

ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

О.В. Гунар, докт. фарм. наук, **Н.Г. Сахно**, канд. фарм. наук, **Г.М. Булгакова**, **И.А. Буйлова**
Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России,
Москва, Петровский бульвар, д. 8

E-mail: Gunar@expmed.ru

Показана возможность выделения и дифференциации отдельных видов бактерий при их совместном культивировании при испытании по показателю «Микробиологическая чистота» в присутствии лекарственного средства и без него. Изучена динамика развития *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* на неселективной жидкой питательной среде. Отмечена конкуренция использованных тест-штаммов за питательные субстраты накопительной среды, обусловленная особенностями развития бактериальных культур в лаг-фазе. Доказана возможность уменьшения массы образца для анализа и одновременного выделения отдельных видов микроорганизмов, регламентированных ГФ XII.

Ключевые слова: лекарственные средства, контроль качества, микробиологическая чистота.

Испытание лекарственных средств (ЛС) по показателю «Микробиологическая чистота» проводится в соответствии с действующим изданием Государственной фармакопеи [1] и включает в себя как определение содержания микроорганизмов в 1 г (мл) образца, так и выделение отдельных видов бактерий. В зависимости от категории ЛС, предусмотренной ОФС «Микробиологическая чистота», для анализа требуется образец массой (объемом) 10–30 г (мл). Для ряда препаратов и фармацевтических субстанций такое количество неприемлемо. Поэтому весьма актуален вопрос о возможности уменьшения массы (объема) образца для испытания по показателю «Микробиологическая чистота». Зарубежные фармакопеи (Европейская, Японская, Британская, Международная, Фармакопеи США и Украины) предусматривают такую возможность: если количество в дозированной форме (таблетке, капсуле, инъекциях) не более 1 мг или количество на 1 г (мл) (для недозированных препаратов) менее чем 1 мг, образец для анализа может составлять не меньше содержимого 10 единиц или 10 г (мл) продукта; в случае, когда количество вещества ограничено, или размер серии крайне мал (менее 1000 г (мл), для анализа может быть отобран 1% от серии; если общий размер серии менее 200 единиц (например, ЛС используется в клинических ис-

пытаниях), количество образца для анализа может быть уменьшено до 1–2.

В Государственной фармакопее XII издания (ГФ XII) подобные случаи не описаны. Особую сложность, возникающую при уменьшении массы (объема) испытуемого препарата, представляют собой качественные методы. В отличие от определения общего числа микроорганизмов в ЛС существующие нормативные требования и методики выделения отдельных видов бактерий не позволяют использовать образец малой массы. Для выявления *Escherichia coli* требуется 10 г (мл), для определения *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* – 10 г (мл). В соответствии с методикой испытания для выделения как *E. coli*, так и *S. aureus* и *P. aeruginosa* разведение образца вносят в накопительную питательную среду (соевоказеиновый бульон или среду №8), после чего при наличии видимого роста производится пересев на селективные и дифференциально-диагностические среды. Естественные популяции микроорганизмов, контаминирующие ЛС, как правило, представляют собой смесь различных микроорганизмов. Между ними существуют различные формы взаимодействия: это может быть конкуренция за общий субстрат, комменсализм (выгоду из симбиоза извлекает только один партнер, не нанося вреда другому) или мутуализм (взаимовыгодный симбиоз). Для изучения этих и других форм взаимодействия используют смешанные культуры. При создании определенных заданных условий можно наблюдать последовательную смену отдельных микроорганизмов и накапливаемых продуктов обмена. Это позволяет делать выводы о синергистических или антагонистических взаимоотношениях между различными микроорганизмами [2].

С учетом вышесказанного и идентичности используемых сред для накопления актуально изучение возможности совместного выделения указанных микроорганизмов из контаминированных ЛС с использованием образцов разной массы для анализа (10 г и 1 г), что и явилось целью настоящего исследования.

Экспериментальная часть

Актуальность и своевременность обсуждаемой проблемы подчеркиваются интересом к вопросам организации лекарственного обеспечения пациентов с редкими (орфанными) заболеваниями [3, 4]. Особое внимание уделяется разработке и внедрению биоаналогичных препаратов, а также вопросам взаимозаменяемости ЛС [5, 6].

В ходе исследования изучались особенности совместного культивирования тест-штаммов микроорганизмов *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 на жидкой питательной среде – триптиказо-соевом бульоне и проводилась оценка возможности выделения и дифференциации отдельных видов микроорганизмов из образцов ЛС разной массы (10 г и 1 г).

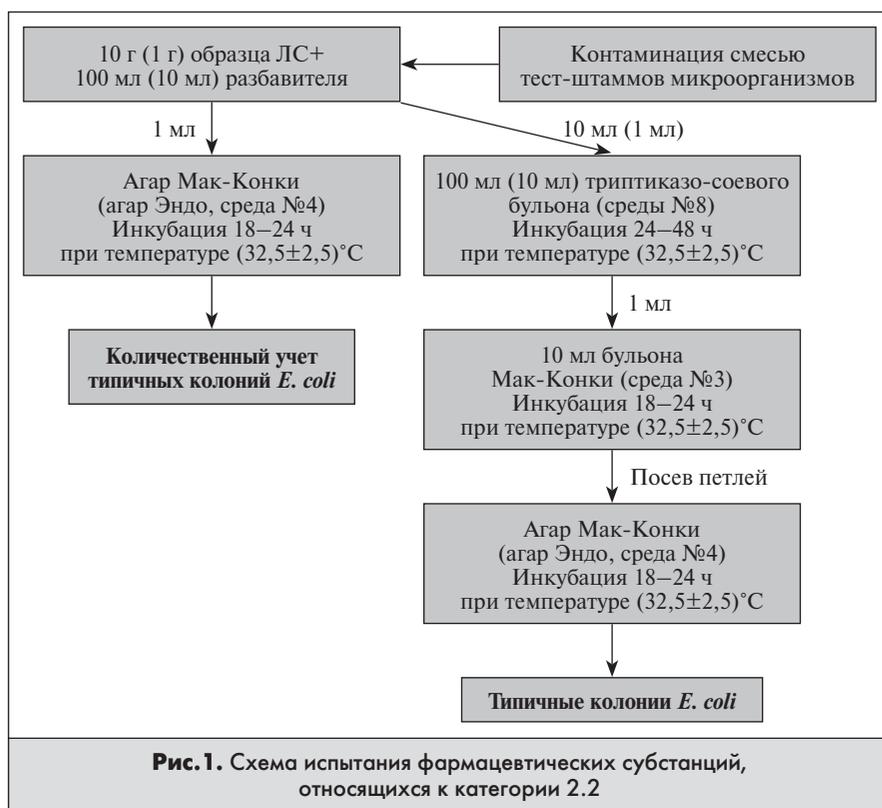
В работе были использованы тест-штаммы микроорганизмов: *B. subtilis* ATCC 6633 (взвесь спор), *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 10231, *A. brasiliensis* ATCC 16404 (взвесь конидий). Культуры, выращенные на триптиказо-соевом агаре, смывали раствором натрия хлорида 0,9% изотонического, стандартизовали с помощью оптического стандарта мутности ВОЗ и путем последовательных десятикратных разведений получали рабочие взвеси бактерий. В ходе исследования использовались готовые питательные среды производства фирмы «Biomegieux», ростовые и селективные свойства которых были подтверждены в соответствии с действующей нормативной документацией.

Вначале смесями приготовленных суспензий *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 с концентрациями клеток 10^3 и 10^1 КОЕ/мл (все виды бактерий одновременно и попарно), а также взвесью каждого микроорганизма в отдельности контаминировали накопительную питательную среду – триптиказо-соевый бульон (TSB), не содержащий ЛС, – по 1 мл разведения каждого тест-штамма в 100 мл среды. Инкубировали в течение 24–48 ч при температуре 33,0°C. По истечении срока инкубации определяли количество каждого микроорганизма в питательной среде методом прямого посева на дифференциально-диагностические среды. Для выделения *E. coli* использовали агар Эндо; для выделения *S. aureus* – агар Бэйрда–Паркера; для выделения *P. aeruginosa* – цетримидный агар. Учитывали количество только типичных по морфологии для выделяемого вида колоний.

Для установления возможности выделения отдельных видов бактерий из разного количества контаминированных ЛС использовали 20 фармацевтических субстанций, относящихся к категориям 2.2 и 1.2 Б, согласно ГФ XII. С целью исключения возможности получения ложноположительных результатов перед проведением эксперимента исследовали микробиологическую чистоту изучаемых ЛС. Установили, что использованные фармацевтические субстанции не содержали микроорганизмы-контаминанты.

Из отобранных для анализа образцов (10 г и 1 г) готовили разведения в соотношении 1:10. В случае, если субстанция обладала антимикробным дей-

ствием, во избежание получения ложноотрицательных результатов, осуществляли ее нейтрализацию методом разведений. Проводили контаминацию полученных разведений образца смесью всех использованных тест-штаммов так, чтобы в конечных взвесах содержалось 50 КОЕ каждого микроорганизма. Отдельные виды бактерий (*E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027) выделяли в соответствии с требованиями ГФ XII. Схемы эксперимента приведены на рис. 1, 2. Количество внесенных клеток определяли поверхностным чашечным агаровым методом. Для расчета процента восстановления *E. coli* из контаминированных образцов ЛС посев производили непосредственно на дифференциально-диагностическую плотную питательную среду. После необходимого периода инкубации осу-



шествовали количественный учет типичных для данного микроорганизма колоний и сравнивали полученный результат с количеством внесенных клеток микроорганизмов (см. рис. 1, 2).

При оценке накопительных свойств используемой питательной среды в отношении каждого микроорганизма при их совместном культивировании было установлено, что результаты для бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa* оказались ниже таковых, полученных при отдельном их выращивании на той же питательной среде. Вероятно, в этом случае можно говорить об угнетении указанных видов тест-штаммом *E. coli*. При этом от концентрации взвесей, использованных для контаминации, накопительные свойства среды не зависят (табл. 1). При культивировании микроорганизмов попарно выявлена закономерность, аналогичная таковой для смеси всех бактерий, но выраженная менее ярко (табл. 2).

Угнетающие свойства *E. coli* в наибольшей степени проявляются в отношении тест-штамма *S. aureus*. При совместном культивировании *S. aureus* и *P. aeruginosa* эффекта угнетения не наблюдалось, накопление происходило одновременно. Это подтверждает возможность выделения данных микроорганизмов в ходе

анализа ЛС, что и предусмотрено методиками, описанными в действующей нормативной документации.

Угнетающий эффект, проявляемый *E. coli* в отношении других микроорганизмов, вероятно, связан с динамикой развития выделяемых бактерий. Скорость размножения микроорганизмов зависит от вида микроорганизма, величины и свойств инокулята, состава питательной среды, ее pH и Eh, аэрации, температуры инкубации и др. Рост культуры в закрытой системе происходит в соответствии с определенными закономерностями, которые отражает кривая роста. Типичная кривая имеет S-образную форму и позволяет различить нескольких фаз роста в зависимости от утилизации бактериями составляющих питательной среды. Каждая фаза характеризуется определенным размером клеток, скоростью размножения и потреблением субстрата, синтезом метаболитов и т.д. [7]. На рис. 3 представлены кривые динамики развития музейных тест-штаммов *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* [8].

Наибольший интерес представляет начальная фаза – лаг-фаза (см. отрезки кривых 1, 2 на рис. 3), которая охватывает промежуток времени между инокуляцией питательной среды и достижением максимальной скорости деления. Продолжительность этой

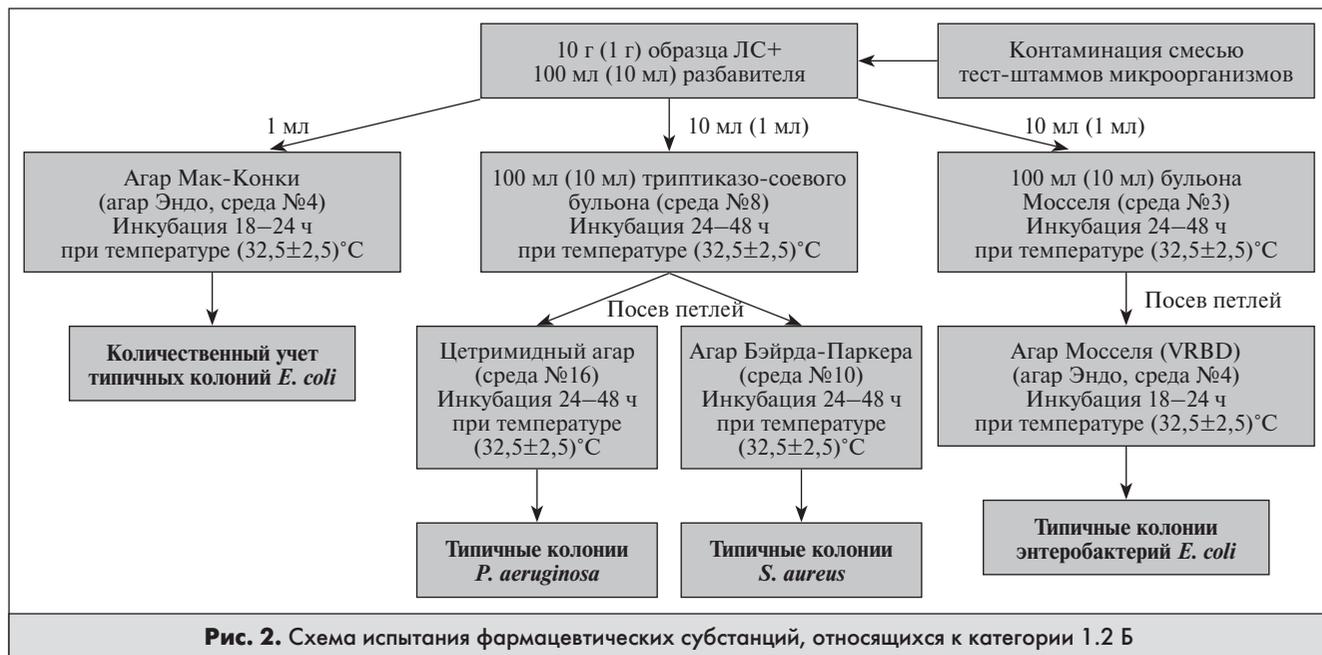


Рис. 2. Схема испытания фармацевтических субстанций, относящихся к категории 1.2 Б

Таблица 1

КОЛИЧЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖИДКОЙ НАКОПИТЕЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ЧЕРЕЗ 48 ч ИНКУБАЦИИ

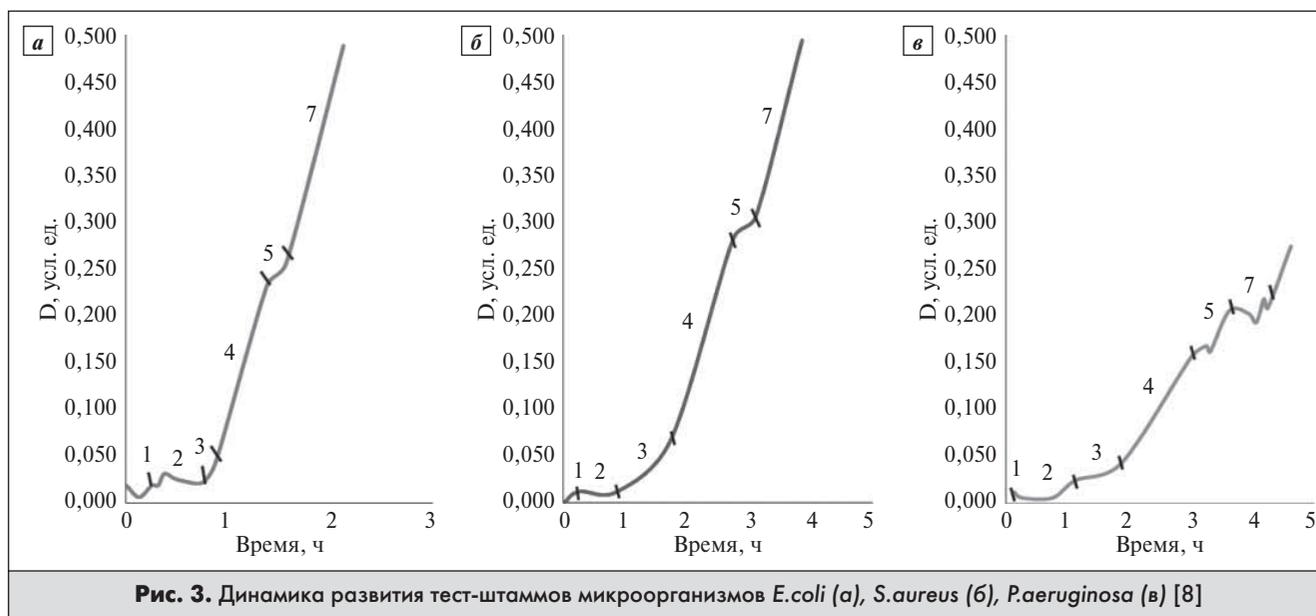
Контаминация	Внесенное количество тест-штамма: 10 ³ КОЕ/100 мл TSB			Внесенное количество тест-штамма: 10 ¹ КОЕ/100 мл TSB		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Смесью бактерий	1,0 · 10 ⁹	0,7 · 10 ⁶	3,5 · 10 ⁷	0,6 · 10 ⁹	1,0 · 10 ⁶	0,9 · 10 ⁸
Каждым видом бактерий по отдельности	1,0 · 10 ⁹	2,5 · 10 ⁸	3,5 · 10 ⁸	0,7 · 10 ⁹	0,8 · 10 ⁹	0,8 · 10 ⁹

**КОЛИЧЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ, ПОПАРНО ВНОСИМЫХ В ЖИДКУЮ
НАКОПИТЕЛЬНУЮ ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ И ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НЕЕ ПОСЛЕ 48 ч ИНКУБАЦИИ**

Микроорганизмы	Внесенное количество тест-штамма: 10 ³ КОЕ/100 мл TSB		Внесенное количество тест-штамма: 10 ¹ КОЕ/100 мл TSB	
	вносили в среду попарно	вносили в среду по отдельности	вносили в среду попарно	вносили в среду по отдельности
<i>E. coli</i>	0,5 · 10 ⁹	1,0 · 10 ⁹	0,7 · 10 ⁹	0,7 · 10 ⁹
<i>S. aureus</i>	2,0 · 10 ⁵	2,5 · 10 ⁸	1,0 · 10 ⁵	0,8 · 10 ⁹
<i>E. coli</i>	0,6 · 10 ⁹	1,0 · 10 ⁹	3,0 · 10 ⁸	0,7 · 10 ⁹
<i>P. aeruginosa</i>	0,9 · 10 ⁸	3,5 · 10 ⁸	0,9 · 10 ⁸	0,8 · 10 ⁹
<i>S. aureus</i>	0,5 · 10 ⁸	2,5 · 10 ⁸	2,0 · 10 ⁶	0,8 · 10 ⁹
<i>P. aeruginosa</i>	1,0 · 10 ⁸	3,5 · 10 ⁸	0,5 · 10 ⁸	0,8 · 10 ⁹

фазы зависит главным образом от предшествовавших условий культивирования и возраста инокулята, а также от степени пригодности для роста данной среды [2]. Изменения кривой динамики развития в лаг-фазе характеризуют адаптационные механизмы и закономерности их взаимодействия [8]. Согласно вышеприведенным данным (см. рис. 1), можно сделать заключение о более высокой метаболической активности и адаптационных возможностях *E. coli* по сравнению с *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Исходя из этого, вполне реалистично выглядит предположение, что при совместном культивировании исследованных микроорганизмов в условиях испытания по показателю «Микробиологическая чистота» имеет место конкуренция данных тест-штаммов за питательные субстраты накопительной среды. Несмотря на это, а также принимая во внимание тот факт, что количество инокулята не влияет на получаемый результат (см. табл. 1, 2), во всех случаях выделение и дифференциация отдельных видов микроорганизмов возможны.

Вероятность выделения отдельных микроорганизмов зависит от особенностей вида (метаболической активности, генотипа и др.), состояния инокулята, используемой питательной среды, условий инкубации [9, 10]. Коллекционные тест-штаммы бактерий, используемые в ходе эксперимента, представляют собой неповрежденные клетки, типичные по своим свойствам. Поэтому результаты, полученные в отсутствие препарата, позволяют лишь оценить возможность дифференциации отдельных видов микроорганизмов и характер их взаимодействия между собой. В реальных условиях контаминанты ЛС подвергаются воздействию химических соединений, входящих в состав препарата (действующее вещество, консерванты и др.), и факторов, оказывающих влияние в ходе технологического процесса (повышенная температура, охлаждение, замораживание, высушивание, облучение, повышенная кислотность и т.п.). В ходе многолетнего изучения методов выделения поврежденных микроорганизмов исследователями выявлены осо-



бенности, в числе которых следующие: способность клеток образовывать колонии на неселективной питательной среде, при отсутствии роста на селективных средах; увеличение лаг-фазы по сравнению с неповрежденными клетками для восстановления поврежденных участков клетки и синтеза белков и нуклеиновых кислот, необходимых для роста [10].

Поврежденные клетки микроорганизмов могут присутствовать в образце, но не образовывать видимого роста на селективных питательных средах, используемых при анализе [10]. Поэтому важным этапом исследования является изучение способов выделения бактерий после их контакта с ЛС. В соответствии с нормативной документацией контаминацию образцов можно проводить как до, так и после нейтрализации антимикробного действия вещества одним из подходящих способов, а именно, разведением, методом мембранной фильтрации, использованием инактиваторов [11, 12]. Обе методики позволяют создать необходимые «стрессовые» для микроорганизмов условия, приближенные к реальным [13]. Для оживления используют жидкие и плотные неселективные питательные среды, при этом восстановление наиболее сильно поврежденных клеток микроорганизмов происходит уже в течение 2–4 ч культивирования при соответствующей температуре инкубации [10].

Согласно результатам, полученным при выделении отдельных видов бактерий из фармацевтических субстанций, контаминированных их смесью, с помощью методик с использованием накопительной питательной среды, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* сохраняют типичные для данных тест-штаммов морфологические и культуральные свойства, несмотря на контакт с ЛС. При этом выделение и дифференциация микроорганизмов возможна как из образца ЛС массой 10 г, так и из образца ЛС 1 г.

В табл. 3 и 4 приведены результаты количественного определения *E. coli* в контаминированных образцах (10 и 1 г) фармацевтиче-

ских субстанций, относящихся к категориям 2.2 и 1.2 Б соответственно. Полученные данные представлены в виде процента восстановления (отношения количества выделенных и внесенных клеток микроорганизма).

Согласно данным табл. 3, 4, значения процента восстановления *E. coli* из всех использованных ЛС не опускаются ниже 80%, что соответствует требованиям нормативной документации [11, 12]. В ходе сравнения данных количественного определения *E. coli* в образцах массой 10 и 1 г с применением методик дис-

Таблица 3

ВЫДЕЛЕНИЕ *E. COLI* ИЗ ЛС, ОТНОСЯЩИХСЯ К КАТЕГОРИИ 2.2, МАССОЙ 1 И 10 г, КОНТАМИНИРОВАННЫХ СМЕСЬЮ ТЕСТ-ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Субстанция	Процент восстановления <i>E. coli</i> из образца ЛС массой		F _{выч.} (F _{табл.} (p=0,95; f=2) = 19,00)	t _{выч.} (t _{табл.} (p=0,95; f=4) = 2,776)
	1 г	10 г		
Валацикловира гидрохлорид	84	88	4,0	0,21
Бромгексина гидрохлорид	80	88	6,3	0,67
Декстран 40	88	96	1,6	0,14
Омепразол	80	88	1,9	0,74
Бензилбензоат	88	96	4,3	0,92
Метамизол натрия	100	96	2,3	0,74
Никотинамид	96	100	1,8	0,22
Дибазол	100	100	1,7	0,00
Бутамина цитрат	104	100	2,3	0,74
Такролимус	96	100	3,3	1,88

Таблица 4

ВЫДЕЛЕНИЕ *E. COLI* ИЗ ЛС, ОТНОСЯЩИХСЯ К КАТЕГОРИИ 1.2 Б, МАССОЙ 1 И 10 г, КОНТАМИНИРОВАННЫХ СМЕСЬЮ ТЕСТ-ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Субстанция	Процент восстановления <i>E. coli</i> из образца ЛС массой		F _{выч.} (F _{табл.} (p=0,95; f=2) = 19,00)	t _{выч.} (t _{табл.} (p=0,95; f=4) = 2,776)
	1 г	10 г		
Аминокaproновая кислота	91	100	5,7	0,32
Лидокаина гидрохлорид	96	83	1,0	0,40
Метионин	91	103	6,2	0,59
Натрия гидрокарбонат	88	91	4,0	0,49
Бетаксолол	88	88	8,3	0,00
Рабепразол	80	84	1,8	0,25
Налбуфин	80	88	2,6	0,33
Артекаина гидрохлорид	79	96	3,5	0,26
Мемодерм	96	107	1,3	1,05
Иогексол	100	111	1,6	0,65

персионного анализа (сравнение дисперсий с помощью критерия Фишера, а также сравнение выборочных средних с помощью параметрического критерия Стьюдента) установлено, что полученные для 2 групп результаты статистически неразличимы между собой.

Таким образом, в ходе настоящего исследования показана возможность выделения и дифференциации отдельных видов бактерий при их совместном культивировании в условиях испытания по показателю «Микробиологическая чистота» в присутствии ЛС и без него. При этом количество образца для анализа, концентрация клеток в инокуляте, а также вероятная конкуренция использованных тест-штаммов за питательные субстраты накопительной среды на результаты определения микроорганизмов заметного влияния не оказывали. Показано, что для образцов массой 10 и 1 г использованных фармацевтических субстанций осуществимо количественное определение *E. coli* с равным уровнем точности.

Вывод

Экспериментально показана возможность уменьшения количества образца для анализа и одновременного выделения отдельных видов микроорганизмов, регламентированных ГФ XII для категорий 2.2 и 1.2Б ЛС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея РФ XII издания. Часть 1. М.: Медицина; 2007: 704.
2. Шлегель Г. Общая микробиология. Пер. с нем. М.: Мир; 1987: 567.
3. В 2014 г. бюджет российского здравоохранения уменьшится. Ремедиум, 2013; 10 (200): 4
4. В Европе объявлена очередная кампания по поиску методов лечения редких болезней. Ремедиум, 2013; 12 (202): 4
5. Шабров Р.В., Шадрин А.Д. Закон «Об обращении лекарственных средств»: обзор и анализ изменений. Ремедиум, 2013; 12 (202): 6–13.
6. Миронов А.Н., Васильев А.Н., Гавришина Е.В., Ниязов Р.Р. Взаимозаменяемость лекарственных препаратов: зарубежный опыт, препятствия и условия становления концепции в России, роль научной экспертизы. Ремедиум, 2013; 10 (200): 8–17.
7. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. М.: Медицина; 2004: 576.
8. Колпакова С.Д., Колпакова Г.А. Исследование особенностей развития музейных и свежевыделенных из организма штаммов. Вестник СамГУ Естественная серия, 2005; 6 (40): 184–193.
9. Evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods. Technical report No.33. PDA Journal of pharmaceutical science and technology. Supplement TR33., 2000; 54: 3: 39.
10. Wu V.C. A review of microbial injury and recovery methods in food. Food microbiology, 2008; 735–744.
11. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasburg; 2013.
12. The United State Pharmacopoeia. National Formulary (USP 36 – NF 31). The United State Pharmacopoeial Convention, 2013.
13. Clontz L. Microbial limit and bioburden tests : validation approaches and global requirements. 2nd ed. Lucia Clontz. CRC Press Taylor & Francis Group; 2009: 326.

Поступила 3 апреля 2014 г.

SPECIFIC CHARACTERISTICS OF ISOLATION OF SOME BACTERIAL SPECIES FROM MEDICATIONS

O.V. Gunar, PhD; N.G. Sakhno, PhD; G.M. Bulgakova; I.A. Builova

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of Russia; 8 Petrovsky Boulevard, Moscow

SUMMARY

The paper shows that certain bacterial species may be isolated and differentiated during their co-cultivation in the testing for the index «Microbiological purity» in the presence and absence of a drug. The trend in *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa* growth on a nonselective liquid medium has been studied. The strains tested are noted to be competitive for the nutrient substrates of a storage medium, which is due to the specific features of the growth of lag-phase bacterial cultures.

The issues of the possibilities and validity of reducing a sample for microbiological examinations are considered. A number of pharmaceutical substances are used as an example to show that test sample mass exerts no impact on the probability of identifying certain species of contaminant microorganisms. In particular, *E. coli* can be isolated and measured from both 10 and 1 g of a medication with the same level of accuracy, as suggested by the results of appropriate processing of the findings. There is evidence that the sample mass can be reduced for analysis and simultaneous isolation of certain microbial species regulated by State Pharmacopoeia 12th Edition.

Key words: medications, quality control, microbiological purity.

REFERENCES

1. The State Russian Federation pharmacopoeia, 12th ed. Part 1. Moscow: Medicine; 2007: 704 (in Russian).
2. Schlegel H. General microbiology. (translated by) Moscow: Mir, 1987: 567 (in Russian).
3. The Russian health care budget will decrease in 2014. Remedium, 2013; 10 (200): 4 (in Russian).
4. Another campaign to find treatments for rare diseases announced in Europe. Remedium, 2013; №12 (202): 4 (in Russian).
5. Shabrov R.V., Shadrin A.D. The law on pharmaceuticals circulation: overview and analysis of the changes. Remedium, 2013; №12 (202): 6–13 (in Russian).
6. Mironov A.N., Vasiliev A.N., Gavrišina E.V., Nijazov R.R. Medicines interchangeability: foreign experience, obstacles and conditions of concept formation in Russia, the role of scientific expertise. Remedium, 2013; №10 (200): 8–17 (in Russian).
7. General and sanitary microbiology with techniques of microbiological research. Tutorial. (Edited by A.S. Labinskaya, L.P. Blinkova, A.S. Eschina). Moscow: Medicine; 2004: 576 (in Russian).
8. Kolpakova S.D., Kolpakova G.A. Investigation of museum and fresh extracted from an organism strains development features. Vestnik SamGU. The Natural science series, 2005; 6 (40): 184–193 (in Russian).
9. Evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods. Technical report No.33. PDA Journal of pharmaceutical science and technology. Supplement TR33., 2000; 54 (3): 39.
10. Wu V.C. A review of microbial injury and recovery methods in food. Food microbiology, 2008; 735–744.
11. European Pharmacopoeia. 8th ed. Strasburg, 2013.
12. The United State Pharmacopoeia. National Formulary (USP 36 – NF 31). The United State Pharmacopoeial Convention, 2013.
13. Clontz L. Microbial limit and bioburden tests : validation approaches and global requirements. 2nd ed. Lucia Clontz. CRC Press Taylor & Francis Group; 2009: 326.