием и др.), обеспечивающих максимальное сохранение жизнеспособности пробиотических культур.

Способ 1. В пробирку, содержащую 9,0 мл желчи медицинской консервированной, засевают 1 мл испытуемой культуры с концентрацией 10^8

– 10^9 оптических единиц мутности. Культуры инкубируют в термостате при температуре 37–38 °С в течение 24 – 72 ч в зависимости от вида микроорганизма. Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности, а также выборочно контролируют путем световой микроскопии препаратов, приготовленных из испытуемой культуры по окончании инкубации в присутствии желчи.

Способ 2. Исследуемый штамм засевают на стерильный лист целлофана, помещенного на адекватную агаризованную среду, и инкубируют при температуре 37 °С в течение 16– 18 ч. После этого выросшую культуру смывают 0,9 % раствором натрия хлорида в фосфатном буферном растворе (ЗФР) и доводят микробную концентрацию до 10^9 КОЕ/мл (по оптическому стандарту мутности). В пробирку с 1 мл бактериальной суспензии добавляют 9,0 мл биологической жидкости (желчь медицинская консервированная, желудочный сок «Эквин»). В контрольную пробирку к взвеси испытуемого штамма добавляют 9,0 мл ЗФР. Пробирки выдерживают в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение 2 ч, затем определяют количество жизнеспособных клеток методом серийных разведений с последующим высевом на адекватную плотную питательную среду.

7. Тест на устойчивость производственного пробиотического штамма к щелочной реакции среды

В жидкую питательную среду, подходящую для культивирования исследуемого штамма (рН от 8,0 до 9,6), засевают испытуемую пробиотическую культуру (по 1 петле на 8 – 10 мл среды). Посевы выдерживают в термостате при оптимальной для штамма температуре в течение 24 – 48 ч.

Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию помутнения среды.

8. Тест на устойчивость производственного пробиотического штамма к повышенным концентрациям солей

В жидкую питательную среду, используемую для культивирования испытуемого штамма, содержащую 2,4 и 6,5 % натрия хлорида (рН 6,8 – 7,0), засевают исследуемую пробиотическую культуру (по 1 петле на 10 мл среды) и выдерживают в термостате при оптимальной для штамма температуре в течение 48 ч.

Рост или отсутствие роста культуры отмечают визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию помутнения, а также выборочно контролируют путем микроскопии препаратов, приготовленных из культуральной среды по окончании инкубирования посевов.

9. Определение продукции бактериоцинов производственным пробиотическим штаммом

На чашках с 1,5 % питательным агаром *Difco* размечают точки, соответствующие количеству штаммов, и помещают на размеченные участки по 2–5 мкл суспензии 12-часовой культуры испытуемых микроорганизмов. Количество чашек должно соответствовать количеству тест-культур с учётом контрольных чашек. Чашки инкубируют при температуре (37 ± 1) °С в течение 4–12 ч. Продукцию бактериоцина испытуемым штаммом инициируют УФ-облучением в течение 30 с, затем культуру инкубируют в тех же условиях еще 3–2 ч. После культивирования в течение 48 ч проводят инактивацию культур хлороформом следующим образом: чашку Петри переворачивают вверх дном, снимают крышку, поднимая чашку со средой, и кладут в крышку фильтровальную бумагу, смоченную 300 мкл хлороформа. После экспозиции в течение 30 мин заменяют крышки с хлороформом на чистые и стерильные, а инактивированные посевы проветривают около 15 мин. После этого на уже имеющийся слой агара наслаивают 3–5 мл 0,7 % агара, содержащего 10^7 КОЕ/мл тест-штамма. Инкубируют в течение 12–16 ч при температуре (37 ± 1) °С.

После инкубации регистрируют наличие зон просветления в слое тест-культуры вокруг пятен исследуемых штаммов. Таким способом можно одновременно оценить способность исследуемого штамма продуцировать

бактериоцины, а также определить чувствительность штамма к бактериоцинам, продуцируемым другими микроорганизмами.

10. Определение наличия фагов у производственных штаммов, используемых для изготовления пробиотиков для медицинского применения

Определение наличия фагов в геноме производственного штамма проводят путем высева взвеси испытуемой культуры второго или третьего пассажа на соответствующую плотную питательную среду в объеме не более 1 мл (концентрация 10^7 – 10^9 микробных клеток в 1 мл). Перед посевом чашки Петри с питательной средой подсушивают в термостате для удаления конденсата. Микробную взвесь равномерно распределяют по поверхности среды путем покачивания чашек, чтобы получить сплошной газон. Остатки взвеси отсасывают стерильной пастеровской пипеткой. Затем чашки помещают в термостат при температуре (22 ± 2) °С. Через 19–36 ч учитывают результат посева. На сплошном росте посеянной культуры не должно быть зон фаголизиса.

Раздел 2. Требования к тест-штаммам, используемым для определения антагонистической активности производственных штаммов, посевных культур и готовых лекарственных форм пробиотиков

Исследование по изучению антагонистической активности осуществляют в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков»; набор тест-штаммов указывается в фармакопейной статье. Величина зоны угнетения роста изучаемых штаммов относительно друг друга не должна быть более 10 мм.

Пробиотические штаммы должны проявлять антагонистическую активность по отношению к тест-штаммам патогенных и условно патогенных микроорганизмов и не должны угнетать рост представителей нормофлоры. Перечень тест-штаммов для контроля антагонистической активности определяют на основании результатов клинических (лечебное действие) и

микробиологических (влияния на определенную группу патогенных и условно-патогенных микроорганизмов) испытаний эффективности и безопасности конкретных групп препаратов. Рекомендуемые тест-штаммы должны быть идентифицированы до вида по фено- и генотипическим признакам, должны быть однородны по морфологическим, тинкториальным, культуральным, физиолого-биохимическим свойствам и охарактеризованы по вирулентным свойствам и токсичности.

Тест-штаммы должны быть депонированы в национальной или международной коллекции с указанием источника, даты выделения и характеристики их биологических свойств.

Тест-штаммы должны соответствовать требованиям по следующим показателям.

Подлинность. Подлинность каждого тест-штамма определяется микробиологическими методами. Культуры должны обладать однородными морфологическими, тинкториальным, культуральными и физиолого-биохимическими свойствами без признаков диссоциации.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов. Испытание выполняют с использованием селективных питательных сред для того, чтобы в выбранных условиях инкубации был обеспечен рост контаминантов. Культура не должна содержать посторонней микрофлоры. Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота», если в нормативной документации не указаны другие требования.

Хранение и упаковка. Тест-штаммы хранят в лиофильно высушенном состоянии при температуре, обеспечивающей сохранение первоначальных биологических свойств на протяжении срока годности в помещениях, изолированных от производственных площадей. На ампуле (флаконе) с лиофильно высушенным штаммом указывают следующие сведения: наименование и номер штамма, дату лиофилизации, порядковый номер лиофилизации, срок годности.

Тест-штаммы контролируют ежегодно по всем биологическим свойствам, указанным в нормативной документации. Результаты контроля фиксируют в специальном журнале и отражают в паспорте штамма.

Раздел 3. Исследование адгезивной активности пробиотических штаммов

Адгезивная активность пробиотических штаммов определяет их способность прикрепиться к эпителию кишечника и размножиться прежде, чем клетки слизистого слоя будут обновлены.

Для обеспечения данной функции бактерии имеют ряд структур (пили/фимбрии, компоненты клеточной стенки), посредством которых происходит их прикрепление к эпителиальной клетке. Эти структуры называются факторами адгезии и колонизации и относятся к факторам патогенности. Бактерии способны экспрессировать различные типы фимбрий, которые кодируются различными хромосомальными и плазмидными генами. Это генетическое разнообразие позволяет клеткам адаптироваться к изменяющейся окружающей среде и использовать эту возможность по отношению к различным поверхностным структурам хозяина.

Механизм специфической адгезии включает 2 фазы: обратимую и необратимую. Обратимая фаза может быть обеспечена гидрофобным взаимодействием, электростатическим притяжением, броуновским движением, а также атомными и молекулярными вибрациями. Необратимая специфическая фаза обеспечивается множеством связей типа «ключ-замок» между комплементарными молекулами на каждой из клеточных поверхностей; как только эти связи сформировались, прикрепление бактерий становится необратимым.

Определение способности пробиотических штаммов к адгезии является важным критерием их отбора для создания препаратов пробиотиков медицинского назначения.

Для исследования адгезии используют суточные культуры испытуемых штаммов.

Суточную чистую культуру исследуемого штамма, выращенную на скошенной адекватной питательной среде, смывают ЗФР, рН 7,2 и затем дважды отмывают ЗФР путем центрифугирования (1500 об/мин в течение 10 мин).

Испытуемые культуры можно также выращивать на плотной среде, покрытой целлофаном, при температуре 37 °С в течение 16–18 ч. После этого готовят суспензию, содержащую $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Подготовленные таким образом культуры, выращенные на целлофане, доводят до указанной концентрации без отмывания.

1. Метод определения адгезивности пробиотических штаммов к эритроцитам. Эритроциты дважды отмывают от консерванта в ЗФР путем центрифугирования (1000 об/мин в течение 10 мин) и доводят до нужной концентрации (10^8 клеток в 1 мл ЗФР). Подсчет концентрации эритроцитов производят в камере Горяева с помощью световой микроскопии по общепринятой методике.

Затем в пробирку с 0,5 мл взвеси микробов указанной выше концентрации вносят 0,5 мл суспензии эритроцитов и инкубируют 30 мин при температуре (37 ± 1) °С, периодически встряхивая. Потом смесь трехкратно отмывают ЗФР от неадгезированных микробов (при 600 об/мин по 10 мин).

После отмывки на предметном стекле готовят мазок, фиксируют смесью Никифорова, окрашивают по Романовскому–Гимзе и при микроскопировании проводят оценку уровня адгезии. Средний показатель адгезии (СПА) определяют по среднему числу микробов, прилипших к поверхности одного эритроцита, подсчитывая все имеющиеся эритроциты в 5 полях зрения, но не менее 50 эритроцитов.

Степень адгезивности считают нулевой при СПА от 0 до 0,99; низкой – от 1,00 до 1,99; средней – от 2,00 до 3,99 и высокой > 4,00.

Из числа учитываемых эритроцитов подсчитывают процент эритроцитов ($K\%$), имеющих на своей поверхности прилипшие микробы.

Кроме того, подсчитывают индекс адгезивности микроба (ИАМ) – среднее количество микробных клеток на одном эритроците, участвующем в адгезивном процессе, по формуле:

$$\text{ИАМ} = (\text{СПА } 100\%) / K,$$

где СПА – средний показатель адгезии испытуемого микроба;

K – количество эритроцитов, имеющих на своей поверхности прилипшие микробы.

Учет результатов. Микроорганизмы считают неадгезивными при ИАМ от 1,00 до 1,75; низкоадгезивными – ИАМ от 1,76 до 2,49; среднеадгезивными – ИАМ от 2,50 до 3,99 и высокоадгезивными – при ИАМ > 4,00.

2. *Метод определения адгезивности пробиотических штаммов к эпителиальным клеткам кишечника крыс или мышей.* Адгезивность штаммов изучают в системе *in vitro* на эпителиальных клетках тонкой и толстой кишки крыс линии Фишер или любой другой линии, или на беспородных белых мышках. Крыс или мышей умерщвляют углекислым газом. Из кишечника погибших животных выделяют кусочки размером 5×5 мм, тщательно отмывают их от слизи и содержимого с помощью ЗФР. После этого из кусочков слизистой кишечника на вибраторе модели ВПП получают эпителиальные клетки.

Полученные эпителиоциты дважды отмывают охлажденным ЗФР (рН 7,2) при центрифугировании (800 об/мин по 10 мин). После определения исходной концентрации клеток с помощью камеры Горяева при световой микроскопии ее доводят до $2 \cdot 10^6$ клеток/мл с помощью ЗФР. Одновременно с подготовкой клеток эпителия готовят суспензию испытуемой пробиотической культуры в концентрации $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

При проведении эксперимента на 0,5 мл взвеси эпителиальных клеток наносят 0,5 мл взвеси бактериальной культуры указанной концентрации.

Клеточно-бактериальную смесь инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, периодически встряхивая. Затем смесь трехкратно отмывают ЗФР от неадгезированных микробов при центрифугировании (600 об/мин по 10 мин). Все манипуляции осуществляют на холоде. К полученному после отмывания осадку добавляют 1–2 капли ЗФР и готовят мазки на стекле. Препараты фиксируют 96° спиртом и окрашивают по Романовскому–Гимзе.

В световом микроскопе подсчитывают среднее количество бактерий, прилипших к 25 энтероцитам или колоноцитам.

При оценке адгезивности каждого штамма микроорганизма опыт повторяют не менее 3 раз. Подсчитывают СПА – число микробов, адгезированных к 1 клетке-энтероциту, подсчитывая среднее количество «микроб/клетка» в 10 полях зрения и учитывая результаты всех опытов (учитывается не менее 25 энтероцитов в 10 полях зрения).

Уровень адгезии отдельных штаммов бактерий условно разделен на 4 степени: неадгезивные штаммы (СПА = 0); слабоадгезивные (СПА = 1–5); среднеадгезивные (СПА = 5–10) и высокоадгезивные (СПА выше 10).

3. Определение уровня адгезивной активности штаммов-пробиотиков на модели эпителиальных клеток влагалища. Взятие материала для получения изолированных эпителиальных клеток производят при проведении диагностической гистероскопии и отдельном диагностическом выскабливании стенок шейки матки и цервикального канала при различных неинфекционных заболеваниях тела матки.

В асептических условиях под внутривенной анестезией шейка матки обнажается куско- или ложкообразными зеркалами. После этого производят соскоб эпителия слизистой боковых стенок влагалища. После забора материал помещают в транспортный контейнер с жидкой питательной средой 199. Контейнер обкладывается льдом.

Полученные клетки дважды отмывают охлажденным ЗФР (рН 7,2) центрифугированием при 800 об/мин по 10 мин. После определения

исходной концентрации взвеси клеток с помощью камеры Горяева с помощью светового микроскопа суспензию клеток разводят до концентрации $(1,5-2) \cdot 10^6$ клеток/мл.

Далее готовят суспензию испытуемого штамма с концентрацией $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

В ходе испытания 0,5 мл взвеси эпителиальных клеток смешивают с 0,5 мл взвеси бактериальной культуры указанной концентрации. Клеточно-бактериальную смесь инкубируют в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, периодически встряхивая. Потом смесь трехкратно отмывают ЗФР от неприлипших микробов при 600 об/мин по 10 мин. Все манипуляции осуществляют на холоде. К осадку добавляют 1– капли ЗФР и готовят мазки на стекле. Препараты фиксируют смесью Никифорова и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

В световом микроскопе подсчитывают среднее количество бактерий, прилипших к 25 эпителиоцитам.

При оценке адгезивности каждого штамма микроорганизма опыт повторяют не менее 3 раз. Подсчитывают СПА – число микробов, адгезированных к 1 клетке-эпителиоциту, подсчитывая среднее количество «микроб/клетка» в 10 полях зрения и учитывая результаты всех опытов (учитывается не менее 25 эпителиоцитов в 10 полях зрения).

Степень адгезии отдельных штаммов бактерий определяют следующим образом: неадгезивные штаммы (СПА = 0); слабоадгезивные (СПА = 1 – 5); среднеадгезивные (СПА = 5 – 10) и высокоадгезивные (СПА выше 10).

Штаммы с высокой адгезивной активностью не следует рекомендовать для производства пробиотиков.

Раздел 4. Определение безопасности пробиотических штаммов

Определение вирулентности, токсичности, токсигенности и безвредности осуществляют в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в опытах *in vivo*».

Животные. Для токсикологических исследований используют здоровых животных, полученных из сертифицированных питомников. Вирулентность, токсигенность, токсичность («общую», «острую» и «хроническую»), безвредность, дермонекротические и другие свойства испытуемых штаммов пробиотиков определяют не менее чем на 2 видах (нелинейных или линейных) или 2 линиях одного вида животных в зависимости от изучаемого штамма. Исследования проводят на животных обоего пола. Данные, полученные в опытах на самках и самцах, учитывают отдельно для оценки воспроизводимости результатов испытания.

Для исключения большого разброса в исследуемых показателях следует использовать животных одного возраста. Разброс по исходной массе тела не должен превышать $\pm 10\%$. Рекомендуемая масса тела животных в начале опыта: мыши – от 10 до 14 г; крысы – от 100 до 140 г; морские свинки – от 250 до 450 г; кролики – от 1,5 до 2,5 кг.

Партия животных из питомника должна сопровождаться ветеринарным свидетельством или ветеринарной справкой. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляет не менее 3–4 сут. В течение карантина проводят ежедневный осмотр животных (оценивают общее состояние и поведение). В случае гибели в этот период более 10 % поступивших животных испытание токсичности на данной партии исключается.

Клетки с животными помещают в отдельные комнаты. Световой режим: 12 ч – свет, 12 ч – темнота. Температуру воздуха поддерживают в пределах 19 – 25 °С, относительную влажность – 30 – 70 %. Содержание экспериментальных животных должно соответствовать действующим санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Рекомендуется давать животным стандартную диету в соответствии с действующими нормами. Для обеспечения водой мелких лабораторных животных целесообразно использовать автопоилки. Кормление следует

производить в фиксированное время, т.к. прием пищи может изменить чувствительность животных. Наряду с подопытными животными из этой же партии в аналогичных условиях содержатся контрольные животные.

Формирование групп подопытных и контрольных животных проводят методом случайной выборки (единица выборки - животное).

Материалы: испытуемые тест-штаммы; оптический стандарт мутности на 5 и 10 МЕ; селективные питательные среды; шприцы вместимостью 1 мл с ценой деления 0,05 мл и вместимостью 2 мл с ценой деления 0,1 мл.

4.1. Определение дермонекротических свойств испытуемых штаммов пробиотиков

Для этой цели используют белокожих кроликов породы Шиншилла массой 1,5 – 2,5 кг или морских свинок массой 300 – 450 г.

Разные концентрации микробной взвеси в объеме 0,1 – 0,2 мл вводят внутрикожно в область спины. При этом используют тонкие (№ 18 – 20) острые иглы с небольшим скосом. Кожу в месте введения взвеси предварительно освобождают от шерсти и обрабатывают 70° спиртом. В месте введения кожу растягивают пальцами левой руки, правой рукой вводят иглу под острым углом. Конец иглы должен быть виден через эпидермис: при введении материала эпидермис приподнимается в виде четко ограниченного бугорка, кожа над ним становится прозрачной и пористой. Результат учитывают ежедневно в течение 3 – 4 сут. Отмечают появление отека, красноты, наличие некроза. Следует иметь в виду, что вследствие неодинаковой чувствительности животных необходимо использовать не менее 2 кроликов или морских свинок.

Обязательно при испытании каждому животному следует ввести взвесь штамма бактерий, обладающего дермонекротической активностью (контроль чувствительности животных).

При учёте результатов отмечают размер гиперемии, отека и некроза, измеряя диаметр в мм.

4.2. Определение «острой» токсичности испытуемых штаммов пробиотиков

При изучении «острой» токсичности для определения LD₅₀ или максимально переносимой дозы однократно животным вводят несколькими способами (внутривенно, внутрибрюшинно, перорально) 3 или 4 разные дозы испытуемых культур пробиотических штаммов или готовых препаратов. Контрольной группе животных теми же способами вводят 0,9 % раствор натрия хлорида. В той же группе оставляют интактных животных (контрольная группа 2).

Внутривенные и внутрибрюшинные инъекции максимально переносимых доз испытуемых препаратов позволяют выявить органы-мишени для испытуемого штамма пробиотика, характер и степень выраженности морфологических изменений в этих органах. Сравнение параметров токсичности при разных путях введения может дать представление о сходстве или различии в механизмах токсического действия испытуемых штаммов или препаратов и причинах летального исхода у животных (табл. 1).

Таблица 1 – Максимально допустимые объемы жидкости для некоторых видов лабораторных животных в зависимости от пути введения

Вид животных	Масса тела, г	Путь введения/объем введения, мл				
		в желудок	под кожу	в мышцу	в вену	в брюшную полость
Мышь	10 – 14	0,5 – 1,0	0,5 – 1,0	0,5	0,2 – 0,5	0,5 – 1,0
Крыса	100 – 140	3,0	5,0 – 10,0	5,0	2,0	5,0
Морская свинка	250 – 300	4,0 – 5,0	15,0	5,0	5,0 – 8,0	5,0
Кролик	1500 – 2500	100,0	30,0	15,0	20,0	20,0 – 30,0

Примечание. Максимальные объемы должны вводиться мышам в течение 5 с, крысам и морским свинкам – в течение 10 с, кроликам – в течение 20 с.

Общая продолжительность наблюдений за животными должна составлять не менее 7 сут. Ежедневной регистрации подлежат гибель животных, масса тела, а также наличие или отсутствие возможных клинических симптомов интоксикации, в т.ч. нарушение координации движения, наличие судорог, их характер, а также состояние волосяного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста. Через 24 ч и 7 сут осуществляют взятие материала из внутренних органов выживших животных (не менее 5 животных на каждый способ введения соответственно).

Обязательному исследованию подлежат все животные, павшие в течение срока наблюдения. Перед взятием материала из внутренних органов осуществляют их визуальный осмотр. Макроскопические изменения каждого органа фиксируют в журнале. Допускается проведение гистологического исследования органов одного вида животных, оказавшегося более чувствительным к токсическому воздействию препарата. Во всех экспериментах, предусматривающих выполнение патоморфологических исследований, используют равное количество контрольных животных (после введения 0,9 % раствора натрия хлорида и интактных) (табл. 2).

Таблица 2 –Схема определения «острой» токсичности производственных штаммов и лекарственной формы препарата пробиотика

Способ введения	Доза	Кратность введения	Срок опыта, сут	Срок забора внутренних органов, сут
Внутрибрюшинно и при необходимости внутривенное	Не менее 3 доз для вычисления LD ₅₀ или максимально переносимой дозы в случае невозможности	Однократно	7 с ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации, гибели животных	1 и 7

	определения LD ₅₀			
Перорально	Максимальная переносимая доза	Однократно	7 с ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации	1 и 7

4.3. Определение «хронической» токсичности испытуемых штаммов пробиотиков

Целью хронических токсикологических экспериментов является характеристика степени повреждающего действия исследуемых штаммов или препаратов при их длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование степени обратимости вызываемых ими повреждений.

«Хроническую» токсичность определяют не менее чем на 2 видах животных (или 2 линиях одного вида). Обязательным путем введения испытуемого штамма является пероральный способ независимо от лекарственной формы готового препарата.

Продолжительность введения пробиотиков при изучении хронической токсичности зависит от предполагаемой длительности их применения в клинике (табл. 3).

Таблица 3 – Схема определения «хронической» токсичности производственных штаммов и лекарственной формы препарата

Способ введения	Доза	Кратность введения	Срок опыта	Срок забора внутренних органов, сут
Перорально	Эквивалент суточной человеческой дозы*	Ежедневно в течение 14 или 30 сут в зависимости от предполагаемого курса лечения	14 или 30 сут с ежедневной регистрацией массы тела, признаков интоксикации	15 и 22 31 и 37

* Суточную дозу, эквивалентную человеческой ($\mathcal{E}_д$) на кг массы тела животного, рассчитывают по формуле: $\mathcal{E}_д = M_ж \cdot ЧД/M_ч$, где $M_ж$ – масса тела животного;

ЧД – человеческая доза;

$M_{ч}$ – масса тела человека (масса тела взрослого человека 70 кг, масса тела ребенка – 10 кг).

Пример расчета: $M_{ж} = 10\text{г}$; $M_{ч} = 10\text{кг} = 1 \cdot 10^4 \text{ г}$; $ЧД = 1 \cdot 10^9 \text{ КОЕ/г}$

$$\mathcal{E}_d = 10 \cdot 1 \cdot 10^9 / 1 \cdot 10^4 = 1 \cdot 10^6 \text{ КОЕ/г}$$

Препарат вводят не менее чем 20 животным 1 раз в сутки в дозе, эквивалентной предлагаемой для человека, при пересчете на 1 кг массы. Перерыв в курсе введения не допускается. Наблюдение за животными проводят в течение периода введения препарата и последующих 7 сут. Ежедневной регистрации подлежат гибель животных, масса тела, а также наличие или отсутствие возможных клинических симптомов интоксикации, в т.ч. нарушение координации движения, наличие судорог, их характер, а также состояние волосяного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек, положение хвоста. Для проведения гистологического исследования на 1 и 7 сут после последнего введения препарата забивают не менее 5 животных на каждый способ введения соответственно. Гистологическому исследованию подвергают также органы всех животных, павших в течение периода наблюдения.

Допускается проведение гистологического исследования органов одного вида или линии животных, оказавшихся более чувствительными к токсическому действию препарата.

4.4. Патоморфологическое исследование

Забой животных проводят эфирным наркозом с последующей декапитацией. Вскрытие и осмотр внутренних органов проводят сразу после забоя, обращая внимание на состояние серозных покровов и содержимое полостей. Определяют, сравнивая с контролем, массу, цвет, степень кровенаполнения органов, цвет и вязкость крови, наличие кровоизлияний (табл. 4).

Таблица 4 – Органы животных, подлежащие гистологическому исследованию

Способ введения испытуемого препарата	Исследуемые органы
---------------------------------------	--------------------

Внутривенный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, лимфатические узлы разной локализации, стенка вены и подкожная клетчатка в месте введения
Внутрибрюшинный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, лимфатические узлы разной локализации
Пероральный	Головной мозг, печень, легкие, сердце, почки, надпочечники, тимус, корень языка, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, мезентериальные лимфатические узлы

Фиксацию тканей органов проводят в 10 % растворе нейтрального формалина. Для этого 1 часть 40 % раствора формальдегида разводят 9 частями воды. Готовят раствор обязательно на водопроводной воде, т.к. вода очищенная вызывает набухание тканей. После промывания кусочки подвергают дальнейшему уплотнению путем обезвоживания в спиртах увеличивающейся концентрации.

Методика окраски срезов

Депарафинирование срезов. Парафиновые срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя – бензола, толуола, ксилола, бензина. Особенно тщательно удаляют парафин перед исследованием ткани в поляризационном микроскопе, т.к. парафин обладает двоякопреломляющим свойством.

Депарафинирование осуществляют по следующей схеме (табл. 5).

Таблица 5 – Методика депарафинирования срезов

Среда	Время, условия
Ксилол 1	10 – 15 мин, можно в термостате при 37°C
Ксилол 2	3 – 5 мин
Спирт абсолютный 1	1 – 2 мин
Спирт абсолютный 2	Ополоснуть
Спирт 96° 1	Ополоснуть
Спирт 96° 2	Ополоснуть
Вода очищенная	2 смены

После депарафинирования 100 – 350 препаратов реактивы заменяют.

Методика окрашивания срезов гематоксилин-эозином. Наиболее часто применяется окрашивание срезов гематоксилин-эозином. Этим методом можно окрашивать целлоидиновые срезы, депарафинированные, парафиновые или замороженные срезы.

Для окрашивания ядер используется гематоксилин. Наиболее распространенным является гематоксилин Эрлиха. Для его приготовления 2,0 г гематоксилина растворяют в 100 мл 96° спирта и к полученному раствору добавляют 100 мл воды очищенной, 100 мл глицерина, 3,0 г калийных квасцов и 10 мл ледяной уксусной кислоты. Все ингредиенты нужно добавлять в указанной последовательности. Полученный раствор необходимо поставить на свету и при доступе воздуха не менее чем на 15 дней с тем, чтобы гематоксилин успел окислиться в гематеин, который и является красящим веществом. Банку с раствором при этом накрывают бумажным колпачком или сложенной в несколько раз марлей. Для доокрашивания цитоплазмы после окраски ядер гематоксилином чаще всего используется 1 % водный раствор эозина.

Порядок окрашивания срезов гематоксилин-эозином следующий:

- 1) срезы переносят в дистиллированную воду на 5 – 10 мин;
- 2) окрашивают гематоксилином Эрлиха 2 – 5 мин;
- 3) промывают в воде очищенной 1 – 2 с;
- 4) промывают в водопроводной воде 3 – 5 мин;
- 5) осуществляют контроль под микроскопом;
- 6) дифференцируют 1 % раствором хлористоводородной кислоты в 70° спирте 1 – 2 с;
- 7) быстро переносят срезы в водопроводную воду на 30 мин при частой смене воды; в водопроводной воде вишневая окраска ядер сменяется синей;
- 8) осуществляют контроль под микроскопом; если хроматин и ядрышко видны недостаточно четко, то дифференцировку следует повторить

(срезы можно смотреть под большим увеличением, накрыв их покровным стеклом);

9) промывают в воде очищенной 5 – 10 мин;

10) наносят 1% водный раствор эозина на 0,5 – 1,0 мин;

11) промывают в воде очищенной (и дифференцируют, т.к. вода смывает эозин); время промывки контролируют по цвету среза;

12) проводят обезвоживание, осветляют в ксилоле, заключают в бальзам.

В спиртах эозин также отмывается, так что проводить срезы по спиртам следует быстро. Время окрашивания в гематоксилине нужно установить на первых 2 – 3 срезах и затем все срезы данного блока окрашивать одинаково.

При необходимости для уточнения характера выявленных изменений могут быть использованы другие методы окраски (окраска на фибрин, липиды, мукополисахариды и т.д.).

При изучении микропрепаратов обращают внимание на следующие изменения:

1. Нарушение в системе микроциркуляции (перераспределение крови с депонированием ее в паренхиматозных органах, стаз, агрегация эритроцитов в капиллярах и тромбообразование, повышение проницаемости стенок сосудов с развитием геморрагий, плазморрагий, мукоидной и фибриноидной дезорганизации, фибриноидного некроза).

2. Дистрофические и воспалительные изменения во внутренних органах.

3. Состояние бронхиальной системы (признаки бронхоспазма, отек стенок бронхов, десквамация слизистой оболочки, присутствие эритроцитов в просвете бронхов и альвеол) и перибронхиальных лимфатических узлов.

4. Изменения миокарда, эндокарда и перикарда (отек стромы, миоцитоллиз, мукоидное набухание миокардиоцитов, воспалительная инфильтрация и продуктивная реакция).

5. Характер и степень выраженности изменений в клубочковом и канальцевом аппарате почек.

6. Характер перестройки в органах иммунитета и кроветворения (тимусе, селезенке, лимфатических узлах, костном мозге).

7. Дистрофические и микроциркуляторные изменения в ЦНС.

Патологические изменения, возникающие у животных после введения высоких доз пробиотика, дают ценную информацию для характеристики его токсических свойств. Однако эта информация должна быть подвергнута тщательному анализу и полученные результаты следует рассматривать в качестве предупреждения, а не противопоказания для клинических испытаний.

При решении вопроса о возможности передачи препарата на клиническое изучение исследователь должен учесть следующие факторы:

1. Соотношение терапевтической и безопасной дозы (LD_{50} или максимально переносимой дозы).

2. Характер и обратимость выявленной патологии.

Заключение должно содержать суждения исследователей о степени воздействия штамма или препарата на внутренние органы испытуемых животных при исследовании «острой» и «хронической» токсичности для оценки возможных побочных реакций и определения необходимых ограничений при клинических испытаниях.

4.5. Содержание отчета об исследовании «острой» и «хронической» токсичности

Отчет об изучении «острой» и «хронической» токсичности испытуемого пробиотического штамма или препарата пробиотика должен быть составлен по определенному плану и содержать следующие необходимые разделы.

1) Введение (цель и задачи исследования).

2) Материалы и методы (биологические характеристики производственного штамма и препарата, характеристики животных, условия

их содержания, методы формирования групп и отработки доз, способы забоя животных, методы приготовления гистологических препаратов).

3) Результаты исследований (описание макро– и микроскопических изменений).

4) Заключение о наличии или отсутствии «острой» и «хронической» токсичности испытуемого штамма или препарата, в котором указываются возможные побочные эффекты и ограничения для проведения клинических испытаний.

Результаты макро- и микроскопического исследования органов животных, получавших исследуемый препарат, препарат сравнения, а также контрольных животных регистрируют в протоколах и заносят в регистрационную карту; документируют микрофотографиями (табл. 6 и 7). На основании полученных результатов оформляют заключение о токсических свойствах испытуемого препарата. Указанные материалы вместе с другими формами документации представляют в соответствующий Государственный уполномоченный орган. Гистологические препараты и парафиновые блоки сохраняют до принятия решения по результатам доклинического испытания препарата.

Таблица 6 – Форма протокола для макроскопического исследования по результатам исследования «острой» и «хронической» токсичности пробиотического штамма

Сроки проведения опыта	Испытуемый материал	Способ введения испытуемого материала	Вид/линия животных	Количество животных	Описание макроскопических изменений

Таблица 7 – Форма протокола для микроскопического исследования по результатам исследования «острой» и «хронической» токсичности пробиотического штамма

Сроки проведения опыта	Испытуемый материал	Способ введения испытуемого материала	Вид/линия животных	Количество животных	Внутренние органы*												ЦНС Головной мозг	
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

* 1 – легкие, 2 – печень, 3 – селезенка, 4 – сердце, 5 – почки, 6 – надпочечники, 7 – тимус, 8 – место введения, 9 – желудок, 10 – тонкий кишечник, 11 – толстый кишечник, 12 – регионарные л/у.