

## Практические аспекты применения валидационных параметров на примере методик определения количественного содержания микроорганизмов в лекарственных препаратах

И. А. Буйлова, О. В. Гунар\*

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

**Резюме.** Валидация/верификация микробиологических методик необходима при контроле качества нестерильных лекарственных средств, однако использование известных процедур валидации/верификации аналитических методик затруднительно, поскольку микробиологическая погрешность определяется такими факторами, как распределение микроорганизмов в образце, клеточная морфология и метаболическая активность микроорганизмов. **Цель работы:** оценка возможности применения параметров, используемых для валидации микробиологических методик, при валидации/верификации чашечного агарового метода. **Материалы и методы:** нестерильные лекарственные средства 18 наименований. Предварительно исследовали антимикробное действие нестерильных лекарственных средств, для количественного определения жизнеспособных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов применяли глубокий модифицированный метод. Статистическую обработку результатов проводили при помощи компьютерных программ Microsoft Excel 7.0 и Statistica 8.0. **Результаты:** представлены результаты количественного определения тест-штаммов микроорганизмов, инокулированных в нестерильные лекарственные средства, полученные в рамках валидации/верификации чашечного агарового метода Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. **Выводы:** при валидации/верификации методики количественного выделения микроорганизмов не было выявлено отклонений результатов исследований от установленных критериев приемлемости. Это доказывает возможность применения валидационных параметров «правильность», «прецизионность», «устойчивость», «предел количественного обнаружения» при валидации новых методик количественного определения микроорганизмов или верификации ранее валидированных.

**Ключевые слова:** нестерильные лекарственные средства; валидация микробиологических методик; валидационные параметры; количественное определение; микроорганизмы; дрожжевые грибы; плесневые грибы; верификация микробиологических методик

**Для цитирования:** Буйлова ИА, Гунар ОВ. Практические аспекты применения валидационных параметров на примере методик определения количественного содержания микроорганизмов в лекарственных препаратах. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(4):267–272. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-4-267-272>

\* **Контактное лицо:** Буйлова Ирина Александровна; [Buylova@expmed.ru](mailto:Buylova@expmed.ru)

## Validation Parameters as Applied to Methods for Quantification of Microorganisms in Medicinal Products

I. A. Buylova, O. V. Gunar\*

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

**Abstract.** Validation/verification of microbiological methods is a prerequisite for quality control of non-sterile drugs. However, the use of existing procedures for validation/verification of analytical methods is challenging, since a number of factors, such as microorganism distribution in the sample, cell morphology, and metabolic activity of microorganisms contribute to the error in microbiological testing. **The aim of the study** was to assess the feasibility of using the microbiological method validation parameters for validation/verification of the agar plate method. **Materials and methods:** 18 non-sterile medicinal products were used in the study. Experiments included determination of antimicrobial activity. The quantification of viable bacteria, yeasts and moulds was performed using the modified pour plate method. The statistical processing of the obtained results was performed using Microsoft Excel 7.0 and Statistica 8.0. **Results:** the paper provides the results of quantitative determination of test microorganisms inoculated into non-sterile drugs. The results were obtained as part of validation/verification of the agar plate method of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV ed. **Conclusions:** the validation/verification of the test method for isolation and quantification of microorganisms revealed no deviations of the study results from the established acceptance criteria. This proves the feasibility of using the following validation parameters: accuracy, precision, robustness, and limit of quantitation when validating new methods for quantitative determination of microorganisms or verification of previously validated methods.

**Key words:** non-sterile drugs; validation of microbiological tests; validation parameters; quantification; microorganisms; yeasts; moulds; verification of pharmacopoeial methods

**For citation:** Buylova IA, Gunar OV. Validation parameters as applied to methods for quantification of microorganisms in medicinal products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(4):267–272. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-4-267-272>

\* **Corresponding author:** Irina A. Buylova; [Buylova@expmed.ru](mailto:Buylova@expmed.ru)

Проведение валидации/верификации микробиологических методик требует особого внимания. Погрешность (неопределенность) микробиологических исследований является следствием неравномерного распределения микроорганизмов в образце, особенностей клеточной морфологии и метаболической активности микроорганизмов и зависит от выбранной методики испытания, вследствие чего невозможно использовать известные процедуры валидации/верификации аналитических методик. Тем не менее и валидация, и верификация микробиологических методик необходимы при контроле качества нестерильных лекарственных средств (НЛС)<sup>1</sup> [1–3].

При определении качества НЛС по показателю «микробиологическая чистота» выполняют подсчет общего числа аэробных микроорганизмов и общего числа дрожжевых и плесневых грибов. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV изд. (ГФ РФ XIV)<sup>2</sup> для этих целей следует использовать чашечные агаровые методы, мембранную фильтрацию и метод наиболее вероятных чисел. В современных исследованиях, руководствах и нормативных документах в качестве основных параметров валидации количественных тестов рекомендуют использовать «правильность», «прецизионность», «специфичность», «предел количественного определения», «линейность», «рабочий диапазон», «устойчивость»<sup>3</sup> [4–8].

Применимость тех или иных микробиологических методик оценивают при помощи валидационных параметров по критериям приемлемости — это ожидаемые результаты или заданные значения валидационного параметра, которые применяют для оценки соответствия методики путем сравнения с полученными экспериментальными данными<sup>4</sup>. В связи с большой вариабельностью микробиологических методик критерии приемлемости меняются в сторону увеличения процента отклонения<sup>5</sup>.

Цель работы — оценка возможности применения параметров, используемых для валидации микробиологических методик, при валидации/верификации чашечного агарового метода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе рассмотрена возможность применения для валидации/верификации микробиологических методик таких валидационных параметров,

как «правильность», «прецизионность», «предел количественного определения», «устойчивость»<sup>6</sup>.

Объектами исследования являлись субстанции аминокaproновой кислоты; бетаксолола; бромгексина гидрохлорида; гидроксиэтилкрахмала; йогексола; лидокаина гидрохлорида; оксиметазолина гидрохлорида; цинка оксида; а также диклофенак, мазь; карбоцистеин, сироп; верапамил, таблетки; ломилан, сироп; селанк, капли назальные; регидрон, порошок; ревазил, спрей; траметиниб, таблетки; фенотерол, раствор для ингаляции; фолиевая кислота, таблетки.

В работе применяли:

– тест-штаммы микроорганизмов: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404;

– питательные среды: триптиказо-соевый агар, агар Сабура с глюкозой и хлорамфениколом, готовые к использованию (bioMérieux); среды № 1 ГРМ и № 2 ГРМ готовили в лаборатории из сухих порошков (ФБУН «ГНЦ ПМБ»);

– оборудование: микроскоп Olympus CX-41, термостат-инкубатор Binder BD240, ламинарный шкаф, счетчик колоний Scan 100, встряхиватель KS 501, а также 5-й международный стандартный образец мутности ВОЗ (№ 76/522).

Исследования проводили методом количественного определения жизнеспособных бактерий, дрожжевых и плесневых грибов (глубинный модифицированный метод) и микробиологическими методами определения антимикробного действия<sup>7</sup>. Предварительно с целью исключения ложноотрицательных результатов было определено антимикробное действие исследуемых лекарственных средств.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 7.0 и Statistica 8.0.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Валидационный параметр «правильность».** Суспензии тест-штаммов микроорганизмов (100 КОЕ/мл) вносили в исследуемый образец, выполняли испытание модифицированным глубинным методом посева, сравнивая с результатами референсного метода глубинного посева (табл. 1). После количественного учета выросших колоний

<sup>1</sup> Буйлова ИА. Разработка методического подхода к анализу микробиологической чистоты отдельных групп нестерильных лекарственных средств : дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2016.

<sup>2</sup> ОФС.1.2.4.0002.18. Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

<sup>3</sup> PDA Technical report No. 33. Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods. Revised 2013 (TR33). ОФС.1.2.4.0002.18. Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

<sup>4</sup> Monograph 2.6.13. Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified micro-organisms. European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg: EDQM; 2016.

Q2(R1). ICH harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology.

<sup>5</sup> PDA Technical report No. 33. Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods. Revised 2013 (TR33).

<sup>6</sup> ОФС.1.1.00221.18. Валидация микробиологических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

<sup>7</sup> ОФС.1.2.4.0002.18. Микробиологическая чистота. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

**Таблица 1.** Количество тест-штаммов микроорганизмов, выделенных на питательных средах из инокулированных образцов нестерильных лекарственных средств, определенных различными методиками

**Table 1.** Number of test microorganisms isolated in culture media with the help of different methods from inoculated samples of non-sterile drugs

Наименование субстанции Product name	Количество тест-штаммов микроорганизмов, $X_{cp} \pm DX$ , КОЕ Number of test microorganisms, $(X_{av} \pm DX)$ , KFU			
	модифицированный глубинный метод посева modified pour plate method		глубинный метод (референсная методика) pour plate method (reference method)	
	триптиказо-соевый агар trypticase-soy agar	сабуро агар sabouraud agar	триптиказо-соевый агар trypticase-soy agar	сабуро агар sabouraud agar
	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i>
Аминокапроновая кислота Aminocaproic acid	127,0 $\pm$ 3,8	47,0 $\pm$ 1,2	130,0 $\pm$ 0,7	47,0 $\pm$ 0,6
Бетаксолол Betaxolol	111,0 $\pm$ 1,1	31,0 $\pm$ 1,0	100,0 $\pm$ 3,5	28,0 $\pm$ 0,6
Гидроксиэтилкрахмал Hydroxyethyl starch	72,0 $\pm$ 0,7	29,0 $\pm$ 1,0	92,0 $\pm$ 5,8	39,0 $\pm$ 2,0
Йогексол Yogexol	115,0 $\pm$ 1,9	35,0 $\pm$ 0,6	123,0 $\pm$ 2,7	49,0 $\pm$ 1,3
Лидокаина гидрохлорид Lidocaine hydrochloride	81,0 $\pm$ 2,7	26,0 $\pm$ 1,0	80,0 $\pm$ 0,3	29,0 $\pm$ 0,8
Оксиметазолина гидрохлорид Oximetazoline hydrochloride	114,0 $\pm$ 0,7	48,0 $\pm$ 2,0	115,0 $\pm$ 1,9	50,0 $\pm$ 1,4
Цинка оксид Zinc oxide	117,0 $\pm$ 3,3	44,0 $\pm$ 2,2	143,0 $\pm$ 4,6	58,0 $\pm$ 2,5

Примечание.  $X_{cp}$  — среднее значение DX — доверительный интервал.  
Note.  $X_{av}$  — average value, DX — confidence interval.

**Таблица 2.** Процент восстановления микроорганизмов и значения критерия Стьюдента, рассчитанные по результатам выделения микроорганизмов из инокулированных образцов нестерильных лекарственных средств

**Table 2.** Microbial recovery rate and Student's t-test values calculated from the results of microorganism isolation from the inoculated samples of non-sterile drugs

Наименование нестерильного лекарственного средства Non-sterile drug	Процент восстановления микроорганизмов (К, %) и значения критерия Стьюдента ( $t_{\text{выч}}$ ) Microbial recovery rate (K, %) and Student's t-test values ( $t_{\text{cal}}$ )			
	триптиказо-соевый агар trypticase-soy agar		сабуро агар sabouraud agar	
	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i>	
	К, %	$t_{\text{выч}}$ $t_{\text{cal}}$	К, %	$t_{\text{выч}}$ $t_{\text{cal}}$
Аминокапроновая кислота Aminocaproic acid	97	3,3	100	0,05
Бетаксолол Betaxolol	111	0,01	90	0,1
Гидроксиэтилкрахмал Hydroxyethyl starch	78	0	74	0
Йогексол Yogexol	93	0	71	0
Лидокаина гидрохлорид Lidocaine hydrochloride	101	0,07	89	0
Оксиметазолина гидрохлорид Oximetazoline hydrochloride	99	0	96	2
Цинка оксид Zinc oxide	81	0,1	75	0

Примечание.  $t_{\text{табл}} = 4,3$  ( $f = 2, p = 0,95$ ) — табличное значение критерия Стьюдента.  
Note.  $t_{\text{tabl}} = 4,3$  ( $f = 2, p = 0,95$ ) — table value of the Student's t-test.

**Таблица 3.** Количество тест-штаммов микроорганизмов, определенное при выделении бактерий и грибов из проб инокулированных нестерильных лекарственных средств**Table 3.** Number of test microorganisms obtained when isolating bacteria and fungi from the samples of inoculated non-sterile drugs

Наименование нестерильного лекарственного средства Non-sterile drug	Тест-штаммы микроорганизмов Test microorganism	Теоретическое значение, КОЕ Theoretical value, KFU	Экспериментальное значение $\pm \sigma$ , КОЕ Test value $\pm \sigma$ , KFU			CV, %
			1 эксперт Expert 1	2 эксперт Expert 2	3 эксперт Expert 3	
<b>Диклофенак, мазь</b> Diclofenac, ointment	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	26,0	26,0 $\pm$ 4,0	23,0 $\pm$ 2,0	25,0 $\pm$ 3,0	12
	<i>Candida albicans</i>	17,0	14,0 $\pm$ 0,5	17,0 $\pm$ 2,0	14,0 $\pm$ 1,0	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	114,0	99,0 $\pm$ 7,0	106,0 $\pm$ 7,0	102,0 $\pm$ 7,0	6
<b>Карбоцистеин, сироп</b> Carbocisteine, syrup	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	150,0	156,0 $\pm$ 20,8	150,0 $\pm$ 20,8	176,0 $\pm$ 25,0	12
	<i>Candida albicans</i>	15,0	14,0 $\pm$ 1,5	27,0 $\pm$ 0,5	20,0 $\pm$ 1,0	10
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i>	73,0	61,0 $\pm$ 2,8	67,0 $\pm$ 3,7	64,0 $\pm$ 3,2	4
<b>Бромгексина гидрохлорид, субстанция</b> Bromhexine hydrochloride, substance	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	13,0	10,0 $\pm$ 1,0	11,0 $\pm$ 1,0	13,0 $\pm$ 2,0	9
	<i>Candida albicans</i>	19,0	18,0 $\pm$ 1,0	18,0 $\pm$ 1,0	18,0 $\pm$ 2,0	5
	<i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>	129,0	100,0 $\pm$ 9,0	111,0 $\pm$ 9,0	105,0 $\pm$ 6,0	9
<b>Верапамил, таблетки</b> Verapamil, tablets	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	75,0	75,0 $\pm$ 7,7	59,0 $\pm$ 9,1	45,0 $\pm$ 7,0	10
	<i>Candida albicans</i>	35,0	35,0 $\pm$ 7,0	47,0 $\pm$ 3,5	41,0 $\pm$ 5,2	7
	<i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>	200,0	174,0 $\pm$ 19,0	177,0 $\pm$ 18,7	175,0 $\pm$ 2,1	10

Примечание.  $\sigma$  — стандартное отклонение, CV — коэффициент вариации.

Note.  $\sigma$ —standard deviation, CV—coefficient of variation.

вычисляли процент восстановления микроорганизмов как отношение количества колоний, определенных с помощью валидируемой методики, к истинному значению. За истинное значение принимали количество клеток, определенное по референсной методике. Методика является приемлемой, если процент восстановления микроорганизмов (К) составляет не менее 70% от истинного значения.

Рассчитанные по результатам выделения микроорганизмов из образцов нестерильных лекарственных средств при помощи модифицированного глубинного метода значения t-критерия Стьюдента ниже табличного значения этого параметра (табл. 2), что свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий результатов, полученных с использованием двух методик, и является доказательством приемлемости методики.

**Валидационный параметр «прецизионность».** Для определения прецизионности верифицируемой методики делали не менее трех последовательных разведений из заранее приготовленных суспензий микроорганизмов, доводили концентрацию до нижней границы изучаемого диапазона.

После инокуляции образца приготовленными суспензиями выполняли как минимум пять определений с помощью верифицируемой методики. Рассчитывали стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и коэффициент вариации (CV). Все исследования методики производили в одной лаборатории, однако эксперименты проводили в разные дни, разными исполнителями, использовали разное оборудование. В условиях опыта был проведен отрицательный контроль растворителя (без внесения в используемый растворитель тест-штаммов микроорганизмов и исследуемого НЛС), роста микроорганизмов не наблюдалось. Результаты представлены в таблице 3.

**Валидационный параметр «предел количественного определения».** Предел количественного определения устанавливали с помощью суспензий тест-штаммов микроорганизмов, которыми инокулировали НЛС так, чтобы концентрация микроорганизмов составляла 50, 5 и 1 КОЕ/мл. Контролем культуры являлось фактическое количество клеток в рабочей суспензии тест-штаммов микроорганизмов. В инокулированном образце количество микроорганизмов определяли модифицированным

**Таблица 4.** Расчетные значения коэффициента вариации (CV, %) количества тест-штаммов микроорганизмов *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, определенных в инокулированных нестерильных лекарственных средствах

**Table 4.** Calculated values of the coefficient of variation (CV, %) for the number of test microorganisms *C. albicans*, *B. subtilis*, *E. coli*, *St. aureus*, *P. aeruginosa*, detected in the inoculated non-sterile drugs

Наименование нестерильного лекарственного средства Non-sterile drug	Содержание микроорганизмов в суспензии тест-штаммов (контроль культуры), КОЕ Content of microorganisms in the test microorganism suspension (control culture), KFU			Содержание микроорганизмов в инокулированном образце нестерильного лекарственного средства, КОЕ Content of microorganisms in the inoculated non-sterile drug, KFU		
	50 КОЕ 50 KFU	5 КОЕ 5 KFU	1 КОЕ 1 KFU	50 КОЕ 50 KFU	5 КОЕ 5 KFU	1 КОЕ 1 KFU
Фенотерол, раствор для ингаляций Fenoterol, inhalation solution	17	35	26	17	35	27
Траметиниб, таблетки Trametinib, tablets	17	21	14	17	21	17
Фолиевая кислота, таблетки Folic acid, tablets	4	7	17	14	12	28

**Таблица 5.** Результаты экспериментов по выделению микроорганизмов из образцов инокулированных нестерильных лекарственных средств на разных питательных средах

**Table 5.** Results of microorganism isolation from the samples of inoculated non-sterile drugs in different culture media

Наименование нестерильного лекарственного средства Non-sterile drug	Триптиказо-соевый агар Trypticase-soy agar		Сабуро агар Sabouraud agar		№ 1 ГРМ GRM 1	№ 2 ГРМ GRM 2
	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i>		<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i>
	К, %	F <sub>выч</sub> F <sub>cal</sub>	К, %	F <sub>выч</sub> F <sub>cal</sub>	К, %	К, %
Ломилан, сироп Lomilan, syrup	80	1,3	80	3,2	70	97
Селанк, капли назальные Selank, nasal drops	70	3,0	97	8,0	70	85
Регидрон, порошок Regidron, powder	76	2,5	88	5,4	84	87
Ревасил, спрей Revasil, spray	100	5,7	92	9,2	90	93

Примечание: К — восстановление микроорганизмов, F<sub>выч</sub> — критерий Фишера.  
Note: K—Microbial recovery rate, F<sub>cal</sub>—Fisher’s test.

**Таблица 6.** Оценка результатов испытания по критериям приемлемости

**Table 6.** Evaluation of test results against acceptance criteria

Валидационные параметры Validation parameters	Критерии приемлемости Acceptance criteria	Допустимое значение критерия Valid criterion value	Полученные результаты Obtained results
Правильность Accuracy	Критерий Стьюдента (t <sub>выч</sub> ) Student’s t-test (t <sub>cal</sub> )	<4,3	0–3,3
	Процент восстановления микроорганизмов (К) Microbial recovery rate (K)	>70%	70–90%
Прецизионность Precision	Коэффициент вариации (CV) Coefficient of variation (CV)	≤35 %	3–12%
Предел количественного определения Limit of quantitation	Коэффициент вариации (CV) Coefficient of variation (CV)	≤35 %	7–35%
Устойчивость Robustness	Критерий Фишера (F <sub>выч</sub> ) Fisher’s test (F <sub>cal</sub> )	≤19,0	1,0–11,6



глубинным чашечным агаровым методом. В таблице 4 представлены расчетные значения коэффициента вариации, полученные в экспериментах с различными лекарственными формами НЛС. Критерий приемлемости методики выполняется тогда, когда пределы количественного определения исследуемой верифицируемой методики не выше пределов количественного определения референсной методики.

**Валидационный параметр «устойчивость».** Устойчивость методики контролировали, выполняя эксперименты с использованием различных питательных сред: готовой к употреблению (триптиказо-соевый агар и Сабуро агар) и сухой, приготовленной в лаборатории (среда № 1 ГРМ и среда № 2 ГРМ). Для оценки применяли F-критерий Фишера (табл. 5). Показано, что изменение питательной среды не влияет на процент восстановления микроорганизмов из НЛС, составляющий 70–100% для образцов, инокулированных микроорганизмами в количестве 5 КОЕ, что подтверждает пригодность методики по параметру «устойчивость».

Таким образом, в ходе настоящего исследования нами подтверждена возможность количественного определения бактерий с помощью верифицируемого фармакопейного чашечного агарового метода (табл. 6).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные исследования, проведенные в рамках валидации/верификации методики количественного выделения микроорганизмов

ГФ РФ XIV, не выявили отклонений полученных результатов от установленных критериев приемлемости. Это доказывает возможность применения валидационных параметров «правильность», «прецизионность», «устойчивость», «предел количественного обнаружения» при валидации новых методик количественного определения микроорганизмов или верификации ранее валидированных.

**Вклад авторов.** И. А. Буйлова — планирование исследования, сбор, обработка и систематизация экспериментальных данных, написание и доработка текста, О. В. Гунар — консультации по проведению отдельных этапов экспериментальных работ, доработка текста, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

**Authors' contributions.** Irina A. Buylova—planning of the study, collection, processing and systematisation of the experimental data, writing and revising of the text; Olga V. Gunar—providing consultation on individual stages of experimental work, finalisation of the text, approval of the final version of the paper for publication.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00003-20-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00003-20-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гунар ОВ, Сахно НГ, Абрамович РА. Основы валидации микробиологических методов фармацевтического анализа. М.: РУДН; 2017. [Gunar OV, Sakhno NG, Abramovich RA. Basics of validation of microbiological methods of pharmaceutical analysis. Moscow: PFUR; 2017 (In Russ.).]
2. Гунар ОВ, Карасев РП. Процедура валидации в оценке методов определения бактерий в лекарственных препаратах. Фармация. 2012;(6):3–6. [Gunar OV, Karasev RP. A validation procedure in the assessment of methods for the determination of bacteria in drugs. Farmatsiya = Pharmacy. 2012;(6):3–6 (In Russ.).]
3. Гунар ОВ. Валидация метода количественного определения аэробных бактерий и грибов, выделяемых из лекарственных средств. Альтернативный агаровый метод. Химико-фармацевтический журнал. 2003;37(3):53–6. [Gunar OV. Validation of the method of quantitative determination of aerobic bacteria and fungi isolated from medicines: Alternative agar inoculation technique. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2003;37(3):161–4]. <https://doi.org/10.1023/A:1024551017750>
4. Гунар ОВ, Буйлова ИА. Особенности валидации качественных микробиологических методов фармацевтического анализа. Химико-фармацевтический журнал. 2017;51(1):54–6. [Gunar OV, Buylova IA. Validation of qualitative microbiological methods of pharmaceutical analysis. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2017;51(1):68–70]. <https://doi.org/10.1007/s11094-017-1560-0>
5. Peris-Vicente J, Carda-Broch S, Esteve-Romero J. Validation of rapid microbiological methods. J Lab Autom. 2015;20(3):259–64. <https://doi.org/10.1177/2211068214554612>
6. IJzerman-Boon PC, van den Heuvel ER. Validation of qualitative microbiological test methods. Pharmaceut Statist. 2015;14(2):120–8. <https://doi.org/10.1002/pst.1663>
7. Manju MA, van den Heuvel ER, IJzerman-Boon PC. A comparison of spiking experiments to estimate the detection proportion of qualitative microbiological methods. J Biopharm Stat. 2019;29(1):30–55. <https://doi.org/10.1080/10543406.2018.1452027>
8. Lombard B, Cornu M, Lahellec C, Feinberg MH. Experimental evaluation of different precision criteria applicable to microbiological counting methods. J AOAC Int. 2005;88(3):830–41. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.830>

## ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

**Буйлова Ирина Александровна**, канд. фарм. наук. Irina A. Buylova, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3787-269X>  
**Гунар Ольга Викторовна**, д-р фарм. наук. Olga V. Gunar, Dr. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Статья поступила 29.06.2020  
После доработки 03.11.2020  
Принята к печати 04.12.2020

Article was received 29 June 2020  
Revised 3 November 2020  
Accepted for publication 4 December 2020