

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Колисодержащие пробиотики

ОФС.1.7.1.0005.15

Вводится впервые

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

Колисодержащие пробиотики представляют собой биомассу живых антагонистически активных штаммов кишечной палочки, лиофильно высушенную в среде культивирования с добавлением защитной среды высушивания.

Колисодержащие пробиотики по составу подразделяются на:

- *Монокомпонентные*, – полученные на основе одного производственного штамма кишечной палочки (например, *Escherichia coli* М-17);
- *Поликомпонентные*, – полученные на основе нескольких производственных штаммов бактерий, принадлежащих к разным родам и семействам (например, *Escherichia coli* М-17 и *Bifidobacterium bifidum* 1), дополняющие или потенцирующие друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам.

Производственные штаммы бактерий *Escherichia coli*

Штаммы бактерий *E. coli*, используемые для производства колисодержащих пробиотиков, депонируют в официальных коллекциях (табл. 1).

Таблица 1 – Производственные штаммы бактерий *E. coli*, используемые в производстве колисодержащих пробиотиков, зарегистрированных в РФ

Название производственного штамма бактерий <i>Escherichia coli</i>	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
<i>E. coli</i> М-17	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 240418
<i>E. coli</i> Г-35-1/59	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 790059
<i>E. coli</i> Г-35-1/60	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 790060
<i>E. coli</i> Г-35-1/61	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ) № 790061

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

Таблица 2 – Морфологические, тинкториальные и культуральные свойства производственных штаммов бактерий *E. coli*

Название штамма	Описание морфологических и культуральных свойств
<i>E. coli M-17</i>	В мазках, окрашенных по Граму, должны обнаруживаться подвижные грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной от 1,5 до 4,0 мкм. Факультативный анаэроб; через (15 ± 3) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С на мясопептонном агаре образует бесцветные круглые с ровными краями выпуклые колонии; на среде Эндо образует красные колонии с зеленоватым металлическим блеском; на мясопептонном бульоне через (3 ± 1) ч происходит равномерное помутнение среды. Оптимальная температура роста (37 ± 1) °С
<i>E. coli Г-35-1/59</i>	В мазках, окрашенных по Граму, должны быть подвижные прямые грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной от 1,5 до 4,0 мкм. Факультативный анаэроб; через (15 ± 3) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром (2,0 ± 0,5) мм с ровными краями; на среде Эндо образует красные колонии без металлического блеска; на мясопептонном бульоне через (3 ± 1) ч происходит равномерное помутнение среды. Оптимальная температура роста (37 ± 1) °С
<i>E. coli Г-35-1/60</i>	В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать подвижные прямые грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной от 1,5 до 4,0 мкм. Факультативный анаэроб; через (15 ± 3) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром (2,0 ± 0,5) мм с ровными краями; на среде Эндо образует красные колонии с металлическим блеском; на мясопептонном бульоне через (3 ± 1) ч происходит равномерное помутнение среды. Оптимальная температура роста (37 ± 1) °С
<i>E. coli Г-35-1/61</i>	В мазках, окрашенных по Граму, должны определяться подвижные прямые грамотрицательные одиночные палочки с закругленными концами длиной от 1,5 до 4,0 мкм. Факультативный анаэроб; через (15 ± 3) ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С на мясопептонном агаре образует круглые гладкие полупрозрачные слабовыпуклые колонии диаметром (2,0 ± 0,5) мм с ровными краями; на среде Эндо образует светло-красные колонии без металлического блеска; на мясопептонном бульоне через (3 ± 1) ч происходит равномерное помутнение среды. Оптимальная температура роста (37 ± 1) °С

Таблица 3 – Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий *E. coli*

Свойства	Штаммы бактерий вида <i>Escherichia coli</i>			
	<i>E. coli</i> M-17	<i>E. coli</i> Г-35-1/59	<i>E. coli</i> Г-35-1/60	<i>E. coli</i> Г-35-1/61
Ферментирует:				
сорбит	+	+	+	+
арабинозу	+	+	+	+
лизин	+	+	+	+
сахарозу	+	+	+/-	-
инозит	-	-	-	-
Ферментирует с образованием кислоты и газа:				
глюкозу	+	+	+	+
лактозу	+	+	+/-	+
мальтозу	+	+	+	+
маннит	+	+	+	+
Образует:				
индол	+	+	+	+
сероводород	-	-	-	-
Разжижает желатин	-	-	-	-
Гидролизует мочевину	-	-	-	-
Гемолитическая активность	-	-	-	-
Адгезивная активность	+	+	+	+
Антагонистическая активность (зоны задержки роста тест-штаммов на агаризованной среде Гаузе №2, мм)	не менее 10	не менее 10	не менее 10	не менее 10

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

Таблица 4 – Изучение безопасности штаммов бактерий *E. coli*

№ штамма	Безвредность		Вирулентность		Токсичность		Токсигенность	
	Вводимая доза живых <i>E.coli</i> , $\times 10^{10}$ КОЕ/ 0,5 мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза живых <i>E.coli</i> , $\times 10^9$ КОЕ/ 0,5 мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза инактивированных <i>E. coli</i> , $\times 10^9$ КОЕ/мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза, мл	Кол-во живых/ павших мышей
<i>E. coli</i> M-17	1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0
	5	10/0	0,5	5/5	0,5	5/5		
	10	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
<i>E. coli</i> Г-35-1/59	1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0
	5	10/0	0,5	5/5	0,5	5/5		
	10	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
<i>E. coli</i> Г-35-1/60	1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0
	5	10/0	0,5	5/5	0,5	5/5		
	10	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
<i>E. coli</i> Г-35-1/51	1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0	0,1	10/0
	5	10/0	0,5	5/5	0,5	5/5		
	10	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0

ПРОИЗВОДСТВО

Производство колисодержащих пробиотиков основано на выращивании/культивировании производственного штамма бактерий *E. coli* на оптимальной питательной среде в соответствующих условиях методом глубинного культивирования с последующей лиофилизацией биомассы в защитной среде.

При производстве колисодержащих пробиотиков проводят валидацию технологического процесса и методов контроля, которые в соответствии с требованиями правил организации производства и контроля качества ИЛП доказывают, что производственный процесс, оборудование, исходное сырье, деятельность персонала, конкретная методика действительно приводят к ожидаемым результатам и гарантируют, что лекарственное средство изготовлено в соответствии со своим составом, не содержит контаминантов и бактериофагов, маркировано надлежащим образом, упаковано и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

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

Колисодержащие пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизаты (флаконы), таблетки, порошки. Показатели качества лекарственного средства оценивают по соответствующей лекарственной форме.

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного средства лекарственных форм таблетки, порошки и лиофилизаты оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки» и «Порошки».

Описание. Приводится описание внешнего вида соответствующей лекарственной формы лекарственного средства.

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

Время восстановления препарата (для лиофилизатов и порошков). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Иммунобиологические лекарственные препараты» либо по методике, описанной в нормативной документации, с указанием времени получения восстановленного препарата (для лиофилизатов – не более 5 мин, для порошков – не более 20 мин, если в нормативной документации нет других указаний).

Указывают время, необходимое для растворения лекарственного препарата, применяемый растворитель (среда восстановления), его объем и, при необходимости, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание).

Время распадаемости (для таблеток). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул». Указывают время, необходимое для растворения лекарственного препарата, применяемый растворитель, его объем и, при необходимости, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание).

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

pH. Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Указывают допустимый интервал значений pH (в случае определения pH после восстановления препарата следует указать растворитель и его объем).

Потеря в массе при высушивании. Определение проводят гравиметрическим методом в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом. Показатель потери в массе при высушивании должен составлять (если нет других указаний в нормативной документации) для:

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

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

Специфическая безвредность. Определение проводят в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*». Указываются

требования и критерии специфической безвредности; требования к животным, используемым для контроля (порода/линия, пол), их количество; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность наблюдения и учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов (микробиологическая чистота). Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом прямого посева. Колисодержащие пробиотики должны соответствовать нормативным требованиям, изложенным в ОФС «Микробиологическая чистота» (если в нормативной документации не приведены другие требования):

Категория 5.3.А (лиофилизаты, порошки)

- отсутствие бактерий-контаминантов в единице препарата, г/мл;
- отсутствие дрожжевых и плесневых грибов в единице препарата, г/мл;
- для монокомпонентных препаратов – не более 10 БОЕ бактериофага в единице препарата, г/мл;
- для поликомпонентных препаратов – отсутствие БОЕ бактериофага в единице препарата, г/мл.

Категория 5.3.Б (таблетки)

- общее число аэробных бактерий – не более 10^2 КОЕ в единице препарата, г;
- общее число дрожжевых и плесневых грибов – менее 10 КОЕ в единице препарата, г;
- отсутствие энтеробактерий в единице препарата, г;
- отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в единице препарата, г;
- отсутствие *Staphylococcus aureus* в единице препарата, г;
- для монокомпонентных препаратов – не более 10 БОЕ бактериофага в единице препарата, г/мл;

- для поликомпонентных препаратов – отсутствие БОЕ бактериофага в единице препарата, г/мл.

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

Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в 1 дозе лекарственного средства и антагонистической активностью по отношению к тест-штаммам микроорганизмов. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе проводят методом серийных разведений с последующим высевом на агаризованные питательные среды (агар Эндо или мясопептонный агар, если в нормативной документации не приведены другие среды). При проведении контроля поликомпонентных пробиотиков необходимо учитывать количество и соотношение всех штаммов, входящих в препарат. В одной дозе монокомпонентного препарата *E. coli* должно содержаться не менее $6 \cdot 10^9$ КОЕ, если в нормативной документации не приведены другие требования.

Антагонистическая активность лекарственного средства в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяется методом отсроченного антагонизма на среде Гаузе № 2 или на полусинтетической среде с дрожжевым диализатом (если в нормативной документации не приведены другие среды) по зонам задержки роста тест-штаммов. Зоны задержки роста тест-штаммов условно-патогенных и патогенных бактерий и грибов рода *Candida* должны быть не менее 10 мм, если в нормативной документации не указаны другие требования.

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

В разделе должна содержаться следующая информация:

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

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

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

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

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