

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Споровые пробиотики

ОФС.1.7.1.0009.15

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики, содержащие апатогенные спорообразующие бактерии (далее по тексту – «споровые пробиотики»).

Споровые пробиотики представляют собой биомассу живых бактерий рода *Bacillus*, лиофильно высушенную в защитной среде, либо их суспензию в 7 % растворе натрия хлорида.

Споровые пробиотики по составу подразделяются на:

- *Монокомпонентные*, полученные на основе одного производственного штамма бактерий рода *Bacillus* (например, *B.subtilis* 534 или *B.subtilis* 3Н);
- *Поликомпонентные*, полученные на основе нескольких производственных штаммов бактерий рода *Bacillus*, принадлежащих к разным видам (например, *B.subtilis* 3 и *B.licheniformis* 31), дополняющие или потенцирующие друг друга по ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам.

Производственные штаммы бактерий рода *Bacillus*

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

Таблица 1 – Производственные штаммы бактерий рода *Bacillus*, используемые в производстве споровых пробиотиков в РФ

| Название производственного штамма бактерий рода <i>Bacillus</i> | Место депонирования, коллекционный номер штамма-депозита |
|---|---|
| <i>B. subtilis 3</i> | Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-2335 |
| <i>B. licheniformis 31</i> | Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-2336 |
| <i>B. subtilis 534</i> | Всероссийская коллекция микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина РАН; ВКМ № 1666 Д |
| <i>B. subtilis 3 Н</i> | Государственная коллекция патогенных микроорганизмов, Россия (ГКПМ), № 248 |

Производственные штаммы бактерий рода *Bacillus* 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*».

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

| Название штамма | Описание морфологических и культуральных свойств |
|----------------------------|--|
| <i>B. subtilis 3</i> | Грамположительные аэробные спорообразующие палочки размером 2,7×0,8 мкм, расположенные одиночно или в виде цепочек. Клетки подвижны, образуют споры овальной формы, которые располагаются в центре клетки. При спорообразовании клетки не раздуваются. Аэроб; не растет в анаэробных условиях. На питательной среде в мясопептонном агаре (МПА) или среде Гаузе № 2 после инкубации при температуре (37±1) °С в течение 24 ч образует матовые складчатые колонии телесного цвета с изрезанными краями, легко снимающиеся петлей с агаризованной среды. На мясопептонном бульоне (МПБ) или бульоне Хоттингера образует беловатую пленку, вызывая незначительное помутнение среды |
| <i>B. licheniformis 31</i> | Грамположительные спорообразующие палочки размером 2,5×0,6 |

| | |
|------------------------|---|
| | <p>мкм располагаются в основном в виде цепочек. Клетки подвижны, образуют споры овальной формы, расположенные в центре клетки. При спорообразовании клетки не раздуваются.</p> <p>Может расти в анаэробных условиях. На питательной среде МПА или Гаузе № 2 после инкубации при температуре (37±1) °С в течение 24–48 ч образует гладкие круглые коричневатые колонии, плохо снимающиеся петлей с агаризованной среды. В МПБ дает придонный рост с помутнением среды</p> |
| <i>B. subtilis</i> 534 | <p>Грамположительные аэробные спорообразующие палочки, размером 2,8×0,7 мкм, расположенные одиночно или в виде цепочек. Клетки подвижны, образуют споры овальной формы, которые располагаются в центре клетки. При спорообразовании клетки не раздуваются.</p> <p>Не растет в анаэробных условиях. На питательной среде МПА после инкубации при температуре (37±1) °С в течение 24 ч образует белые шероховатые и гладкие колонии (допустимо наличие до 50 % гладких белых колоний), легко снимающиеся петлей с агаризованной среды. На МПБ или бульоне Хоттингера растет в виде беловатой пленки и слабого придонного осадка, вызывая незначительное помутнение среды</p> |
| <i>B. subtilis</i> 3 Н | <p>Грамположительные аэробные спорообразующие палочки, размером (1,5–4,0)×(0,4– 0,6) мкм, расположенные одиночно или в виде цепочек. Клетки подвижны, образуют споры овальной формы, которые располагаются в центре клетки. При спорообразовании клетки не раздуваются.</p> <p>Не растет в анаэробных условиях. На питательной среде Гаузе № 2 или полусинтетической среде с дрожжевым диализатом после инкубации при температуре (37±1) °С в течение 24 ч образует шероховатые розовато-бежевые или коричневые колонии с фестончатыми краями, легко снимающиеся петлей с агаризованной среды (допустимо наличие до 20 % гладких белых или прозрачных колоний). На МПБ образует беловатую пленку и слабый придонный осадок, вызывая незначительное помутнение среды</p> |

Таблица 3—Физиолого-биохимические свойства производственных штаммов бактерий рода *Bacillus*

| Свойства | Штаммы бактерий рода <i>Bacillus</i> | | | |
|---|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | <i>B. subtilis</i> 3 | <i>B. licheniformis</i> 31 | <i>B. subtilis</i> 3 Н | <i>B. subtilis</i> 534 |
| Ферментация | | | | |
| - глюкозы | + | + | + | + |
| - арабинозы | + | - | + | + |
| - ксилозы | + | + | + | + |
| - маннита | + | + | + | + |
| Образование кислоты и газа из глюкозы | - | - | - | - |
| Образование кислоты из глюкозы | + | + | + | + |
| Утилизация | | | | |
| - цитрата | + | + | + | + |
| - пропионата | - | + | - | - |
| Гидролиз | | | | |
| - крахмала | + | + | + | + |
| - мочевины | - | - | - | - |
| - казеина | + | + | + | + |
| - тирозина | - | - | - | - |
| Редукция нитратов | + | + | + | + |
| Образование газа из NO ₃ ⁻ в анаэробных условиях | - | + | - | - |
| Обесцвечивание метиленового синего | + | + | + | + |
| Каталаза | + | + | + | + |
| Реакция Фогес-Проскауэра | + | + | + | + |
| Аргининдегидролаза | - | + | + | - |
| Лецитиназа | - | - | - | - |
| Гиалуронидаза | - | - | - | - |
| Гемолитическая активность | - | - | - | - |
| Образование глобул поли-β-ксимасляной кислоты на глюкозном агаре | - | - | - | - |
| Лизоцимная активность | + | + | - | + |
| Рост при 50 °С | + | + | + | + |
| Рост при 65 °С | - | - | - | - |
| Рост в 7 % NaCl | + | + | + | + |
| Устойчивость к воздействию желудочного сока | + | + | + | + |
| Устойчивость к воздействию желчи | + | + | + | + |
| Адгезивная активность | - | - | - | - |
| Антагонистическая активность (зоны задержки роста тест-штаммов в мм на агаризованной среде Гаузе 2) | не менее 10–15 | не менее 10–15 | не менее 10–15 | не менее 10–15 |

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

Таблица 4– Изучение безопасности штаммов бактерий рода *Bacillus*

| № штамма | Безвредность | | Вирулентность | | Токсичность | | Токсигенность | |
|----------------------------|--|-------------------------------------|---|-------------------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| | Вводи- мая доза, ×10 ¹⁰ КОЕ/ 0,5мл | Кол-во живых/ павших мышей | Вводи- мая доза, ×10 ⁹ КОЕ/ 0,5мл | Кол-во живых/ павших мышей | Вводи- мая доза, ×10 ⁹ КОЕ/мл | Кол-во живых/ павших мышей | Вводи- мая доза, мл | Кол-во живых/ павших мышей |
| <i>B. subtilis</i> 3 | 0,1 | 10/0 | 0,5 | 10/0 | 0,5 | 10/0 | 0,5 | 10/0 |
| | 1 | 10/0 | 1 | 10/0 | 1,0 | 10/0 | | |
| | 10 | 10/0 | 10 | 10/0 | 2,0 | 10/0 | | |
| <i>B. licheniformis</i> 31 | 0,1 | 10/0 | 0,5 | 10/0 | 0,5 | 10/0 | 0,5 | 10/0 |
| | 1 | 10/0 | 1 | 10/0 | 1,0 | 10/0 | | |
| | 10 | 10/0 | 10 | 10/0 | 2,0 | 10/0 | | |
| <i>B. subtilis</i> 534 | 0,1 | 10/0 | 0,5 | 10/0 | 0,5 | 10/0 | 0,5 | 10/0 |
| | 1 | 10/0 | 1 | 10/0 | 1,0 | 10/0 | | |
| | 10 | 10/0 | 10 | 10/0 | 2,0 | 10/0 | | |
| <i>B. subtilis</i> 3H | 0,1 | 10/0 | 0,5 | 10/0 | 0,5 | 10/0 | 0,5 | 10/0 |
| | 1 | 10/0 | 1 | 10/0 | 1,0 | 10/0 | | |
| | 10 | 10/0 | 10 | 10/0 | 2,0 | 10/0 | | |

ПРОИЗВОДСТВО

Производство споровых пробиотиков основано на выращивании/культивировании производственного штамма (или штаммов) бактерий рода *Bacillus* на оптимальной питательной среде в соответствующих условиях методом поверхностного или глубинного культивирования с возможной последующей лиофилизацией полученной биомассы в защитной среде.

При производстве споровых 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 лекарственный препарат получен в соответствии со своим составом, не

содержит контаминантов, маркирован надлежащим образом, упакован и сохраняет свои свойства в течение всего срока годности.

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

Споровые пробиотики для медицинского применения выпускают в следующих лекарственных формах: лиофилизаты (флаконы), суспензии, таблетки и капсулы.

Показатели качества лекарственного препарата оценивают по соответствующей лекарственной форме (лиофилизата во флаконе, суспензии, таблеток и капсул).

ИСПЫТАНИЯ

Показатели качества лекарственного препарата в лекарственной форме лиофилизаты, суспензии, таблетки и капсулы оценивают в соответствии с требованиями ОФС «Суспензии», «Таблетки» и «Капсулы».

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

Подлинность. Подлинность подтверждают следующими методами – микроскопическим (окраской мазков по Граму или по Цилю-Нильсену), 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). 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, 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 и капсул). Испытание проводят в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул».

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

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

pH (для лиофилизатов, суспензий, капсул, таблеток). Испытание проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия». Указывают допустимый интервал значений pH; в случае определения pH после восстановления препарата следует указать растворитель (среда восстановления) и его объем.

Потеря в массе при высушивании (для лиофилизатов, капсул, таблеток). Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» или другим валидированным методом, указанным в фармакопейной статье или нормативной документации. Показатель потери в массе при высушивании должен составлять (если нет других указаний в нормативной документации):

- лиофилизаты – не более 3,5 %;
- капсулы – не более 3,5 %;
- таблетки – не более 4,5 %.

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

Извлекаемый объем (для суспензий). Определение проводят в соответствии с ОФС «Извлекаемый объем». Извлекаемый объем должен соответствовать требованиям, указанным в нормативной документации, и должен быть не менее номинального.

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, и их количество; дозы, условия разведения и методы введения лекарственного средства; продолжительность наблюдения, учитываемые показатели. Лекарственное средство должно быть безвредным.

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

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

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

Специфическая активность. Специфическая активность определяется количеством жизнеспособных бактерий в 1 дозе лекарственного средства и антагонистической активностью препарата по

отношению к тест-штаммам. Определение проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков».

В 1 дозе препарата должно содержаться не менее 10^9 КОЕ, если в нормативной документации не указаны другие требования. 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.

Определение количества живых бактериальных клеток в 1 дозе готового препарата проводят методом серийных разведений с последующим высевом на оптимальные питательные среды (на агаризованную среду Гаузе №2, полусинтетическую среду с дрожжевым диализатом 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.

Антагонистическую активность лекарственного средства в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов определяют методом отсроченного антагонизма на агаризованной среде Гаузе № 2 или полусинтетической среде с дрожжевым диализатом (если в нормативной документации не приведены другие среды) по зонам задержки роста тест-штаммов (в мм).

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 3 года, 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.