**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**Пробиотик бифидобактерии бифидум + ФС**

**лизоцим (комбинированный), лиофилизат**

**для приготовления суспензии**

**для приема внутрь Взамен ВФС 42-2631-95**

Настоящая фармакопейная статья распространяется на пробиотик бифидобактерии бифидум + лизоцим (комбинированный), лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь. Действующими веществами препарата являются биомасса лиофильно высушенных антагонистически активных бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* и лизоцим.

Одна доза лекарственного препарата содержит не менее 107 КОЕ бифидобактерий и (10 ± 1) мг лизоцима.

Препарат содержит вспомогательные вещества.

**Препарат предназначен для лечения и профилактики различных кишечных инфекций и дисбактериозов у детей всех возрастных групп и взрослых.**

ПРОИЗВОДСТВО

Производство лекарственного препарата пробиотика бифидобактерий бифидум + лизоцим (комбинированный), лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь, является биотехнологическим производством полного цикла и основано на культивировании производственного штамма *B. bifidum* на оптимальной питательной среде с последующим смешением культуральной жидкости с лизоцимом, криопротектором и лиофилизацией полученной смеси.

Основными этапами производства препарата являются: получение посевного материала, ферментация, смешение культуральной жидкости с лизоцимом и лиофильное высушивание полученной смеси с добавлением в качестве криопротектора сахарозо**-**желатино**-**молочной среды, упаковка и маркировка готового препарата.

Производственные штаммы. Для производства препарата используют штамм *B. bifidum* 1, депонированный в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (или другие штаммы бифидобактерий аналогичного назначения). Тест-штаммы, используемые для проведения испытания по показателю «Антагонистическая активность», должны быть депонированы в официальных коллекциях.

Контроль качества производственного пробиотического штамма и штаммов для контроля пробиотиков проводится не реже одного раза в год.

Штаммы, используемые в процессе производства, должны соответствовать требованиям ОФС «Бифидосодержащие пробиотики». Испытания проводят согласно ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков», ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» и ОФС «Микробиологическая чистота».

Препарат должен производиться в соответствии с требованиями правил организации производства и контроля качества биотехнологических лекарственных препаратов. Производственный процесс и показатели качества должны соответствовать требованиям, указанным в ОФС «Пробиотики», ОФС «Бифидосодержащие пробиотики» и ОФС «Лиофилизаты».

ИСПЫТАНИЯ

 **Описание.** Пористая или кристаллическая масса различных оттенков бежевого или беловато-серого цвета со специфическим запахом. Испытания проводят органолептическим методом.

**Подлинность.** Испытания проводят микроскопическим, бактериологическимметодами и определением активности лизоцима.

*Микроскопический метод.* В мазках, окрашенных по Граму, должны присутствовать грамположительные полиморфные палочки длиной от 4,0 до 5,0 мкм с бифуркацией на одном или двух концах, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений.

*Бактериологический метод.* На поверхности агаризованной среды МРС-5 в анаэробных условиях штамм образует круглые мелкие белые колонии. Отдельные колонии при росте в модифицированной печеночной среде Блаурокка имеют форму мелких «гвоздей» (в соответствии с разделом «Специфическая активность»).

*Определение активности лизоцима.* Испытуемый препарат должен лизировать клеточные стенки бактерий *M. Lysodeikticus* (в соответствии с разделом «Специфическая активность»).

Испытания проводят в соответствии с ОФС «Бифидосодержащие пробиотики» и ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков».

**Время диспергирования.** Не более 5 мин. При добавлении 0,9 % раствора натрия хлорида из расчета 1,0 мл на одну дозу препарата должна образоваться непрозрачная гомогенная суспензия бежевого или беловато-серого цвета. Испытание проводят визуальным методом.

**рН.** От 5,0 до 6,0. Для определения препарат разводят 0,9 % раствором натрия хлорида из расчета 1,0 мл на одну дозу. Определение проводят потенциометрическим методом в соответствии с ОФС «Ионометрия».

**Потеря в массе при высушивании**. Не более 3,5 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» (методика определения потери в массе при высушивании в иммунобиологических лекарственных препаратах).

 **Специфическая безвредность**. Должен быть безвреден. Определение проводят на белых мышах при пероральном введении каждому животному одной дозы препарата в соответствии с ОФС «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*» (раздел 1).

 **Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов.** Определение проводят в соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (категория 5.3. А табл.1, раздел 11).

**Специфическая активность.** Определяют количество живых бифидобактерий и лизоцима в одной дозе препарата (бактериологические методы) и активность кислотообразования (титриметрический метод).

*Бактериологический метод*. В одной дозе лекарственного препарата должно содержаться не менее 107 КОЕ бифидобактерий. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (раздел 1, метод предельных разведений с последующим высевом в полужидкую модифицированную печеночную среду Блаурокка).

*Титриметрический метод.* Показатель активности кислотообразования должен быть не ниже 90 оТ. Определение проводят методом кислотно-основного титрования с использованием полужидкой модифицированной печеночной среды Блаурокка в соответствии с ОФС «Определение специфической активности пробиотиков» (раздел 2).

*Определение активности лизоцима в одной дозе препарата.* В одной дозе лекарственного препарата должно содержаться не менее (10 ± 1) мг лизоцима. Определение количества лизоцима (активности лизоцима) проводят микробиологическим чашечным методом, основанным на способности лизоцима расщеплять β-(1-4)-гликозидные связи мукополисахаридного комплекса клеточной стенки тест-штамма *Micrococcus luteus (Micrococcus lysodeikticus).*

***Методика определения***

Подготовка к определению содержания лизоцима в одной дозе препарата влючает приготовление агаровой среды, содержащей в качестве субстрата инактивированную культуру *M. lysodeikticus* (клеточные стенки); разведений испытуемого препарата; контрольных растворов лизоцима (стандартного образца); водного раствора калия фталевокислого кислого (pH 6,2 ± 1,1).

1) Приготовление агаровой среды, содержащей в качестве субстрата клеточные стенки *M. lysodeikticus*

Агаровая среда для определения активности лизоцима включает: бакто-агар - (1,0 ± 0,01) г, субстрат/клеточные стенки *M. lysodeikticus*/ - (0,150 ± 0,005) г, раствор калия фталевокислого кислого 0,1 М/л (pH 6,2 ± 1,1) - до 100 мл.

*Примечание.* Субстрат(клеточные стенки *M. lysodeikticus*) в количестве (0,150 ± 0,005) г вносят в фарфоровую ступку, добавляют 7 - 10 капель раствора калия фталевокислого кислого (0,1 М/л) и оставляют для набухания на 20 - 30 мин. Затем растирают пестиком до однородного состояния и переносят образовавшуюся суспензию, смывая её со стенок ступки 10 мл раствора калия фталевокислого кислого (0,1 М/л), в колбу с агаровой основой, охлажденной до (39 ± 1) оС. Агаровую основу быстро смешивают с суспензией субстрата и разливают по 15 мл в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм, установленные на горизонтальной поверхности. После выдержки чашек Петри при (5 ± 3) оС в застывшем охлажденном агаре вырезают на равном расстоянии друг от друга и от края чашки 6 лунок диаметром 8 мм. По краю лунок пипеткой Пастера наносят агаровую основу, охлажденную до (39 ± 1) оС, и выдерживают при (5 ± 3) оС 20 – 30 мин.

Чашки Петри сприготовленной агаровой средой, содержащей субстрат, хранят при (5 ± 3) оС не более 3 - 4 сут.

2) Приготовление разведений испытуемого препарата

Для определения берут по 3 образца (3 флакона) из каждой серии препарата. Во флакон, содержащий 5 доз препарата, стерильно вносят раствор калия фталевокислого кислого (0,1 М/л; (27 ± 1) оС) из расчёта 1 мл на 1 дозу и выдерживают в течение 10 - 15 мин. Полученную суспензию используют для приготовления последовательных разведений препарата 1:10; 1:100 и 1:200 раствором калия фталевокислого кислого (0,1 М/л); из разведения 1:200 готовят последовательные двукратные разведения до 1:6400.

3) Приготовление контрольных растворов лизоцима

Навеску (10,0 ± 0,2) мг стандартного образца (СО) лизоцима вносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём до метки дистиллированной водой. Раствор СО с массовой концентрацией лизоцима 200 мкг/мл хранят при (5 ± 3) оС не более 6 месяцев.

Полученный водный раствор СО лизоцима (200 мкг/мл) в количестве 2 мл переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём до метки дистиллированной водой, получая рабочий водный раствор СО лизоцима (8 мкг/мл), который хранят при (5 ± 3) оС не более 1 месяца.

Контрольные растворы лизоцима (1, 2 и 4 мкг/мл) готовят непосредственно перед проведением исследования, разводя рабочий водный раствор СО лизоцима (8 мкг/мл) раствором калия фталевокислого кислого (0,1 М/л).

4) Определение количества лизоцима в одной дозе препарата

Для проведения испытания одной серии препарата используют 3 чашки Петри с агаровой средой для определения лизоцима из расчёта 1 чашка Петри на 1 образец (флакон) препарата. В 3 лунки каждой из 3 чашек Петри вносят по 2 капли (предназначенной для этого пипеткой на 1 мл) взвеси препарата в разведениях 1:1600, 1:3200, 1:6400. В остальные 3 лунки каждой из чашек Петри вносят по 2 капли (предназначенной для этого пипеткой на 1 мл) контрольных растворов лизоцима с концентрацией 1, 2, и 4 мкг/мл.

Чашки Петри выдерживают при (37 ± 1) оС строго в горизонтальном положении в течение 18 – 20 ч. По окончании инкубации замеряют диаметр зон лизиса, образованных разведениями испытуемого препарата и контрольными растворами лизоцима.

Расчёт содержания лизоцима проводят с использованием стандартной кривой в полулогарифмических координатах, отражающей зависимость диаметра зон лизиса (ось абсцисс, мм) от массовой концентрации лизоцима (ось ординат, мкг/мл).

Для построения стандартной кривой используют средние величины результатов трёх параллельных определений диаметров зон лизиса, образованных каждым из контрольных растворов лизоцима, если результаты измерения диаметра зон лизиса для каждой из указанных концентраций СО отличаются друг от друга не более, чем на 1,0 мм.

Концентрацию лизоцима в каждом из разведений испытуемого препарата находят по проекции на стандартную кривую средней величины диаметра зон лизиса, образованных соответствующим разведением препарата. Значение массовой концентрации лизоцима в одной дозе препарата получают путем определения средней величины концентрации лизоцима из суммы значений для трёх разведений препарата.

**Хранение.** При температуре от 2 до 8 °С в сухом защищенном от света месте (если нет иных указаний в нормативной документации) в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств», ОФС «Хранение лекарственных средств» и ОФС «Биологические лекарственные препараты».