



Валидационные исследования методики спирального посева для определения «Специфической активности» лактосодержащих пробиотических препаратов

А.А. Воропаев , О.В. Фадейкина, В.Ф. Евлашкина, Т.Д. Боханова, Д.С. Давыдов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Воропаев Андрей Андреевич; voropaev@expmed.ru

Резюме

Актуальность. Определение количества жизнеспособных клеток является важным микробиологическим исследованием при оценке качества лекарственных препаратов, содержащих живые микроорганизмы. Для оптимизации трудовых и материальных затрат, повышения точности и воспроизводимости испытаний целесообразно применение частично автоматизированных инструментальных методов, к которым относится метод спирального посева.

Цель. Проведение валидационных исследований методики спирального посева при испытании по показателю «Специфическая активность» биологических лекарственных препаратов, содержащих живые бактериальные клетки, на примере лактосодержащего пробиотического лекарственного препарата.

Материалы и методы. В исследовании использовали культуру *Lactiplantibacillus plantarum*, выделенную из образца пробиотического лекарственного препарата. Спиральный посев на агаризованные питательные бактериологические среды осуществляли с помощью автоматической системы нанесения пробы Eddy Jet 2 с последующим автоматическим учетом результатов с применением счетчика колоний IUL Flash & Go. Валидационные исследования проводили согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ОФС.1.1.0021.18).

Результаты. Определены основные валидационные характеристики методики спирального посева: рабочий диапазон от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл, предел количественного определения – 10^2 КОЕ/мл, коэффициент линейной детерминации R^2 – 0,99. Правильность методики спирального посева при определении специфической активности составила 93% с повторяемостью 4,9%.

Выводы. Методика спирального посева с применением автоматического счетчика колоний может использоваться при оценке качества лактосодержащих пробиотических лекарственных препаратов по показателю «Специфическая активность», поскольку результаты валидационных исследований подтверждают аналогичность анализируемых характеристик методу Коха, который применяется в настоящее время в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации. Использование методики спирального посева способствует оптимизации затрат и повышению точности результатов испытаний.

Ключевые слова: метод спирального посева; валидационные исследования; оценка качества биологических лекарственных препаратов; специфическая активность; пробиотики; лактосодержащий пробиотик

Для цитирования: Воробаев А.А., Фадеекина О.В., Евлашкина В.Ф., Боханова Т.Д., Давыдов Д.С. Валидационные исследования методики спирального посева для определения «Специфической активности» лактосодержащих пробиотических препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(4):584–593. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-584-593>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Validation studies of the spiral plating method to determine the potency of lactobacillus-containing probiotics

Andrey A. Voropaev✉, Olga V. Fadeikina, Vera F. Evlashkina, Tatiana D. Bohanova, Dmitry S. Davydov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Andrey A. Voropaev; voropaev@expmed.ru

Abstract

Scientific relevance. Viable cell counting is an important microbiological test for the quality assessment of medicinal products containing live microorganisms. To optimise labour and material costs and enhance testing precision and reproducibility, it is practical to use partially automated instrumental methods, such as the spiral plating method.

Aim. The aim was to conduct a validation study of the spiral plating method for assessing the potency of biologicals containing live bacterial cells, using a lactobacillus-containing probiotic medicinal product as a case study.

Materials and methods. This study used a culture of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from a probiotic medicinal product. Spiral plating on agar-based biological culture media was performed using an automatic Eddy Jet 2 plating system. The study used an IUL Flash & Go colony counter for automatic reporting of the results. The validation study was conducted according to the general chapter on the validation of microbiological testing methods (OFS.1.1.0021.18) of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Results. According to the validation results for the main parameters, the spiral plating method had the range of 10^4 – 10^5 CFU/mL; the limit of quantification of 10^2 CFU/mL; and the coefficient of linear determination, R^2 , of 0.99. The accuracy of the spiral plating method in determining the potency of the test sample was 93%; the repeatability was 4.9%.

Conclusions. The study results confirm the similarity of the spiral plating method with an automatic colony counter to Koch's plating method, which is currently used in accordance with the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, in terms of the validated parameters. Therefore, spiral plating can be used to evaluate the potency of lactobacillus-containing probiotics. Spiral plating can help improve the cost-effectiveness and accuracy of testing.

Keywords: spiral plating method; validation studies; quality assessment of biologicals; potency; probiotics; lactobacillus-containing probiotic

For citation: Voropaev A.A., Fadeikina O.V., Evlashkina V.F., Bohanova T.D., Davydov D.S. Validation studies of the spiral plating method to determine the potency of lactobacillus-containing probiotics. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):584–593. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-584-593>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D reporting No. 121022000147-4).

Disclosure. The authors declare having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Лактосодержащие пробиотики представляют собой биомассу живых бактерий, относящихся к различным видам семейства *Lactobacillaceae*, в том числе *Lactiplantibacillus plantarum* (ранее – *Lactobacillus plantarum*) [1], *Limosilactobacillus fermentum* (ранее – *Lactobacillus fermentum*), *Lactobacillus acidophilus* и других видов¹. Распространены препараты, представляющие собой лиофилизаты для приготовления суспензии для приема внутрь, то есть биомассу, лиофильно высушенную в защитных средах (сахарозо-желатиновой, сахарозо-желатино-молочной или иной); в одной дозе лиофилизата содержится не менее 2×10^9 КОЕ лактобактерий² [2]. Важнейшим показателем качества препарата является специфическая активность, определяемая по количеству живых лактобактерий в препарате. Классической методикой определения специфической активности пробиотиков согласно Государственной фармакопее Российской Федерации (ГФ РФ) ОФС.1.7.2.0009.15³ является метод Коха. Согласно описанию метода суспензию испытуемого образца разводят (в соотношении 1,0 мл образца и 9,0 мл разводящей жидкости), готовят последовательные десятикратные разведения и высевают по 0,1 мл микробной суспензии на чашки Петри с питательной бактериологической средой. Учет результатов осуществляется оператором вручную путем подсчета количества колониобразующих единиц (КОЕ) на поверхности среды.

Описанная методика является трудно стандартизуемой и характеризуется высокими показателями неопределенности. В соответствии с распределением Пуассона для бактерий в суспензии⁴ предельная точность, то есть границы 95% доверительного интервала для значений показателя КОЕ, могут достигать $\pm 50\%$ [3, 4]. Следует отметить, что для проведения испытаний согласно данной методике и получения стабильных и воспроизводимых результатов необходимы высокие трудозатраты, в том числе высокая квалификация исполнителей. В связи с этим для оптимизации трудовых и материальных затрат, повышения точности и воспроизводимости результатов испытаний представляется целесообразным проведение оценки

возможности использования метода спирального посева при определении количества жизнеспособных клеток. Применение данного метода позволяет сократить количество трудоемких манипуляций и уменьшить количество расходных материалов. Суть метода заключается в распределении суспензии бактериальных клеток с помощью автоматического устройства по поверхности агаризованных питательных сред, находящихся во вращаемых чашках Петри, по траектории архимедовой спирали от центра к периферии чашки в экспоненциально уменьшающемся объеме. Данный метод был разработан для уменьшения используемого числа чашек Петри при проведении микробиологического контроля пищевой молочной продукции [5]. Однако в последние годы указанный метод используется для оценки количества живых бактерий, в том числе в коллекциях микроорганизмов. Метод одобрен Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA), Международной организацией по стандартизации ИСО (International Organisation for Standardisation, ISO), Государственной агрохимической ассоциацией (Association of Official Agricultural Chemists, AOAC) [6, 7]. В то же время необходимо отметить, что до настоящего времени данный метод не включен в ГФ РФ и фармакопее других стран.

Цель работы – проведение валидационных исследований методики спирального посева при испытании по показателю «Специфическая активность» биологических лекарственных препаратов, содержащих живые бактериальные клетки, на примере лактосодержащего пробиотического лекарственного препарата. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: определить валидационные характеристики методики спирального посева (специфичность, рабочий диапазон, предел количественного определения, линейность, повторяемость, правильность); оценить сопоставимость результатов испытаний с использованием двух схем разведения образца; провести сравнительное исследование показателя «Специфическая активность» методом спирального посева и референс-методом на примере лактосодержащего препарата.

¹ ОФС.1.7.1.0006.15 Лактосодержащие пробиотики. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

² ФС.3.3.1.0060.18 Пробиотик лактобактерий монокомпонентный, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

³ ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁴ ГОСТ ISO 11133-2016. Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред.

Материалы и методы

Материалы:

- лекарственный препарат лактобактерий «Лактобактерин» в виде лиофилизата для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения (АО «НПО Микроген», Россия)⁵;
- питательная среда MRS агар (bioMerieux, Франция), серия 2420923103;
- фармакопейный стандартный образец (ФСО) мутности бактериальных взвесей 10 МЕ, ФСО 3.1.00085 (ОСО 42-28-85) производства ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, серия S-2/10-010623 (далее – ФСО мутности).

Оборудование:

- устройство для автоматического нанесения пробы Eddy Jet 2 (Neutec Group, США);
- счетчик колоний автоматический IUL Flash & Go (Neutec Group, США).

Методы

Бактериальную культуру штамма *Lactiplantibacillus (Lactobacillus) plantarum* 8P-A3 выделяли из исследуемого лекарственного препарата лактобактерий.

Подготовку и восстановление бактериальной культуры проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.15⁶.

В качестве референс-метода использовали метод серийных разведений с последующим высевом на плотные среды (метод Коха) согласно ОФС.1.7.2.0009.15⁷.

Приготовление суспензии бактериальных клеток проводили визуальным методом с использованием ФСО мутности 10 МЕ согласно ОФС.1.7.2.0008.15⁸.

Культивирование лактобактерий проводили при температуре 37 °С в течение 48 ч в аэробных условиях. В случае референс-метода оценку количества колоний на поверхности питательной среды проводили визуально с последующим расчетом исходной концентрации микроорганизмов. В случае метода спирального посева использовали режим посева, при котором вносится уменьшающееся количество образца по мере движения от центра к краю чашки, что эквива-

лентно нескольким десятикратным разведениям (далее – логарифмический спиральный посев). Подсчет колоний проводили в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения счетчика колоний Flash & Go.

В соответствии с ОФС.1.1.0021.18⁹ были приняты следующие значения критериев приемлемости изучаемых валидационных параметров:

- правильность (accuracy) – процент восстановления должен составлять не менее 70% от истинного значения (полученного референс-методом);
- повторяемость (repeatability) методики, рассчитанная по параллельным определениям, – коэффициент вариации должен составлять не более 35%;
- специфичность (specificity) – должен определяться искомым микроорганизм *L. plantarum*;
- предел количественного определения (limit of quantification) – минимальная концентрация микроорганизмов, которая может быть определена с приемлемым уровнем правильности и повторяемости;
- рабочий диапазон (range) – требуемый уровень правильности должен обеспечиваться внутри рабочего диапазона;
- линейность (linearity) – коэффициент линейной детерминации R^2 должен быть не ниже 0,90.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007. Рассчитывали следующие показатели описательной статистики: среднееарифметическое значение (X_{cp}), стандартное отклонение (S), относительное стандартное отклонение (RSD). Статистическую значимость различий значений двух групп данных определяли с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Определение специфичности, рабочего диапазона и предела количественного определения методики спирального посева

Определение характеристик методики проводили в одном эксперименте, используя выделенную из препарата бактериальную культуру *L. plantarum*. Из суспензии двухсуточной культуры второго пассажа с концентрацией микробных клеток, соответствующей ФСО мутности

⁵ Государственный реестр лекарственных средств. https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=61b5f1cb-06b1-44bf-ba2e-4139553ad235

⁶ ОФС.1.2.4.0002.15 Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁷ ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁸ ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

⁹ ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 1. Результаты определения рабочего диапазона и предела количественного определения методики спирального посева при исследовании лактосодержащего пробиотического препарата

Table 1. Results of determining the range and the limit of quantification for the spiral plating method, obtained when testing a lactobacillus-containing probiotic product

Разведение исходной суспензии <i>L. plantarum</i> (КОЕ/мл) <i>Dilution of the stock suspension of L. plantarum (CFU/mL)</i>	Концентрация <i>L. plantarum</i> в исходной суспензии согласно методике спирального посева, КОЕ/мл <i>L. plantarum concentration in the stock suspension according to the spiral plating method, CFU/mL</i>	RSD, %	Правильность методики (в сравнении с результатами, полученными референс-методом), % <i>Accuracy of the spiral plating method (in comparison with the reference method results), %</i>
10^{-3} (3×10^6)	$1,22 \times 10^8$	5,0	40,1
10^{-4} (3×10^5)	$2,24 \times 10^8$	5,8	73,8
10^{-5} (3×10^4)	$3,10 \times 10^8$	7,1	102,0
10^{-6} (3×10^3)	$2,05 \times 10^8$	12,6	67,5
10^{-7} (3×10^2)	$1,85 \times 10^8$	46,4	60,8
10^{-8} (3×10^1)	$2,00 \times 10^8$	223,6	65,8

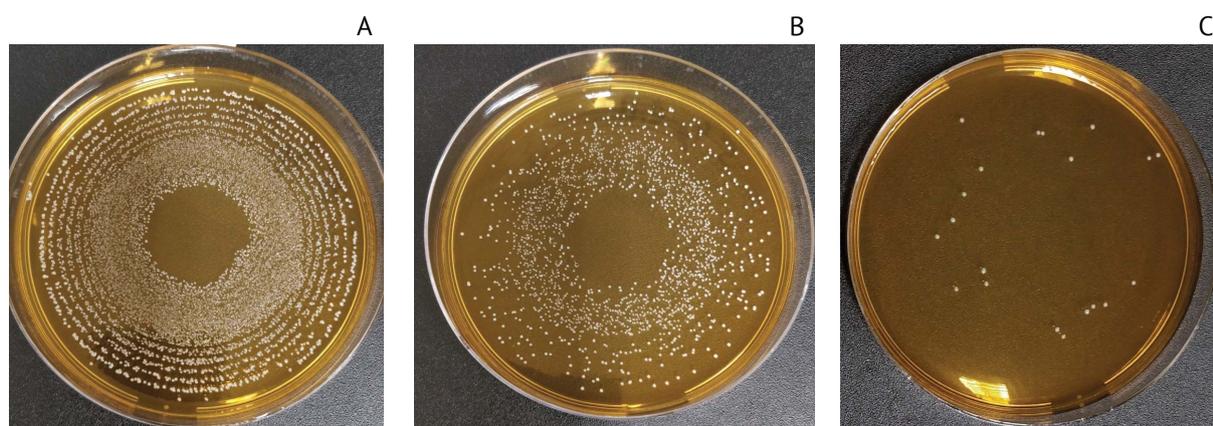
Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. КОЭ – колониобразующие единицы; RSD – относительное стандартное отклонение.
Note. CFU, colony-forming units; RSD, relative standard deviation.

10 МЕ, готовили ряд последовательных десятикратных разведений. С использованием метода спирального посева проводили посев бактериальной суспензии из диапазона разведений 10^{-3} – 10^{-8} , а референс-методом – из разведений 10^{-6} и 10^{-7} . Для учета результатов спирального посева использовали автоматический счетчик колоний Flash & Go; в настройках программного обеспечения указывали соответствующее разведение препарата.

Результаты проведенных исследований представлены в *таблице 1*. Специфичность методики была подтверждена наличием характерных для вида *L. plantarum* колоний на поверхности

агаризованной среды. Нижний предел количественного определения составил менее 100 КОЕ/мл. Образование колоний и подсчет концентрации возможны вплоть до единичных колоний, однако точность такого определения является очень низкой (относительное стандартное отклонение более 40%), а правильность (менее 70%) не соответствует установленному критерию. Таким образом, наиболее оптимальным представляется использование рабочего диапазона от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл. При большей концентрации микроорганизмов на поверхности среды наблюдается сплошной рост, а при меньшей концентрации – единичные колонии (*рис. 1*).



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Количество колоний на чашке с питательной средой при логарифмическом спиральном посеве 0,1 мл суспензии бактериальных клеток *L. plantarum* с концентрацией: А – 3×10^6 КОЕ/мл (разведение 10^{-3}); В – 3×10^5 КОЕ/мл (разведение 10^{-4}); С – 3×10^3 КОЕ/мл (разведение 10^{-6}).

Fig. 1. Number of colonies on plates with a nutrient medium upon logarithmic spiral plating of 0.1 mL of the *L. plantarum* bacterial cell suspension at the following concentrations: A, 3×10^6 CFU/mL (10^{-3} dilution); B, 3×10^5 CFU/mL (10^{-4} dilution); C, 3×10^3 CFU/mL (10^{-6} dilution).

Таблица 2. Результаты определения линейности методики спирального посева

Table 2. Results of linearity determination for the spiral plating method

Разведение исходного образца <i>Stock sample dilution</i>	Фактическое содержание <i>L. plantarum</i> согласно методике спирального посева, КОЕ/мл <i>L. plantarum count determined by the spiral plating method, CFU/mL</i>	RSD, %	Правильность методики (в сравнении с результатами, полученными референс-методом), % <i>Accuracy of the spiral plating method (in comparison with the reference method results), %</i>
1/2	12900	3,6	91,1
1/4	8550	8,2	121,1
1/8	4440	9,8	125,7
1/16	1500	14,7	85,2
1/32	764	18,3	86,5
1/64	406	15,9	92,1
1/128	207	23,1	93,9

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. КОЭ – колониеобразующие единицы; RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. CFU, colony-forming units; RSD, relative standard deviation.

Определение линейности методики спирального посева

Оценку линейности методики спирального посева определяли в пределах рабочего диапазона, проводя двукратные серийные разведения бактериальной суспензии *L. plantarum*, содержащей 3×10^4 КОЕ/мл. Подготовка и оценка образца референс-методом проводилась, как описано в предыдущем эксперименте. Результаты определения линейности методики спирального посева представлены в таблице 2.

В соответствии с полученными данными строили график зависимости десятичных логарифмов фактического содержания бактериальных клеток по методике спирального посева от теоретического содержания по референс-методу (рис. 2). Коэффициент линейной детерминации R^2 составил 0,99.

рифмов фактического содержания бактериальных клеток по методике спирального посева от теоретического содержания по референс-методу (рис. 2). Коэффициент линейной детерминации R^2 составил 0,99.

Сравнение двух схем серийных разведений образца с использованием разных объемов разводящей жидкости

Согласно ОФС.1.7.2.0009.15¹⁰ проведение серийных разведений испытуемого образца выполняют с использованием пипеток или автоматических дозаторов, перенося

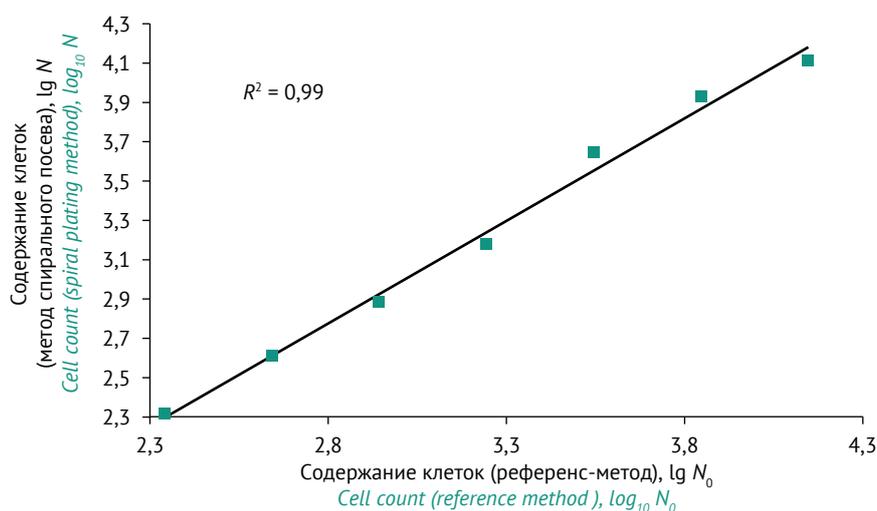


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Зависимость значений содержания клеток *L. plantarum*, полученных методом спирального посева (N), от значений, полученных референс-методом (N_0), при определении линейности методики спирального посева.

Fig. 2. Relationships between the results of *L. plantarum* cell counting by the spiral plating method (N) and by the reference method (N_0), obtained when determining the linearity of the spiral plating method.

¹⁰ ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018.

1,0 мл бактериальной суспензии в 9,0 мл 0,9% раствора натрия хлорида. При реализации методики спирального посева возможен высеив из разведения малого объема (0,9 мл). Сравнение сопоставимости результатов посева с использованием двух схем разведений проводили, используя большие и малые объемы проб: 1,0 мл + 9,0 мл, посев референс-методом (далее – большой объем) и 0,1 мл + 0,9 мл, методом спирального посева (далее – малый объем).

Испытания проводили два оператора в течение трех дней с использованием шести флаконов одной серии лактосодержащего пробиотического препарата. Подготовленную суспензию препарата разводили десятикратно в большом и малом объеме разводящей жидкости. После разведений проводили посев на плотные питательные среды референс-методом и методом спирального посева. По окончании культивирования рассчитывали концентрацию микроорганизмов в исходном препарате. Результаты представлены в *таблице 3*.

Результаты испытаний, полученные при использовании двух схем разведений суспензии бактериальных клеток *L. plantarum*, показали отсутствие статистически значимых различий: значение *t*-критерия Стьюдента, рассчитанного по экспериментальным данным $t_{\text{экс}}$, составило 0,79, что меньше критического табличного значения $t_{\text{табл}}=2,2881$ ($df=10$; $\alpha=0,05$) при достигнутом уровне значимости $p=0,44$. Следовательно, для снижения трудозатрат

и материальных затрат предпочтительнее использовать схему разведения 0,1 мл + 0,9 мл в микропробирках.

Методика оценки лактосодержащих пробиотических лекарственных препаратов по показателю «Специфическая активность» методом спирального посева

Методика оценки специфической активности лактосодержащих пробиотических препаратов включает три этапа.

1. Подготовка десятикратных серийных разведений исходного образца препарата (до разведения 10^{-4}) в микропробирках с объемом среды разведения 0,9 мл.
2. Проведение посева на одну чашку Петри из разведения 10^{-4} логарифмическим спиральным посевом.
3. Проведение учета результатов с использованием автоматического счетчика колоний.

Графически методика спирального посева в сравнении с референс-методикой представлена на *рисунке 3*.

Оценка повторяемости и правильности методики спирального посева при определении специфической активности лактосодержащего пробиотического препарата

Для оценки повторяемости и правильности методики спирального посева использовали коммерческий препарат «Лактобактерин». Испытания проводили два оператора в течение трех дней. Каждый оператор за один день

Таблица 3. Результаты определения концентрации микроорганизмов в лактосодержащем пробиотическом препарате при использовании разных схем серийных разведений

Table 3. Results of determining the concentration of microorganisms in a lactobacillus-containing probiotic, obtained using different serial dilution schemes

Определяемая характеристика <i>Parameter of interest</i>	Концентрация микроорганизмов <i>L. plantarum</i> (КОЕ/мл) при схеме серийных разведений <i>Concentration of L. plantarum microorganisms (CFU/mL) in serial dilutions</i>	
	в объеме 9,0 мл <i>in a volume of 9.0 mL</i>	в объеме 0,9 мл <i>in a volume of 0.9 mL</i>
Экспериментальные значения (число проб $n=6$) <i>Experimental values (number of samples, n=6)</i>	2,25×10 ⁹	2,66×10 ⁹
	2,40×10 ⁹	2,36×10 ⁹
	2,30×10 ⁹	2,11×10 ⁹
	2,59×10 ⁹	1,94×10 ⁹
	2,74×10 ⁹	2,55×10 ⁹
	2,25×10 ⁹	2,24×10 ⁹
Среднее значение <i>Mean value</i>	2,42×10 ⁹	2,31×10 ⁹
RSD, %	8,4	10,1

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. КОЭ – колониобразующие единицы; RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. CFU, colony-forming units; RSD, relative standard deviation.

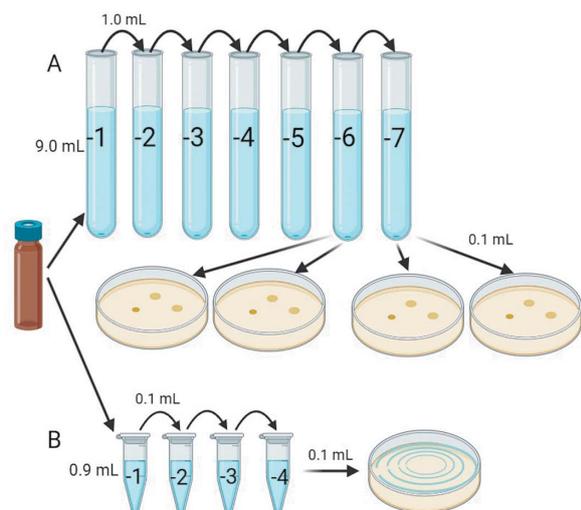


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Схематическое изображение методики спирального посева (B) в сравнении с референс-методом (A).

Fig. 3. Schematic representation of the spiral plating method (B) compared with the reference method (A).

проводил два повторных испытания каждым методом. Результаты испытаний представлены в *таблице 4*.

Результаты валидационных исследований, полученные при оценке специфической активности лактосодержащего пробиотического препарата с помощью методики спирального посева, соответствуют требованиям ОФС.1.1.0021.18¹¹. Сравнение выборок с использованием *t*-критерия Стьюдента показало, что статистически значимых различий между результатами, полученными двумя методами, выявлено не было: значение *t*-критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным $t_{\text{экс}}=1,19$, меньше критического табличного значения $t_{\text{табл}}=2,2281$ ($df=10$; $\alpha=0,05$) при достигнутом уровне значимости $p=0,27$.

При использовании метода спирального посева определено меньшее значение относительного стандартного отклонения (*RSD*) в сравнении с референс-методом – 4,9 и 7,6% соответственно. Использование метода спирального посева способствует оптимизации

Таблица 4. Результаты определения правильности и повторяемости при оценке специфической активности лактосодержащего пробиотического препарата с помощью методики спирального посева

Table 4. Results of determining the accuracy and repeatability of the spiral plating method obtained when evaluating the potency of a lactobacillus-containing probiotic product

Показатель <i>Parameter</i>	Специфическая активность препарата, КОЕ/мл <i>Probiotic product potency, CFU/mL</i>	
	Референс-метод <i>Reference method</i>	Методика спирального посева <i>Spiral plating method</i>
Экспериментальные значения (число проб $n=6$) <i>Experimental values (number of samples, n=6)</i>	$2,28 \times 10^9$	$2,10 \times 10^9$
	$2,29 \times 10^9$	$2,32 \times 10^9$
	$1,96 \times 10^9$	$2,17 \times 10^9$
	$2,47 \times 10^9$	$2,02 \times 10^9$
	$2,14 \times 10^9$	$2,07 \times 10^9$
	$2,24 \times 10^9$	$2,12 \times 10^9$
Рассчитанное значение показателя специфической активности, КОЕ/мл <i>Calculated potency, CFU/mL</i>	$2,23 \times 10^9$	$2,13 \times 10^9$
Значение показателя специфической активности согласно данным производителя, КОЕ/мл <i>Potency according to the manufacturer's data, CFU/mL</i>	$2,30 \times 10^9$	
Повторяемость (<i>RSD</i>), % <i>Repeatability (RSD), %</i>	7,6	4,9
Правильность (в сравнении с данными производителя), % <i>Accuracy (in comparison with the manufacturer's data), %</i>	97	93

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. КОЭ – колониеобразующие единицы; *RSD* – относительное стандартное отклонение.

Note. CFU, colony-forming units; *RSD*, relative standard deviation.

¹¹ ОФС.1.1.0021.18 Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

затрат и повышению точности выполняемого анализа [8], так как количество операций по серийному разведению меньше, чем при постановке чашечного метода.

Выводы

1. Установлены валидационные характеристики методики спирального посева для определения показателя «Специфическая активность» биологических лекарственных препаратов на примере лактосодержащего пробиотика: рабочий диапазон от 10^4 до 10^5 КОЕ/мл, предел количественного определения – 10^2 КОЕ/мл, коэффициент линейной детерминации R^2 – 0,99, повторяемость в пределах 5%.
2. Метод спирального посева с автоматическим подсчетом колоний может рассматриваться как альтернативный стандартному методу Коха, который применяется в настоящее

время в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации и включен в нормативную документацию на зарегистрированные в России лекарственные лактосодержащие пробиотические препараты.

3. Предложена методика оценки показателя «Специфическая активность» лактосодержащих пробиотических препаратов, включающая следующие этапы:
 - подготовка десятикратных серийных разведений исходного образца препарата (до разведения 10^{-4}) в микропробирках с объемом среды разведения 0,9 мл;
 - проведение посева на одну чашку Петри из разведения 10^{-4} логарифмическим спиральным посевом;
 - проведение учета результатов с использованием автоматического счетчика колоний.

Литература/References

1. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70(4):2782–858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
2. Nordström EA, Teixeira C, Montelius C, Jeppsson B, Larsson N. *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (LP299V®): three decades of research. *Benef Microbes*. 2021;12(5):441–65. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0191>
3. Dias FRS, Lourenço FR. Measurement uncertainty evaluation and risk of false conformity assessment for microbial enumeration tests. *J Microbiol Methods*. 2021;189:106312. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106312>
4. Буйлова ИА, Гунар ОВ. Практические аспекты применения валидационных параметров на примере методик определения количественного содержания микроорганизмов в лекарственных препаратах. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(4):267–72. Buylova IA, Gunar OV. Validation parameters as applied to methods for quantification of microorga-

nisms in medicinal products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(4):267–72 (In Russ.).

5. Donnelly CB, Gilchrist JE, Peeler JT, Campbell JE. Spiral plate count method for the examination of raw and pasteurized milk. *Appl Environ Microbiol*. 1976;32(1):21–7. <https://doi.org/10.1128/aem.32.1.21-27.1976>
6. Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*. 2000;41(3):251–5. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2282>
7. Соколов ДМ, Соколов МС. Автоматизация микробиологических исследований при оценке безопасности пищевых продуктов и сырья. *Молочная промышленность*. 2014;(2):70–3. Sokolov DM, Sokolov MS. Automation of microbiological testing of foods and raw materials safety. *Dairy Industry*. 2014;(2):70–3 (In Russ.). EDN: [RVAMEP](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023)
8. Ben-David A, Davidson CE. Estimation method for serial dilution experiments. *J Microbiol Methods*. 2014;107:214–21. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Воропаев** – формирование цели и задач исследований, выполнение экспериментальных исследований, анализ и интерпретация результатов исследований, написание текста рукописи; **О.В. Фадейкина** – обобщение экспериментальных данных, анализ, статистическая обработка и интерпретация результатов исследований, написание текста рукописи; **В.Ф. Евлашкина** – проведение экспериментальных исследований;

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Voropaev** formulated the study aim and objectives, conducted experiments, analysed and interpreted the study results, and drafted the manuscript. **O.V. Fadeikina** summarised the experimental data; analysed, processed, and interpreted the study results; and drafted the manuscript. **V.F. Evlaskhina** conducted experiments and provided consulting assistance with the analysis of study results. **T.D. Bohanova** conducted experiments.

консультативная помощь при анализе результатов; **Т.Д. Боханова** – проведение экспериментальных исследований; **Д.С. Давыдов** – консультативная помощь при анализе результатов, написание текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

D.S. Davydov provided consulting assistance with the analysis of study results, drafted the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Воропаев Андрей Андреевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Фадеекина Ольга Васильевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
fadeikina@expmed.ru

Евлашкина Вера Францевна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6106-6674>
evlaskina@expmed.ru

Боханова Татьяна Дмитриевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5704-5523>
bohanova@expmed.ru

Давыдов Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
Davydov@expmed.ru

Andrey A. Voropaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5786-9159>
voropaev@expmed.ru

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>
fadeikina@expmed.ru

Vera F. Evlaskina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6106-6674>
evlaskina@expmed.ru

Tatiana D. Bohanova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5704-5523>
bohanova@expmed.ru

Dmitry S. Davydov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1768-1362>
Davydov@expmed.ru

Поступила 08.08.2023

После доработки 08.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Received 8 August 2023

Revised 8 November 2023

Accepted 24 November 2023