

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Утверждено
Решением Ученого совета
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
«11» апреля 2023 года (протокол № 3)

Методические рекомендации
«Порядок отбора кандидатных производственных штаммов литически
активных бактериофагов и правила ведения коллекций производственных
штаммов бактериофагов»

Москва 2023 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Ответственный исполнитель:

Начальник Испытательного центра экспертизы
качества МИБП
доктор мед. наук, профессор

А.А. Мовсесянц

Исполнители:

Начальник лаборатории бактериофагов и препаратов
нормофлоры с коллекцией микроорганизмов
Испытательного центра экспертизы качества МИБП
канд. биол. наук

Д.С. Давыдов

Ведущий эксперт лаборатории бактериофагов и
препаратов нормофлоры с коллекцией
микроорганизмов Испытательного центра экспертизы
качества МИБП
канд. биол. наук

Р.Л. Парфенюк

Эксперт 1 категории лаборатории бактериофагов и
препаратов нормофлоры с коллекцией
микроорганизмов Испытательного центра экспертизы
качества МИБП

З.В. Дурманова

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	332
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ	333
ВВЕДЕНИЕ	334
ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ.....	335
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	336
1 Питательные среды	336
2 Условия культивирования	336
3 Методы, определения литической активности бактериофагов	336
4 Порядок отбора кандидатных штаммов бактериофагов	337
4.1 Способы выделения бактериофагов	337
4.2 Выделение	338
4.3 Адаптация бактериофагов	338
4.4 Получение маточных бактериофагов	338
4.5 Условия хранения фильтратов фаголизатов и маточных бактериофагов	339
5 Правила ведения коллекции штаммов бактериофагов	339
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	342
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	343

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

– Федеральный закон от 12 апреля 2010 г №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

– Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» от 28.01.2021.

– Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. Том 3. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств.

– Государственная Фармакопея РФ, ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги».

– Руководство по экспертизе лекарственных средств. т. III. – Москва, 2013.

ТЕРМИНЫ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- Бактериофаги – вирусы, вызывающие гибель соответствующих им видов бактерий за счет внутриклеточного размножения и разрушения бактериальной клетки, которое сопровождается выходом зрелых фаговых частиц, способных к заражению новых бактериальных клеток. Комплексы поликлональных вирулентных вирусов бактерий входят в состав лечебно-профилактических препаратов бактериофагов
- Производственные штаммы бактерий – бактерии, продуценты бактериофагов, которые выделяют от больных гнойно-септическими или кишечными инфекциями. Обладают типичными для каждого вида морфологическими, культуральными, биохимическими и серологическими свойствами, не содержат умеренных фагов.
- Маточные бактериофаги – Вирулентные фаги с широким диапазоном литического действия в отношении гомологичного вида бактерий. Обладают высокой литической активностью, стабильностью лизиса, специфической направленностью антимикробного действия. Используют для производства и изготовления препаратов бактериофагов.
- ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
- ОФС – Общая фармакопейная статья

ВВЕДЕНИЕ

Лечебно-профилактические бактериофаги – это лекарственные средства, содержащие комплексы поликлональных вирулентных вирусов бактерий, которые вызывают гибель соответствующих им видов бактерий за счет внутриклеточного размножения и разрушения бактериальной клетки, сопровождающегося выходом зрелых фаговых частиц, способных к заражению новых бактериальных клеток.

Лечебно-профилактические препараты бактериофагов официально зарегистрированы в Российской Федерации и внесены в Государственный реестр лекарственных средств. Благодаря многолетним исследованиям, проводимым с целью усиления литической активности бактериофагов в отношении широкого спектра антибиотикоустойчивых возбудителей инфекционных заболеваний и подбору оптимальных условий для производства лекарственных препаратов, были выработаны критерии отбора и условия культивирования как производственных штаммов бактерий, так и маточных бактериофагов. Основные требования включены в Государственную фармакопею Российской Федерации: в ОФС.1.7.1.0002.15 «Бактериофаги» и в фармацевтические статьи на отдельные препараты бактериофагов. Государственные нормативные документы содержат требования, предъявляемые к качеству лекарственных средств, описание валидированных методов контроля качества, а так же основные критерии, предъявляемые к организациям, осуществляющим производство лечебно-профилактических бактериофагов. Одним из важных условий производства является формирование коллекции производственных штаммов бактерий и бактериофагов.

Настоящие методические рекомендации устанавливают порядок отбора штаммов бактериофагов от момента их выделения из различных источников до включения в состав маточных бактериофагов, используемых при производстве препаратов бактериофагов. Представлена характеристика кандидатных штаммов бактериофагов и перечислены основные методы для определения их литической активности. Предназначены для экспертов и специалистов ФГБУ «НЦЭСМП», осуществляющих экспертизу и лабораторные исследования в рамках изучения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Микробиологические исследования бактерий и бактериофагов должны проводиться в отдельных друг от друга боксированных помещениях [1].

2. В лабораторных помещениях должны быть предусмотрены отдельные микробиологические боксы для работы с производственными бактериальными штаммами и маточными фагами.

3. Все процессы, оборудование, сырье, методы контроля должны быть валидированы. Сырье и исходные материалы должны иметь сертификаты качества.

4. Все работы с бактериофагами должны осуществляться в соответствии с действующими государственными санитарными правилами, с учетом требований системы обеспечения качества надлежащей лабораторной и производственной практики. Испытания проводят на производственных штаммах микроорганизмов III-IV группы патогенности. Для обеспечения безопасности проведения работ должны выполняться общие требования к условиям работы с использованием ПБА, установленные СанПиН 3.3686-21.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Питательные среды

Используют жидкие и плотные питательные среды на основе ферментативных гидролизатов мяса, казеина, крови или другие среды, содержащие питательные вещества, необходимые для биосинтеза клеточных компонентов и получения энергии в количествах, соответствующих специфическим потребностям данного микроорганизма.

Питательные среды не должны содержать антибиотиков или компонентов, вызывающих аллергию или другие нежелательные реакции у человека. Питательные среды должны быть стерильными и обладать хорошими ростовыми свойствами.

Питательные среды, рекомендованные ОФС.1.7.1.0002.15 «Бактериофаги», ГФ РФ [2]

- питательный бульон для культивирования микроорганизмов (МПБ) или аналогичный или бульон Хоттингера;
- мясопептонный агар (МПА) 1,5 % или агар Хоттингера 1,5 %;
- 0,7 % МПА или 0,7 % агар Хоттингера.

Возможно использование необходимых добавок в зависимости от специфических потребностей бактерий-мишеней.

2 Условия культивирования

Инкубируют при температуре 35-38 °С в течение 18-24 ч.

Время инкубации зависит от ростовых особенностей бактериальных штаммов гомологичных бактериофагам.

Длительность и температура инкубации, посевная доза бактериофага к общему объему питательной среды, микробная нагрузка штамма-продуцента на 1 мл среды устанавливается для каждой пары «фаг-бактерия» экспериментально.

3 Методы, определения литической активности бактериофагов

- Определение специфической активности бактериофагов и стабильности лизиса по методу Аппельмана (ГФ РФ, ОФС.1.7.1.0002.15 «Бактериофаги») [2].

- Определение фаговых частиц в 1 мл по методу Грация (на плотных питательных средах двухслойным методом). (ГФ РФ, ОФС.1.7.1.0002.15 «Бактериофаги») [2].

- Определения спектра литической активности при помощи капельных тестов (спот-тестов) [3].

4 Порядок отбора кандидатных штаммов бактериофагов

4.1 Способы выделения бактериофагов

4.1.1. При выделении фага из твердого субстрата образец должен быть предварительно ресуспендирован в фаговом буфере или питательной среде, соответствующей ростовым потребностям исследуемых бактерий. Крупные и твердые частицы удаляют низкоскоростным центрифугированием (1500 об/мин в течение 15-20 минут). Супернатант используют для выделения фага [4].

4.1.2. Исследуемый образец вносят во флакон с питательным бульоном, обогащенным взвесью бактерий требуемого вида. Образец инкубируют в соответствующих условиях. После инкубации клеточный дебрис осаждают низкоскоростным центрифугированием (3000-5000 g в течение 15-30 минут) .

Надосадочную жидкость испытывают на наличие бактериофага.

Перед проведением дальнейших испытаний исследуемый жидкий образец может быть очищен от бактериальных клеток с помощью фильтрации через мембранные фильтры с размером пор 0,6 мкм, 0,45 мкм [3].

Кроме того, бактерии могут быть убиты прогреванием при температуре 56-60 °С или обработкой хлороформом (5-10капель на 10 мл взвеси).

Полученный фильтрат используют на твердых и жидких питательных средах с гомологичными фагу бактериальными культурами.

Исследуемый фаголизат засевают в соответствующий питательный бульон, в который предварительно внесена бактериальная культура известного штамма. После инкубации в соответствующих условиях, отмечают наличие или отсутствие просветления бульона в сравнении с контрольным образцом, в котором присутствует только бактериальная культура. Просветление бульона может свидетельствовать о лизисе бактерий, то есть о наличии фагов. После обработки фаголизата хлороформом, осаждения клеточного дебриса низкоскоростным

центрифугированием определяют количество фаговых частиц в надосадочной жидкости. Определения проводят методом Грациа на индикаторных штаммах. На плотных питательных средах фаги образуют негативные колонии различной морфологии.

4.2 Выделение «чистой» линии фага

Данный этап является необходимым при работе с образцами.

Выделение проводят путем многократных последовательных пассажей морфологически однотипных колоний на гомологичных индикаторных штаммах.

Фаг или фильтрат засевают по методу агаровых слоев в таких разведениях, чтобы на чашках образовывались единичные колонии. Одну колонию укалывают платиновой иглой или пастеровской пипеткой и переносят её в питательный бульон (1 мл) или фаговый буфер. Затем производят посев с гомологичной культурой для появления новых фаговых колоний [5].

После получения «чистой» линии бактериофаги должны быть охарактеризованы. Фаголизаты «чистых» фаговых линий используют в качестве «пассажных» фагов для получения маточных.

4.3 Адаптация бактериофагов

Для повышения литической активности фагов проводят ряд пассажей на жидких и плотных питательных средах с использованием гомологичных видов бактерий. Пассируют на чувствительных штаммах, используя титрование по методу Аппельмана или по Грациа [2].

Подбирают штаммы бактериофагов, которые проявляют высокую активность к слаболизирующим и фагорезистентным штаммам бактерий.

При использовании метода Аппельмана каждый последующий пассаж проводят из последней прозрачной пробирки ряда Аппельмана, отбирая таким образом наиболее вирулентные бактериофаги с высокой урожайностью.

Наиболее активные фаговые расы в виде фильтратов фаголизатов (пассажные фаги) с высокой литической активностью используют для приготовления маточных бактериофагов [2].

4.4 Получение маточных бактериофагов

Для получения маточных бактериофагов используют пассажные бактериофаги и производственные штаммы бактерий гомологичного вида.

Маточные бактериофаги культивируют каждый в соответствии с родовой и видовой принадлежностью отдельно на собственных штаммах гомологичного рода и вида на подходящей питательной среде в соответствующих условиях. После окончания лизиса фаголизаты фильтруют через микрофильтрационные установки (последовательная фильтрация через мембраны с размером пор 0,6; 0,45; 0,22 мкм) [3].

Готовые маточные бактериофаги контролируют на специфическую активность - методом Аппельмана и содержание фаговых частиц в 1 мл – методом Грациа на посевных гомологичных штаммах,

Маточные бактериофаги должны обладать высокой литической активностью и широким диапазоном действия по отношению к штаммам гомологичного вида бактерий, стабильностью лизиса, специфической направленностью антимикробного действия и высокой урожайностью [2].

При возможности отбирают для работы маточные бактериофаги, способные длительно сдерживать вторичный рост культур.

Маточные бактериофаги должны лизировать производственные штаммы бактерий в титрах по методу Аппельмана не менее чем на 1 - 2 порядка выше показателей специфической активности конечного продукта.

Маточные фаги должны быть стерильными [2].

4.5 Условия хранения фильтратов фаголизатов и маточных бактериофагов

Фильтраты фаголизатов и маточные бактериофаги хранят в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С. Маточные бактериофаги сохраняют сроком до 1 года, фильтраты фаголизатов хранят длительно при сохранении активности. 1 раз в год фаги повторно размножают на гомологичных тест-штаммах [2].

Для консервации маточного бактериофага может использоваться хлороформ (не менее 1 % от объема).

Каждый фильтрат фаголизата маркируют. На этикетке указывают название, дату приготовления, использованный субстрат.

5 Правила ведения коллекции штаммов бактериофагов

Создание коллекции штаммов бактериофагов должно опираться на определенные критерии:

Каждый штамм бактериофага, перспективный для включения в коллекцию, должен быть тщательно изучен и охарактеризован по характеру взаимодействия с бактериальным хозяином (литический или лизогенный), по адсорбционным свойствам и урожайности на производственных штаммах, спектру литического действия, иммунологическим свойствам, морфологии негативных колоний, частоте генераций фагоустойчивых форм, результатам электронно-микроскопического изучения морфологии вирионов и по молекулярно-генетическому анализу структуры генетического материала (выделение ДНК, полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ) [1].

Дополнительно должна быть проведена оценки устойчивости бактериофагов к температурному фактору, рН среды, к хлороформу.

Штаммы бактериофагов должны соответствовать следующим требованиям [6]:

- должны быть строго вирулентными;
- должны обладать высокой специфической литической активностью, обуславливающей полный лизис бактериальных штаммов и стабильностью лизиса;
- должны обладать выраженной устойчивостью к внешним факторам среды (температурный фактор, рН среды);
- должны обладать широким диапазоном литического действия в отношении гомологичных штаммов и специфической направленностью антимикробного действия;
- должны иметь стабильно высокую концентрацию при культивировании на производственных штаммах (высокой адсорбционной способностью);
- должны быть стабильные при хранении, сохранять литическую активность после лиофильного высушивания.
- в геноме бактериофагов не должны содержаться детерминанты генов токсичности, лизогении, антибиотикоустойчивости, должна отсутствовать контаминация нитчатыми фагами и профагами.

Хранение коллекции бактериофагов осуществляется в жидком состоянии при температуре от 2 до 8 °С в течение 5 лет с ежегодным пересевом на бактериальных штаммах или в лиофилизированном состоянии [3].

Пополнение фаговых рас различными штаммами из природных источников позволяет преодолевать первичную фагоустойчивость возбудителей.

Постоянная адаптации бактериофагов к циркулирующим, а также резистентным штаммам возбудителей заболеваний является важным моментом в сохранении соответствия препаратов бактериофагов этиологической структуре возбудителей.

После завершения исследования всех вышеперечисленных характеристик на каждую фаговую линию оформляется паспорт.

Паспорт штамма бактериофага

Наименование бактериофага

1. Номер бактериофага с указанием названия коллекции
2. Видовое наименование и коллекционный номер бактериального штамма, используемого для размножения бактериофага, с указанием названия коллекции
3. Способ получения штамма бактериофага (найден в естественных условиях или получен селекционным путем, получен как мутант и т.п.)
4. Характеристика штамма бактериофага – (характер взаимодействия с бактериальными клетками, время максимальной адсорбции, длительность внутриклеточного размножения, величина выхода фага из одной инфицированной клетки, широта спектра антибактериальной активности)
5. Морфология негативных колоний штамма бактериофага
6. Условия для размножения штамма бактериофага (температура и время инкубирования, состав жидких и плотных питательных сред)
7. Условия для длительного хранения штамма бактериофага (температура и срок хранения, состав среды хранения)
8. Морфология бактериофаговых вирионов
9. Принадлежность штамма бактериофага к генетическому виду, роду и семейству.
10. Наличие генетических мутаций, детерминант генов токсичности, лизогении, антибиотикоустойчивости и т.д.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В Методических рекомендациях представлен поэтапный подход к ведению коллекции штаммов бактериофагов. Бактериофаги выделяют из различных источников, где обитают бактерии - сточных вод, почвы, клинического материала. С помощью совместного культивирования с гомологичными бактериями на питательных средах в соответствующих условиях, применяя методы центрифугирования и фильтрации из образцов можно выделить «чистые» фаговые линии, которые в дальнейшем могут быть использоваться при получении маточных бактериофагов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза: в 5 т. Т.3. Разработка и проведение исследований биологических лекарственных средств. – Москва: Ремедиум, 2017. – 360 с. – Текст непосредственный.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание: в 4 т. Т. 2: ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги». – Москва, 2018. – Режим доступа: Федеральная электронная медицинская библиотека. – Текст: электронный.
3. Бактериофаги: биология и практическое применение/ под ред. Элизабет Каттер и Александра Сулаквелидзе. – Москва: Научный мир, 2012.– 636 с. – Текст: непосредственный.
4. Практическое пособие по бактериофагии: По общей редакцией И.М. Габриловича. – Минск: Издательство «Вышэйшая школа», 1968, – 178 с. – Текст: непосредственный
5. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия: монография/ Д.М. Гольдфарб. – Москва: Государственное издательство медицинской литературы МЕДГИЗ, 1961. – 298 с. – Текст: непосредственный.
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств: в 4 т. Т.3. глава 4/ составители: О.С. Дарбеева, К.А. Мирошников, Л.М. Майская, А.Н. Миронов, Ю.И. Обухов, Д.С. Давыдов, З.В. Дурманова. – Москва: ООО «ПОЛИГРАФ-ПЛЮС», 2013. – 343 с. – Текст непосредственный.