

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Лактосодержащие пробиотики

ОФС.1.7.1.0006.15

Вводится впервые

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

Лактосодержащие пробиотики представляют собой биомассу живых бактерий рода *Lactobacillus*, лиофильно высушенную в защитной среде (сахарозо-желатиновой, сахарозо-желатино-молочной или иной).

Лактосодержащие пробиотики по составу подразделяются на:

- *Монокомпонентные*, – полученные на основе одного производственного штамма лактобактерий (например, *L.plantarum* 8P-A3 или *L.acidophilus* La CH-2);
- *Поликомпонентные*, – полученные на основе нескольких производственных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, принадлежащих к одному виду (например, *L.acidophilus* 100аш, *L.acidophilus* НК и *L.acidophilus* К₃Ш₂₄) или к разным видам (например, *L.plantarum* и *L.acidophilus*), или на основе нескольких производственных штаммов бактерий разных родов или семейств (например, *Lactobacillus fermentum* 90Т-С4 и *Bifidobacterium bifidum* 1), дополняющих или потенцирующих друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам.

- *Комбинированные*, – полученные на основе одного или нескольких производственных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, или на основе нескольких производственных штаммов бактерий разных родов или семейств и содержащие, помимо живых микроорганизмов-представителей нормофлоры, другие активные компоненты (например, *L.fermentum* 90Т-С4, *B. bifidum* 1 и Силимар экстракт сухой или *L.rhamnosus*, витамины и микроэлементы).

Производственные штаммы бактерий рода *Lactobacillus*

Штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, используемые для производства лактосодержащих пробиотиков, депонируют в официальных коллекциях (табл. 1).

Таблица 1– Производственные штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, используемые в производстве лактосодержащих пробиотиков в РФ

Название производственного штамма бактерий рода <i>Lactobacillus</i>	Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита
<i>L.acidophilus</i> 100аш	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-3190
<i>Lacidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-3090
<i>Lacidophilus</i> НК ₁	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8957 (В центральной лаборатории ВНИМИ № 22/10)
<i>Lacidophilus</i> НК ₂	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8958
<i>L.acidophilus</i> НК ₅	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8959
<i>Lacidophilus</i> НК ₁₂	Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8960
<i>L.plantarum</i> 8Р-А3	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), № 900811
<i>Lfermentum</i> 90Т-С4	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), № 900812
<i>Lplantarum</i> 7-19 (38)	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), №790038
<i>L.fermentum</i> 1-20 (39)	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), №790039

Производственные штаммы бактерий рода *Lactobacillus* 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 ОФС «Безопасность пробиотиков *in vivo*».

Штаммы ацидофильных лактобацилл среднеустойчивы к колистину, триметоприму, азтреонаму, канамицину, суфадиазину, норфлоксацину. Они чувствительны к антибиотикам группы цефалоспоринов.

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

Название штамма	Описание морфологических и культуральных свойств
<i>L.acidophilus</i> 100аш <i>L.acidophilus</i> К ₃ Ш ₂₄	Факультативные анаэробы, микроаэрофилы растут в присутствии азота и углекислого газа в атмосфере. Грамположительные прямые бесспорные палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек из 2 – 4 и более клеток. Штаммы, применяемые для изготовления препарата, могут находиться в S и R-форме. Размер клеток 18-часовой культуры, выращенной в молоке, составляет 10–20 мкм. Клетки равномерно окрашиваются метиленовой синью. При выращивании на агаре с гидролизованным молоком через 48–72 ч роста штаммы образуют «локонообразные» колонии на поверхности агара и колонии в виде «паучков» в глубине агара. Диаметр колоний – 1–2 мм. Штаммы обладают высокой активностью свертывания молока. При оптимальной для роста температуре и внесении 3–5% посевного материала должны свертывать молоко за 1–12 ч, снижая рН молока до уровня 3,8 – 4,2.
<i>L.acidophilus</i> NK ₁ <i>Lacidophilus</i> NK ₂ <i>L.acidophilus</i> NK ₅ <i>L.acidophilus</i> NK ₁₂	Факультативные анаэробы, микроаэрофилы; растут в присутствии азота и углекислого газа в атмосфере. Грамположительные прямые бесспорные палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек из 2–4 и более клеток или поодиночке. Штаммы, применяемые для изготовления препарата, могут находиться в S- и R-форме. Величина клеток 18-часовой культуры в молоке составляет 10–20 мкм. Клетки равномерно окрашиваются по Граму. При выращивании на агаре с гидролизованным молоком через 48–72 ч роста штаммы образуют «локонообразные» колонии на поверхности агара и колонии в виде «паучков» в глубине агара. Диаметр колоний – 1–2 мм. При культивировании на среде МРС-5 в анаэробных или микроаэрофильных условиях через 48–72 ч штаммы образуют круглые без четких границ колонии.
<i>L.plantarum</i> 8P-A3 <i>L.plantarum</i> 7-19	Факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа и азота, а также в присутствии кислорода. На жидкой среде МРС-1

	вырастают в виде равномерной мути и гомогенного белого осадка на дне пробирки; на полужидкой среде МРС-2 образуют изолированные колонии в виде тяжей. На плотной среде МРС-4 образуют выпуклые, непрозрачные, белые колонии
<i>L.fermentum</i> 90Т-С4 <i>Lfermentum</i> 1-20	Факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа и азота, а также в присутствии кислорода. На жидкой среде МРС-1 дают равномерное помутнение и образуют гомогенный белый осадок на дне пробирки; на полужидкой среде МРС-2 образуют изолированные колонии в виде тяжей. На плотной среде МРС-4 образуют слабовыпуклые, полупрозрачные, сероватые колонии

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

Свойства	Штаммы бактерий рода <i>Lactobacillus</i>			
	<i>L.acidophilus</i> 100аш, К ₃ Ш ₂₄	<i>L.acidophilus</i> НК ₁ , НК ₂ НК ₅ , НК ₁₂	<i>L. plantarum</i> 8P-A3, 7-19	<i>L.fermentum</i> 90Т-С4, 1-20
Ферментация:				
- глюкоза	+	+	+	+
- лактоза	+	+	+	+
- галактоза	+	+	+	+
- манноза	+	+	+	+
- декстроза	+	+	+	+
- фруктоза	+	+	+	+
- мальтоза	+	+	+	+
- сахароза	+	+	+	+
- целлобиоза	+	+	+	В
- салицин	+	+	+	-
- маннит	-	-	+	-
- рамноза	-	-	-	-
- ксилоза	-	-	В	В
- сорбит	-	-	+	-
- арабиноза	-	-	В	В
- эскулин	+	+	+	-
- меллибиоза	+	В	+	+
- трегалоза	В	В	+	В
- мелецитоза	-	-	В	-
Образование газа из глюкозы	-	-	-	+
Образование кислоты из глюкозы	+	+	+	+
Каталаза	-	-	-	-
Лизоцимная активность	±	±	-	+
Оптимальная температура роста, °С	(38±1)	(38±1)	(37±1)	(37±1)
Рост при температуре 61 °С	+	+	±	±
Рост при температуре 20 °С	+	+	+	+
Рост при температуре 15 °С	-	-	+	-
Сквашивание молока	+	+	+	+
	L(+)-DL-молочная кислота	L(+)-DL-молочная кислота		

Рост в щелочной среде (pH=8)	+	+	±	±
Рост в присутствии 0,4–0,6 % растворе фенола	+	+	±	±
Рост в присутствии солей желчи (до 20 %)	+	+	±	±
Рост в 2% растворе NaCl	+	+	±	±
Адгезивная активность	-	-	+	+
Активность кислотообразования, °Т	не ниже 230	не ниже 230	не ниже 230	не ниже 230
Антагонистическая активность (зоны задержки роста тест-штаммов, мм)	не менее 20	не менее 20	не менее 20	не менее 20

Примечание: «+» положительный тест: «-» отрицательный тест

Таблица 4 – Изучение безопасности штаммов бактерий рода *Lactobacillus*

Название микроорганизма (род, штамм)	Безвредность		Вирулентность		Токсичность		Токсигенность	
	Вводи-мая доза, $\times 10^{10}$ КОЕ/0,5мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводи-мая доза, $\times 10^9$ КОЕ/0,5мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводи-мая доза, $\times 10^9$ КОЕ/мл	Кол-во живых/павших мышей	Вводи-мая доза, мл	Кол-во живых/павших мышей
<i>L. acidophilus</i> 100аш К ₃ Ш ₂₄ НК ₁ НК ₂ НК ₅ НК ₁₂	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0	1,0	10/0
	10	10/0	10	10/0	10	10/0		
<i>L. plantarum</i> 8P-A3,7-19 (38)	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0		
	10	10/0	10	10/0	10	10/0	1,0	10/0
<i>L. fermentum</i> 90T-C4, 1-20 (39)	1	10/0	1	10/0	1	10/0	0,5	10/0
	5	10/0	5	10/0	5	10/0		
	10	10/0	10	10/0	10	10/0	1,0	10/0

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лактосодержащих пробиотиков основано на выращивании/культивировании производственного штамма или штаммов бактерий рода *Lactobacillus* на оптимальной питательной среде в адекватных условиях методом глубинного культивирования с последующей лиофилизацией биомассы в защитной среде.

При производстве лактосодержащих пробиотиков проводят валидацию технологического процесса и методов контроля, которые в соответствии с

требованиями правил организации производства и контроля качества лекарственных средств доказывают, что конкретная методика, процесс, оборудование, исходное сырье, деятельность персонала или система действительно приводят к ожидаемым результатам и гарантируют, что лекарственное средство соответствует своему составу, не содержит контаминантов, маркировано надлежащим образом, упаковано и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

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

Лактосодержащие пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизаты (флаконы), порошки, таблетки, капсулы (пероральные, вагинальные, капсула в капсуле), суппозитории и мази. Показатели качества лекарственного средства оценивают в соответствии с лекарственной формой.

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного средства лекарственных форм лиофилизаты, таблетки и капсулы, порошки, суппозитории и мази оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Таблетки» и «Капсулы», «Порошки», «Суппозитории» и «Мази».

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).

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

Указывают применяемый растворитель (среда распадаемости), его объем и, при необходимости, условия растворения (температуру растворителя, перемешивание, встряхивание, использование водяной бани).

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

Температура плавления или время полной деформации (для суппозиторий и мазей). Для суппозиторий, изготовленных на липофильной основе, определяют температуру плавления в соответствии с ОФС «Суппозитории», «Мази» и «Температура плавления» (метод 2), которая не должна превышать температуру 37 °С, если нет других указаний в нормативной документации. Если определение температуры плавления затруднительно, то определяют время полной деформации.

Для суппозиторий на липофильной основе определяют время полной деформации в соответствии с ОФС «Определение времени полной деформации суппозиторий на липофильной основе». Время полной деформации не должно превышать 20 мин, если нет других указаний в нормативной документации.

pH (для лиофилизатов, порошков, капсул, таблеток). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС

«Ионометрия». Указывается допустимый интервал значений рН; в случае определения рН после растворения следует указать растворитель и его объем.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизатов, капсул, таблеток). 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 %;
- капсул – не более 3,5 %;
- таблеток – не более 4,5 %;
- порошков – не более 5,0 %.

Средняя масса и отклонения от средней массы (для порошков, таблеток, содержимого капсул, суппозиторий и мазей). 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, групповая масса животных перед введением препарата и после окончания срока наблюдения; 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 возможной контаминации испытуемого препарата проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» методом прямого посева. Лактосодержащие

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

- категории 5.3.А (лиофилизаты, порошки);
- категории 5.3.Б (таблетки, капсулы, суппозитории, мази*).

* Дополнительно для лекарственной формы мази: в единице препарата (г) должны отсутствовать представители рода *Bacillus*.

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

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

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

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

В 1 дозе (таблетке, капсуле и т.д.) препарата должно содержаться:

- лактобактерий вида *L.acidophilus* – не менее 10^7 КОЕ;
- лактобактерий вида *L.plantarum* – не менее 10^9 КОЕ.

Активность кислотообразования штамма-продуцента, входящего в испытуемый препарат, должна быть не менее 220°Т (если нет других указаний в нормативной документации).

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

В разделе должна содержаться информация:

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

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

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

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

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