

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Безопасность пробиотиков

ОФС.1.7.2.0001.15

в тестах *in vivo*

---

Вводится впервые

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы определения безопасности пробиотических производственных штаммов и пробиотиков, приготовленных на их основе, для медицинского применения.

Для определения безопасности испытуемого препарата используют биологические методы *in vivo*. Биологическими методами *in vivo* определяют следующие показатели:

1. Безвредность (раздел 1);
2. Вирулентность (раздел 2);
3. Токсичность (раздел 3);
4. Токсигенность (раздел 4).

### ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Требования к безопасности испытуемого препарата касаются подтверждения безвредности и отсутствия токсичности, токсигенности и вирулентности. Испытания на безопасность позволяют выявлять возможные реакции на введение лекарственного препарата, доказывающие отсутствие риска причинения вреда здоровью в результате его применения.

Контроль испытуемого препарата по показателю «Безвредность» является обязательным при отборе и хранении производственных штаммов, отработке новых технологий производства лекарственного средства, при предварительном и сертификационном контроле, при оценке качества и проверке стабильности лекарственных форм в процессе установления срока

годности. Целью проведения теста на безвредность является выявление негативного воздействия испытуемого препарата на организм животного, при вероятном образовании токсических примесей (например, при нарушении производственного регламента, нарушениях условий хранения и т.п.).

Показатели «Вирулентность», «Токсичность» и «Токсигенность» являются обязательными при контроле безопасности производственных штаммов бактерий вида *Escherichia coli*, родов *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*, *S.boulardii* и др. микроорганизмов (разделы 2, 3 и 4 настоящей ОФС). Целью проведения тестов на вирулентность, токсичность и токсигенность является выявление возможной патогенности испытуемых штаммов, превышающей установленный ранее допустимый уровень, что может контролироваться по летальности животных или развитию у них интоксикации. Производственные штаммы контролируются не реже 1 раза в год.

## ИСПЫТАНИЯ

### **Раздел 1. Безвредность**

Испытание безвредности испытуемого препарата осуществляют при пероральном введении беспородным белым мышам одной человеческой дозы испытуемого препарата<sup>1</sup>.

#### ***Пробоподготовка***

Испытуемый препарат растворяют или разводят, в случае необходимости, 0,9 % раствором натрия хлорида для инъекций, подогретым до температуры 37 °С (если в фармакопейной статье нет иных указаний).

1. Приготовление испытуемого производственного штамма. Восстановление производственного штамма (из лиофилизированного состояния или среды хранения) проводят с использованием адекватных

---

<sup>1</sup> Человеческая доза доза испытуемого препарата, указанная на этикетке или в инструкции по его медицинскому применению (листочке-вкладыше).

питательных сред и в адекватных условиях, принятых для определенной таксономической группы микроорганизмов в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков»».

Для испытания используют культуру второго или третьего пассажа, которую инкубируют на адекватной плотной питательной среде в адекватных для данного штамма условиях. Выросшую культуру смывают с поверхности плотной питательной среды 0,9 % раствором натрия хлорида. Смыв (суспензию) собирают в стерильную посуду (флакон, пробирку и т.д.). Для определения концентрации микробных клеток в полученной суспензии в оптических единицах (ОЕ) используют стандартный образец мутности 10 ЕД в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток». Затем суспензию бактерий разводят 0,9 % раствором натрия хлорида, получая тест-дозы испытуемых микроорганизмов в концентрации  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  ОЕ в объеме 0,5 мл или не более 1,0 мл (если в фармакопейной статье нет иных указания по определению тест-дозы).

Производственные штаммы контролируются не реже 1 раза в год.

2. Приготовление испытуемого препарата. Методом случайной выборки отбирают не менее 5 – 6 образцов каждой серии препарата (если в фармакопейной статье не даны иные указания). Затем готовят испытуемые образцы следующим образом:

- *лиофилизат во флаконе:* содержимое флакона ресуспензируют в 0,9 % растворе натрия хлорида, подогретого до температуры  $37^{\circ}\text{C}$ , из расчета 0,5 мл на 1 дозу и перемешивают пипеткой 8 – 10 раз;

- *порошки:* содержимое 2 пакетов разводят в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, подогревают до температуры  $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  и перемешивают пипеткой 8 – 10 раз;

- *таблетки:* 6 таблеток растирают в стерильной фарфоровой ступке фарфоровым пестиком, дробно (из расчета 1 мл на 1 таблетку)

добавляют 6 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, подогретого до температуры 37 °С, и перемешивают до гомогенной суспензии; затем суспензию пипеткой переносят в стерильный флакон;

- *капсулы*: содержимое 6 капсул помещают во флакон с 6 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (из расчета 1 мл на 1 капсулу), флаконы помещают на водяную баню при температуре  $(38 \pm 1)$  °С; через 20 – 30 мин полученную суспензию перемешивают до гомогенного состояния;

- *суппозитории*: 6 суппозиторияев заливают 3 мл (из расчета 0,5 мл на 1 суппозиторий) 0,9% раствора натрия хлорида, предварительно нагретого до температуры  $(39 \pm 1)$  °С, выдерживают на водяной бане при той же температуре в течение 20 – 30 мин и перемешивают пипеткой до гомогенного состояния.

### ***Методика испытания***

Испытания проводят на 5 здоровых белых беспородных мышах одного пола массой 14 – 16 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных. Животных не кормят за 3–5 ч до испытания.

Перед испытанием определяют групповую массу тела мышей. Взвешивание проводят непосредственно перед опытом.

Тест-доза испытуемого препарата должна содержаться в объеме 0,5 мл или не более 1,0 мл на животное. Перед каждым введением суспензию приготовленного испытуемого препарата перемешивают 6 – 8 раз. Суспензию вводят каждой мыши перорально в желудок при помощи специальной насадки на шприц (игла с незначительным изгибом и наплавленной оливой или резиновый зонд; наличие изгиба допускает введение иглы в пищевод животного) со скоростью 0,1 мл/с.

Наблюдение за мышами осуществляют в течение 5 сут. По истечении срока наблюдения определяют групповую массу тела мышей.

### ***Учет и интерпретация результатов***

Препарат считают выдержавшим испытание, если в течение всего срока наблюдения:

- отсутствует гибель подопытных животных;
- отсутствует снижение групповой массы тела животных по сравнению с исходной.

В случае гибели в течение срока наблюдения хотя бы одного животного или при снижении групповой массы тела испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле ни одно из животных не погибает и групповая масса не снижается по сравнению с исходной массой, препарат считают выдержавшим испытание.

### **Раздел 2. Вирулентность**

Вирулентность – биологическое свойство микроорганизмов, характеризующее степень их патогенности. Вирулентность является штаммовым признаком, который может усиливаться или ослабляться вплоть до полного исчезновения под влиянием различных факторов внешней среды. Для характеристики вирулентности пользуются количественными показателями, определяющими способность исследуемой микробной культуры вызывать гибель «искусственно» зараженных ею подопытных животных.

#### ***Пробоподготовка***

Проводят восстановление испытуемого производственного штамма (из лиофилизированного состояния или среды хранения) с использованием адекватных питательных сред и в адекватных условиях, принятых для определенной таксономической группы микроорганизмов, в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Для испытания используют культуру второго или третьего пассажа, выращенную на адекватной плотной питательной среде. Выросшую культуру с поверхности плотной питательной среды смывают стерильным

0,9 % раствором натрия хлорида. Смыв собирают в стерильную посуду (флакон, пробирку и т.д.).

Определяют концентрацию микробных клеток в полученной суспензии, используя стандартный образец мутности 10 ЕД в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток». Из полученной суспензии делают ряд десятикратных разведений в 0,9 % растворе натрия хлорида, получая тест-дозы испытуемого производственного штамма  $-10^8$ ;  $10^9$ ;  $10^{10}$  ОЕ в объеме 0,5 мл (если в фармакопейной статье не даны иные указания по количеству микробных клеток в тест-дозе).

### ***Методика испытания***

Изучение вирулентности осуществляют при однократном внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам тест-доз испытуемого препарата.

Испытания проводят на здоровых белых беспородных мышах одного пола массой 12 – 14 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных.

В опыте на 1 тест-дозу используют 10 мышей. Перед испытанием определяют групповую массу тела мышей. Взвешивание проводят непосредственно перед опытом.

Тест-доза испытуемого препарата должна содержаться в объеме 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Испытуемый препарат в указанном объеме вводят каждой мышке внутрибрюшино со скоростью 0,1 мл/с.

Наблюдение за мышами осуществляют в течение 5 – 7 сут (если в фармакопейной статье не даны иные указания). За животными наблюдают ежедневно, отмечая в протоколе опыта количество живых и павших животных. По истечении срока наблюдения определяют групповую массу тела мышей.

### ***Учет и интерпретация результатов***

Испытуемый штамм выдерживает испытание, если в течение всего срока наблюдения ни в одной из групп:

- не погибает ни одно из подопытных животных;
- ни у одного из животных не проявляются признаки интоксикации;
- групповая масса тела мышей не снижается по сравнению с исходной массой.

При отсутствии гибели животных, признаков нарушения здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения следует сделать заключение, что при введении максимально переносимой дозы штамм не обладает вирулентностью.

В случае гибели в течение срока наблюдения хотя бы одной мыши или при снижении групповой массы тела испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле ни одна из мышей не погибает и групповая масса не снижается по сравнению с исходной массой, испытуемый штамм бактерий считают невирулентным.

### **Раздел 3. Токсичность**

Токсичность является важной характеристикой микроорганизмов, определяющей их способность вызывать патологические изменения в организме человека. Токсичность бактерий обусловлена наличием эндотоксинов, которые термостабильны и высвобождаются из бактериальных клеток грамотрицательных бактерий после их разрушения

#### ***Пробоподготовка***

Восстановление испытуемого производственного штамма бактерий (из лиофилизированного состояния или среды хранения) проводят с использованием адекватных питательных сред и в адекватных условиях, принятых для определенной таксономической группы бактерий, в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы

для контроля пробиотиков». Для испытания используют культуру второго или третьего пассажа, выращенную на адекватной плотной питательной среде. Выросшую культуру бактерий смывают с поверхности плотной питательной среды 0,9 % раствором натрия хлорида. Полученную суспензию микроорганизмов переносят в стерильную посуду (флакон, пробирку и т.д.), затем инактивируют на водяной бане при температуре 100 °С в течение 1 ч.

После остывания определяют концентрацию микробных клеток в полученной суспензии, используя стандартный образец мутности 10 ЕД, в соответствии с ОФС «Определение концентрации микробных клеток». Из полученной суспензии делают ряд десятикратных разведений в 0,9% растворе натрия хлорида, получая тест-дозы –  $0,5 \cdot 10^9$ ;  $1,0 \cdot 10^9$ ;  $2,0 \cdot 10^9$  микробных клеток в объеме 0,5 мл (если в фармакопейной статье не даны иные указания).

#### ***Методика испытания***

Испытание токсичности осуществляют при однократном внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам тест-доз испытуемого штамма бактерий.

Испытания проводят на здоровых белых беспородных мышах одного пола массой 12 – 14 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных. В опыте на одну тест-дозу используют 10 мышей. Перед испытанием определяют групповую массу всех мышей. Взвешивание проводят непосредственно перед опытом.

Тест-доза испытуемого препарата должна содержаться в объеме 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Тест-дозу вводят каждой мыши внутрибрюшино со скоростью 0,1 мл/с.

Осуществляют ежедневное наблюдение за животными в течение 5 сут (если в фармакопейной статье не даны иные указания), отмечая в протоколе опыта количество живых и павших мышей. По истечении срока наблюдения определяют групповую массу животных.

### ***Учет и интерпретация результатов***

Испытуемый штамм бактерий выдерживает испытание, если в течение всего срока наблюдения ни в одной из групп:

- не погибает ни одно из подопытных животных;
- ни у одного из животных не проявляются признаки интоксикации;
- групповая масса тела мышей не снижается по сравнению с исходной массой.

При отсутствии погибших животных, признаков нарушения их здоровья и потери массы тела к концу срока наблюдения следует сделать заключение, что при введении максимально переносимой дозы штамм не обладает токсичностью.

В случае гибели в течение срока наблюдения хотя бы одной мыши или при снижении групповой массы тела испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Если при повторном контроле ни одна из мышей не погибает и групповая масса не снижается по сравнению с исходной массой, испытуемый штамм бактерий считают нетоксичным.

### **Раздел 4. Токсигенность**

Токсигенность бактерий фенотипически проявляется в образовании белковых токсинов (экзотоксинов), полностью или частично секретируемых в окружающую среду.

#### ***Пробоподготовка***

Восстановление испытуемого производственного штамма бактерий (из лиофилизированного состояния или среды хранения) проводят с использованием адекватных питательных сред и в адекватных условиях, принятых для определенной таксономической группы бактерий в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков». Для испытания используют культуру второго или третьего пассажа, выращенную на адекватной жидкой питательной среде

при температуре ( $36 \pm 1$ ) °С в течение 10 сут для накопления в среде токсина (в случае токсигенности штамма бактерий). По истечению срока культивирования пробирку с выросшей культурой центрифугируют при 8000 об/мин в течение 30 мин, либо фильтруют через бактериальный фильтр. Полученную надосадочную жидкость или фильтрат (неразведенный токсин) используют в следующих тест-дозах: 0,1; 0,5; 1,0 мл.

### ***Методика испытания***

Определение токсигенности испытуемого штамма бактерий осуществляют при однократном внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам тест-доз надосадочной жидкости или фильтрата.

Испытания проводят на здоровых белых беспородных мышах одного пола массой 12 – 14 г, прошедших карантин и ранее не использованных в экспериментах. В опыте на одну тест-дозу используют 10 мышей. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных. Перед испытанием определяют групповую массу тела мышей. Взвешивание проводят непосредственно перед опытом.

Полученную надосадочную жидкость или фильтрат вводят мышам внутрибрюшинно в тест-дозах 0,1; 0,5; 1,0 мл. Контролем служит группа мышей, получавших стерильную жидкую среду в том же объеме.

За животными наблюдают ежедневно в течение 5 сут (если в фармакопейной статье не даны иные указания) отмечая в протоколе опыта количество живых и павших животных. По истечении срока наблюдения определяют групповую массу тела мышей.

### ***Учет и интерпретация результатов***

Испытуемый штамм бактерий выдерживает испытание, если в течение всего срока наблюдения:

- не погибает ни одно из подопытных животных,
- ни у одного из животных не проявляются признаки интоксикации

- групповая масса тела мышей не снижается по сравнению с исходной массой.

В случае гибели в течение срока наблюдения хотя бы одной мыши или при снижении групповой массы тела животных, испытание повторяют на удвоенном количестве мышей. Если при повторном испытании ни одно из животных не погибает и их групповая масса не снижается по сравнению с исходной массой, испытываемый штамм бактерий считают нетоксигенным.