

Количественное определение микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств с использованием системы «Milliflex® Quantum»

О.В. Гунар, Н.Г. Сахно

ФГБУ Научный центр экспертизы средств
медицинского применения Минздрава РФ (ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ);
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гунар Ольга Викторовна – начальник лаборатории микробиологии ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 342-89-01. E-mail: gunar@expmed.ru

Сахно Надежда Геннадьевна – главный эксперт лаборатории микробиологии ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 561-52-94. E-mail: nadine87@inbox.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Показана возможность выделения и количественного определения микроорганизмов с помощью системы «Milliflex® Quantum» («Merck», Германия), сочетающей в себе традиционный метод мембранной фильтрации и флюоресцентное окрашивание микроколоний.

Цель работы – валидация методики количественного определения микроорганизмов на примере системы «Milliflex® Quantum».

Материал и методы. Объект исследования – система «Milliflex® Quantum». Для валидации использовали 5 тест-штаммов в виде готовых систем «BioBall» («Biomerieux», Франция); кассеты, заполненные питательными средами триптиказо-соевый агар и агар Сабуро («Merck», Германия). Валидацию проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания.

Результаты. В ходе исследования оценивали следующие параметры: правильность, прецизионность, линейность, предел количественного определения, рабочий диапазон. Время определения тест-штаммов микроорганизмов с помощью данной методики зависело от вида выделяемого микроорганизма и составляло 12–24 ч. Все микроорганизмы были рассчитаны количественно с приемлемым уровнем правильности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности и линейности. Система позволяла выделять минимальное количество клеток (5–10 КОЕ).

Заключение. К преимуществам валидированной методики относится удобство учета результатов, особенно в сравнении с визуальным подсчетом плесневых грибов, где определение отдельных колоний в ряде случаев затруднено. Данная методика может быть применима для анализа большого числа разнообразных фильтруемых образцов, включая воду, промежуточные продукты и готовые лекарственные средства.

Ключевые слова: лекарственные средства, количественное определение микроорганизмов, валидация.

Для цитирования: Гунар О.В., Сахно Н.Г. Количественное определение микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств с использованием системы «Milliflex® Quantum». Фармация, 2019; 68 (3): 5–11. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-03-01>

QUANTITATIVE DETECTION OF MICROBIAL CONTAMINANTS OF DRUGS, BY USING THE MILLIFLEX® QUANTUM SYSTEM

O.V. Gunar, N.G. Sakhno

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation; 8, Petrovskiy Boulevard, Build. 2, Moscow 127051, Russian Federation

INFORMATION ABOUT OF THE AUTHORS

Gunar Olga – doctor of pharmaceutical Sciences (PhSci) Head of Laboratory of Microbiology, FGBU NCESMP of Ministry of Health, Moscow. Tel.: +7 (916) 342-89-01. E-mail: gunar@expmed.ru

Sakhno Nadezhda – PhD Chief expert of Laboratory of Microbiology, FGBU NCESMP of Ministry of Health, Moscow. Tel.: +7 (916) 561-52-94. E-mail: nadine87@inbox.ru

SUMMARY

Introduction. It has been shown that the Milliflex® Quantum system (Merck, Germany) that combines a traditional method of membrane filtration and fluorescent staining of microcolonies can isolate and quantify microorganisms.

Objective: to validate a procedure for the quantitative detection of microorganisms using the Milliflex® Quantum system as an example.

Material and methods. The study object was the Milliflex® Quantum system. For validation of the system, the investigators used 5 test strains as ready-to-use BioBall systems (Biomérieux, France); cassettes filled with the nutrient media trypticase soy agar and Sabouraud agar (Merck, Germany). Validation was performed in accordance with the requirements of the 14th edition of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation.

Results. During the study, the investigators assessed the following parameters: accuracy, precision, linearity, quantification limit, and working range. The time of detection of test microbial strains, by using this procedure, depended on the type of an isolated microorganism and was 12–24 hours. All microorganisms were quantitatively calculated with an acceptable level of accuracy, repeatability, intra-assay precision, and linearity. The system could isolate the minimum number of cells (5–10 CFU).

Conclusion. The advantages of the validated procedure include the convenience of recording the results, especially in comparison with the visual counting of mold fungi, where the detection of individual colonies is difficult in some cases. This procedure can be applicable to the analysis of a large number of various filterable samples, including water, intermediate products, and finished medicinal products.

Key words: drugs; quantitative detection of microorganisms; validation.

For citation: Gunar O.V., Sakhno N.G. Quantitative detection of microbial contaminants of drugs, by using the Milliflex® Quantum system. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2019; 68 (3): 5–11. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-03-01>

Введение

Альтернативные (быстрые) микробиологические методы уже давно стали неотъемлемой частью лабораторных исследований в клинической практике и пищевой промышленности. Экспресс-диагностика инфекционных заболеваний и необходимость быстрого получения результатов испытаний скоропортящихся продуктов питания послужили стимулом к их повсеместному использованию в практической работе. В фармацевтической промышленности внедрение быстрых микробиологических методов происходит существенно медленнее, несмотря на их потенциальные преимущества. К причинам такого явления можно отнести неопределенность нормативного статуса новых методик и технологий. Кроме того, оценка, проверка и реализация альтернативных микробиологических методов, как правило, – дорогостоящий и трудоемкий процесс [1].

Государственная фармакопея РФ XIV издания (ГФ РФ XIV), действующая с декабря 2018 г., содержит ОФС.1.1.0021.18 «Валидация микробиологических методик» [2], где описаны общие подходы к выбору, внедрению и оценке применимости альтернативных микробиологических методик. Приведенные валидационные параметры и критерии приемлемости позволяют достаточно полно охарактеризовать методику, а также выявить ее особенности и ограничения.

Выбор вида и количества необходимых технологий зависит от разнообразия проводимых анализов, размера фармацевтической компании и желаемой пропускной способности. В большинстве случаев альтернативный метод обеспечивает получение достоверного результата в более короткое время по сравнению с традиционным.

Однако экспрессность метода не всегда является определяющим фактором, другие критерии (удобство, безопасность и др.) также могут иметь решающее значение, в частности возможность применения метода для анализа конкретного образца с учетом его происхождения, физико-химических свойств и др. [3]. Важный аспект – объем образца. В то время как способы, основанные на внесении продукта в среду, могут использоваться для анализа небольших по размеру проб, технологии, подразумевающие мембранную фильтрацию, в данном случае менее ограничены.

Одной из систем, сочетающих в себе традиционный метод мембранной фильтрации и флюоресцентное окрашивание микроколоний микроорганизмов, является «Milliflex® Quantum» («Merck», Германия). Данная технология разработана для быстрого количественного определения микроорганизмов в образцах, физико-химические свойства которых позволяют проводить испытание методом мембранной фильтрации.

Цель исследования – валидация методики количественного определения микроорганизмов на примере системы «Milliflex® Quantum».

Материал и методы

В работе использовали готовые тест-штаммы микроорганизмов системы «BioBall» («Biomérieux», Франция): *B. subtilis* NCTC 10400, *S. aureus* NCTC 10788, *P. aeruginosa* NCTC 12924, *C. albicans* NCPF 3179, *A. brasiliensis* NCPF 2275. Рабочие взвеси микроорганизмов готовили в соответствии с инструкцией производителя, при необходимости делали ряд последовательных разведений для получения суспензии с требуемой концентрацией клеток (50, 25, 10 и 5 колониобразующих единиц – КОЕ).

Для исследования применяли кассеты, заполненными питательными средами триптиказоевый агар и агар Сабуро («Merck», Германия). Их ростовые и селективные свойства были подтверждены в соответствии с действующей нормативной документацией.

Система «Milliflex® Quantum» состоит из насоса Milliflex® PLUS, фильтроэлементов и кассет с питательными средами, набора реактивов для флюоресцентного окрашивания, считывающего устройства и камеры Milliflex Quantum для фиксации результатов.

Методика испытания. Образец (стерильный раствор натрия хлорида, 0,9%), содержащий определенное количество клеток микроорганизмов, пропускали через стерильный мембранный фильтр, встроенный в фильтроэлемент. Затем фильтр помещали на агаризованную питательную среду. Посевы бактерий инкубировали при температуре $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$, посевы дрожжевых и плесневых грибов – при температуре $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$. После завершения инкубации мембрану переносили на подложку с флюоресцентным красителем, приготовленным в соответствии с инструкцией производителя, и инкубировали в течение 30 мин при температуре $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$. После этого производили учет результатов, подсчитывая флюоресцирующие колонии через окно ридера вручную или на компьютере с помощью камеры и программного обеспечения. Часть профильтрованных образцов не окрашивали, а оставляли инкубировать до появления видимых колоний. Количество выделенных микроорганизмов использовали в качестве контрольного значения при сравнении 2 методов.

Систему валидировали в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0021.18, оценивая такие параметры, как правильность, прецизионность, линейность, предел количественного определения, рабочий диапазон.

Результаты и обсуждение

Время, необходимое для обнаружения тестштаммов микроорганизмов с помощью системы «Milliflex® Quantum», устанавливали экспериментально на основании процента восстановления микроорганизмов через определенные временные интервалы (рис.1). Минимальным необходимым временем инкубации считали значение, при котором процент восстановления превышал критерий приемлемости – 70%. Результаты приведены в табл. 1.

Временной диапазон определения тестштаммов микроорганизмов методом флюорес-

центного окрашивания с использованием оборудования «Milliflex Quantum» зависел от вида выделяемого микроорганизма и составил 12–24 ч. Выделение плесневых грибов требовало более длительного срока, чем бактерий и дрожжевых гри-

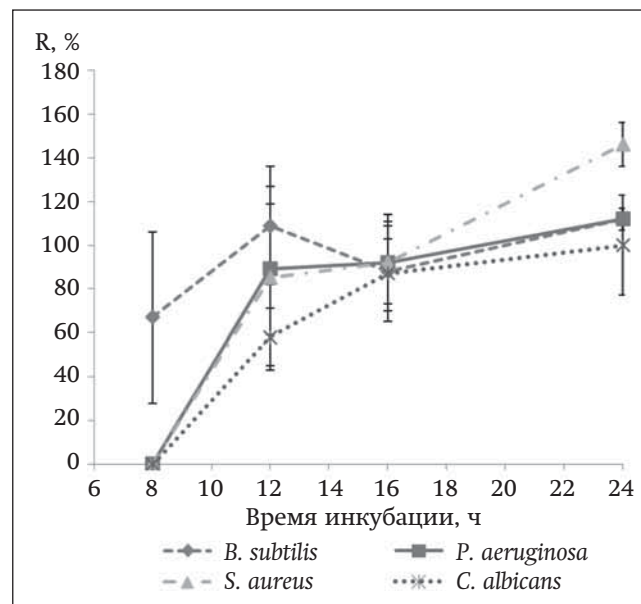


Рис. 1. Зависимость процента восстановления (R, %) от времени инкубации, вычисленная с помощью системы «Milliflex® Quantum»

Fig. 1. Relationship of recovery percentage (R, %) to incubation time calculated using the Milliflex® Quantum system

Таблица 1

Время выделения микроорганизмов с помощью системы «Milliflex® Quantum» и методом мембранной фильтрации без окрашивания

Table 1

Detection times for microorganisms with the Milliflex® Quantum system and membrane filtration method without staining

Вид микроорганизма	Время инкубации, ч	
	метод флюоресцентного окрашивания	стандартный метод мембранной фильтрации
<i>B. subtilis</i>	12	24
<i>P. aeruginosa</i>	12	24
<i>S. aureus</i>	12	24
<i>C. albicans</i>	16	24
<i>A. brasiliensis</i>	24	36

Правильность результатов выделения микроорганизмов с помощью системы «Milliflex® Quantum»

Table 2

Validity of the results of detecting microorganisms with the Milliflex® Quantum system

Вид микроорганизма	Время инкубации, ч	Процент восстановления, R±SD (%) для различных целевых концентраций клеток (значение – p для непарного t-критерия Стьюдента)			
		50 КОЕ	25 КОЕ	10 КОЕ	5 КОЕ
<i>B. subtilis</i>	12–24	91±18 (0,85)	92±18 (0,89)	97±19 (0,71)	125±21 (0,81)
<i>P. aeruginosa</i>	12–24	95±24 (0,96)	85±6 (0,59)	90±3 (0,52)	112±12 (0,45)
<i>S. aureus</i>	12–24	108±39 (0,50)	95±7 (0,24)	85±21 (0,29)	104±5 (0,37)
<i>C. albicans</i>	16–24	97±7 (0,94)	82±3 (0,13)	144±23 (0,57)	103±4 (0,08)
<i>A. brasiliensis</i>	24–36	113±30 (0,29)	103±5 (0,39)	105±7 (0,29)	92±3 (0,59)

бов. Колонии тест-штамма *A. brasiliensis* с помощью системы были обнаружены через 24 ч инкубации, визуальный рост наблюдался только через 36 ч.

В настоящей работе исследование осуществляли с ограниченным количеством коллекционных штаммов. Время обнаружения изолятов, выделенных из лекарственных средств или производственной среды, может существенно отличаться от представленных результатов [4]. Согласно данным литературы, при исследовании образцов воды очищенной и воды, используемой при изготовлении фармацевтической продукции, методом флюоресцентного окрашивания выявить контаминацию возможно в течение 24–72 ч в зависимости от вида микроорганизма, в то время как для определения контаминации стандартным методом мембранной фильтрации с последующей инкубацией на питательной среде R2A,

предназначенной для анализа воды, требуется 5–7 сут [5, 6].

Минимальное время инкубации, установленное в ходе настоящего исследования, было использовано для последующей оценки валидационных параметров.

Все микроорганизмы были определены количественно с приемлемым уровнем правильности на всем исследуемом диапазоне концентраций. Значения процента восстановления находились в диапазоне 80–127%, что соответствует установленному критерию приемлемости (табл.2). Значения, полученные как с помощью флюоресцентного окрашивания, так и стандартным методом мембранной фильтрации, статистически не различались между собой, о чем свидетельствуют результаты их сравнения с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Во всех случаях значение $p \geq 0,05$.

Повторяемость результатов выделения микроорганизмов с помощью системы «Milliflex® Quantum»

Таблица 3

Table 3

Repeatability of the results of detecting microorganisms with the Milliflex® Quantum system

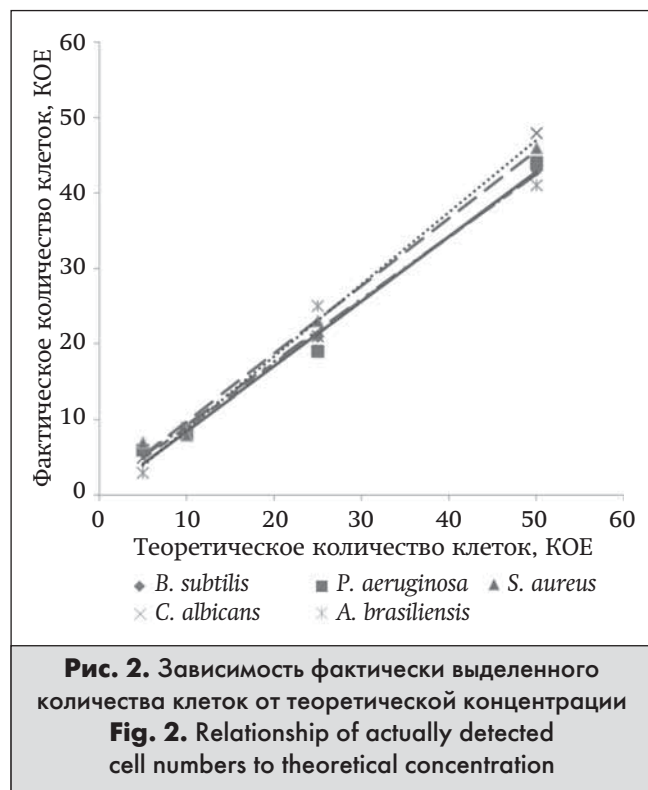
Вид микроорганизма	Коэффициент вариации, CV (%) для различных целевых концентраций клеток в условиях повторяемости (n=3)			
	50 КОЕ	25 КОЕ	10 КОЕ	5 КОЕ
<i>B. subtilis</i>	2,5–10,0	9,4–18,8	7,8–28,0	14,5–26,7
<i>P. aeruginosa</i>	1,3–13,5	3,6–26,0	15,5–22,6	14,6–22,9
<i>S. aureus</i>	10,0–11,8	13,0–19,7	28,0–34,2	22,9–26,7
<i>C. albicans</i>	1,4–10,0	7,0–32,0	27,2–34,0	17,8–32,0
<i>A. brasiliensis</i>	1,1–1,5	18,6–28,0	22,9–26,7	32,0–40,0

Для оценки прецизионности валидируемой методики рассчитывали коэффициент вариации результатов, полученных в условиях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. Все значения повторяемости (табл.3) соответствовали критерию приемлемости – 35%, за исключением минимального количества клеток *A. brasiliensis*. В одном случае из трех коэффициент вариации превышал установленное значение и составлял 40,0%. В целом наблюдается тенденция к увеличению ошибки при уменьшении концентрации клеток в образце, что не противоречит данным литературы. В условиях внутри лабора-

торной прецизионности по результатам 3 экспериментов коэффициент вариации для всех микроорганизмов на всем диапазоне изучаемых концентраций находился в интервале от 6,4 до 34,0%.

Согласно анализу линейности, для всех исследованных микроорганизмов коэффициент детерминации (R^2) был не ниже 0,9 (рис. 2). Угловой коэффициент (b) не отличался от 1,0 более чем на 20% (табл. 4), что соответствует критерию приемлемости в соответствии с зарубежной нормативной документацией [7].

Предел количественного определения микроорганизмов с помощью системы «Milliflex® Quantum» находился в диапазоне от 5 до 10 КОЕ в зависимости от вида изучаемого микроорганизма. Для тест-штамма *A. brasiliensis* NCPF 2275 предел количественного определения составлял 10 КОЕ, что соответствовало результатам фармакопейного метода мембранной фильтрации. Полученные результаты согласуются с данными литературы [5] и могут быть объяснены морфологией колоний данного вида микроорганизма. В связи с тем, что колонии плесневых грибов склонны к слиянию, их количественный учет традиционным методом затруднен. Система «Milliflex® Quantum» позволяет обнаруживать микроорганизмы раньше, когда колонии существенно меньше и лучше разделены (рис. 3).



Результаты оценки правильности, прецизионности, линейности и установленный предел количественного определения свидетельствуют о том, что система «Milliflex® Quantum» позволяет получать достоверные результаты для всех изученных концентраций, которые входят в рабочий диапазон методики. Исключение составляют плесневые грибы *A. brasiliensis*, для которых предел количественного определения составляет 10 КОЕ.

В основе методики количественного определения микроорганизмов с помощью системы «Milliflex® Quantum» лежит традиционный метод мембранной фильтрации. Условия пробоподготовки и инкубации остаются идентичными фармакопейным методам.

Таблица 4

Параметры линейности результатов выделения микроорганизмов

Table 4

Parameters for linearity of the results of detecting microorganisms

Вид микроорганизма	Коэффициент детерминации, R^2	Угловой коэффициент, b
<i>B. subtilis</i>	1,00	0,83
<i>P. aeruginosa</i>	0,99	0,86
<i>S. aureus</i>	0,99	0,90
<i>C. albicans</i>	0,99	0,96
<i>A. brasiliensis</i>	0,98	0,84

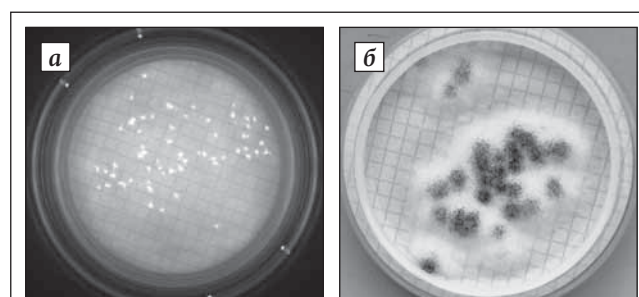


Рис. 3. Визуальное определение плесневых грибов *A. brasiliensis*: (а) – с помощью системы «Milliflex® Quantum» (инкубации 24 ч); (б) – без окрашивания стандартным методом мембранной фильтрации (инкубация 120 ч)

Fig. 3. Visual detection of the mold fungi *A. brasiliensis*: (a) – using the Milliflex® Quantum system (24-hr incubation); (b) – without staining using the standard membrane filtration method (120-hr incubation)

Результаты, полученные в ходе испытания, сравнимы с таковыми по традиционным методикам, что существенно облегчает внедрение и валидацию данной технологии, ключевым этапом которой является неспецифическое флюоресцентное окрашивание микроорганизмов. Первоначально нефлюоресцирующий краситель проникает внутрь клетки, и там под действием клеточных эндоферментов (при условии, что эти ферменты не повреждены, т.е. химически активны) переходит во флюоресцирующую форму. В случае, если мембрана клетки сохранила целостность, флюоресцирующая форма красителя накапливается внутри клетки, в результате чего вся клетка обретает способность к флюоресценции. В противном случае флюоресцирующее вещество вытекает из клетки, растворяясь в общем объеме пробы. Условиями успешного флюоресцентного окрашивания являются наличие у клетки активных ферментов и целостной мембраны. Эти же факторы в первую очередь отвечают за жизнеспособность клетки.

Процедура окрашивания не разрушает клетки, поскольку после окрашивания и последующей инкубации наблюдается рост колоний. После обнаружения микроколонии микроорганизмов могут культивироваться с целью их последующей идентификации всеми стандартными способами (окрашивание по Граму, биохимические тесты, ПЦР и др.). Некоторые авторы считают, что фильтрация, инкубация и окрашивание не оказывают влияния на результат исследования. Отсутствие влияния на клетки микроорганизмов является преимуществом данной методики по сравнению с молекулярно-генетическими методами и АТФ-биолюминесценцией, которые не позволяют восстанавливать и идентифицировать контаминанты в случае получения положительного результата.

Некоторыми авторами показано, что система «Milliflex® Quantum» совместима с образцами пищевых продуктов и материалов природного происхождения [5]. Кроме того, методы дифференциального окрашивания возможно применять при скрининговой оценке генетической стабильности клеточных линий [8].

В ходе исследования методику оценивали на предмет ее применимости для обнаружения микроорганизмов в отдельных образцах культур клеток. Результаты показали наличие флюоресценции во всех проанализированных пробах, не содержащих бактерий или грибов. Для уменьшения вероятности получения ложноположитель-

ных результатов некоторые авторы предлагают предварительно обрабатывать образцы специальным раствором для селективного лизиса клеток. Данный реактив состоит из смеси различных детергентов, подобранных по их способности воздействовать на клеточную мембрану в концентрациях, оказывающих избирательное действие на клетки млекопитающих, но не влияющих на жизнеспособность микроорганизмов [9, 10]. Такая возможность представляет большой интерес для мониторинга биотехнологических процессов. В настоящее время система «Milliflex® Quantum» широко применяется в фармацевтической промышленности для мониторинга воды для производства лекарственных средств [5, 11]. Одной из причин того, что альтернативные методы не используются для анализа готовой фармацевтической продукции, является неопределенность их нормативного статуса. Однако введение в действие ОФС.1.1.0021.18 «Валидация микробиологических методик» открывает возможность для анализа большого числа разнообразных фильтруемых образцов, которые, помимо воды, включают промежуточные продукты и готовые лекарственные средства [2, 4].

Заключение

В ходе настоящего исследования показана возможность выделения и количественного определения отдельных видов бактерий и грибов с помощью системы «Milliflex® Quantum». Валидация методики подтвердила соответствие оцениваемых валидационных параметров (правильность, прецизионность, линейность, предел количественного определения) установленным критериям приемлемости.

Merck, вибрант М, Millipore и Milliflex Quantum – торговые знаки Merck KGaA (Дармштадт, Германия) или дочерних компаний. Все прочие торговые знаки являются собственностью их законных правообладателей.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России №056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Riley B. Rapid Microbiology Methods in the Pharmaceutical Industry. American pharmaceutical review, 2006. [Electronic resource]. Access mode: <http://www.american-pharmaceutical-review.com/Featured-Articles/113094-Rapid-Microbiology-Methods-in-the-Pharmaceutical-Industry>
2. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14-th ed. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2018 (in Russian)].
3. Кулешова С.И., Романюк Г.Ю., Процак С.А., Лисунова С.А. Особенности определения микробиологической чистоты антимикробных лекарственных средств. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, 2014; 2: 26–9. [Kuleshova S.I., Romanyuk G.Yu., Protsak S.A., Lisunova S.A. Specificity of determining microbiological purity of antimicrobial drugs. Vestnik Nauchnogo centra ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya, 2014; 2: 26–9 (in Russian)].
4. Gordon O., Goverde M., Staerk A., Roesti D. Validation of Milliflex® Quantum for Bioburden Testing of Pharmaceutical Products. PDA J. Pharm. Sci. Technol., 2017; 71 (3): 206–24.
5. Meder H., Baumstummeler A., Chollet R., Barrier S., Kukuczka M., Olivieri F., Welterlin E., Beguin V., Ribault S. Fluorescence-based rapid detection of microbiological contaminants in water samples. The Scientific World Journal, 2012; 2012: 234858. 10. <https://doi.org/10.1100/2012/234858>.
6. Brescia B. Milliflex® Quantum – Detection of Microbial Contaminants in Water Samples. American Pharmaceutical Review, 2013. [Electronic resource]. Access mode: <http://www.american-pharmaceutical-review.com/Featured-Articles/151950-Milliflex-sup-Quantum-Detection-of-Microbial-Contaminants-in-Water-Samples>.
7. Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods. Technical report № 33. Parenteral drug association, 2013.
8. Рачинская О.А., Меркулов В.А. Применение методов цитогенетического анализа при оценке качества клеточных линий в составе биомедицинских клеточных продуктов. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2018; 18(1): 25–32. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-25-32> [Rachinskaya O.A., Merkulov V.A. Use of Cytogenetic Analysis Methods for Assessing the Quality of Cell Lines in Biomedical Cell Products. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie, 2018; 18 (1): 25–32. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-25-32> (in Russian)].
9. Baumstummeler A., Chollet R., Meder H. et al. Detection of microbial contaminants in mammalian cell cultures using a new fluorescence based staining method. Letters in Applied Microbiology, 2010; 51 (6): 671–7.
10. Chollet R., Kukuczka M., Halter N. et al. Rapid detection and enumeration of contaminants by ATP bioluminescence using the milliflex rapid microbiology detection and enumeration system. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2008; 16 (3): 256–72.
11. Reynolds D.T., Fricker C.R. Application of laser scanning for the rapid and automated detection of bacteria in water samples. Journal of Applied Microbiology, 1999; 86 (5): 785–95.

Поступила 18 февраля 2019 г.

Received 18 February 2019

Принята к публикации 27 марта 2019 г.

Accepted 27 March 2019