

ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

**Определение концентрации
микробных клеток**

**ОФС.1.7.2.0008.15
Вводится впервые**

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на микробиологические исследования, при которых необходимо использование взвесей микроорганизмов, содержащих определенное количество микробных клеток.

Концентрация микробных клеток выражается числом клеток определяемых микроорганизмов (включая нежизнеспособные и поврежденные) на единицу объема суспензии. При определении концентрации микробных клеток устанавливается процентное содержание жизнеспособных клеток, определяемое числом живых клеток на единицу объема суспензии (число колониеобразующих единиц в мл – КОЕ/мл).

Процедура подсчета концентрации микробных клеток в лабораторных условиях может выполняться вручную или с помощью автоматических устройств. Различают методы прямого визуального подсчета, определение количества колоний после высева микроорганизмов на питательные среды, а также учет микробных клеток под микроскопом после их окрашивания определенными красителями. Кроме того, могут применяться коммерческие водорастворимые системы, содержащие стандартизованное количество микробных клеток. Современные коммерческие системы просты в использовании и позволяют снизить случайную погрешность при определении концентрации микробных клеток, связанную с человеческим фактором.

Методы прямого подсчета

Методы прямого подсчета дают возможность наиболее полно учесть численность микроорганизмов. Их эффективность гораздо выше, чем метода посева на питательные среды, так как многие микроорганизмы требовательны к условиям культивирования и качеству питательной среды. Кроме того, методы прямого подсчета дают возможность получить дополнительную информацию о размерах и морфологии исследуемых клеток.

Подсчет в счетной камере

Наиболее распространенным методом определения общего числа клеток в 1 мл суспензии является их подсчет под микроскопом с использованием счетной камеры. Существует несколько видов счетных камер, принципиальное устройство которых одинаково: Тома-Цейсса, Бюркера, Горяева, камера подсчета с сеткой Нейбауэра.

Счетная камера Горяева представляет собой специальное предметное стекло с нанесенными на него поперечными прорезями, образующими три поперечно расположенные плоские площадки. Средняя площадка продольной прорезью разделена еще на две площадки, каждая из которых имеет выгравированную на ней сетку с квадратами определенной площади. По обе стороны средней площадки в камере Горяева расположены две других на 0,1 мм выше средней. Плоскости этих площадок служат для притирания покровного стекла до появления так называемых Ньютоновских колец.

После притирания покровного стекла создается камера, закрытая с двух боковых сторон, а с двух других имеющая капиллярные пространства, через которые с помощью пастеровской пипетки камеру заполняют разведением взвеси микроорганизма (рис.1).



Рисунок 1 – Счетная камера Горяева

Подсчет клеток проводят под микроскопом, который настраивают таким образом, чтобы была видна нанесенная на камеру сетка и клетки микроорганизма, равномерно распределенные на ней. Считают число клеток в 5 горизонтальных и 15 диагональных больших квадратах, после чего определяют число клеток (x) в 1мл исследуемой взвеси по формуле:

$$x = \frac{a}{20} \cdot N \cdot k \cdot b = \frac{a \cdot 225 \cdot 1111}{20} \cdot b = a \cdot 12499 \cdot b,$$

где: a – число клеток в 20 квадратах;

$N = 225$ – число больших квадратов в камере Горяева;

$k = \frac{1}{v} = \frac{1}{0,0009} = 1111$ – коэффициент, равный величине, обратной объему камеры Горяева ($v=0,9 \text{ мм}^3=0,9 \cdot 10^{-3} \text{ мл}$);

b – разведение исходной взвеси микроорганизма.

При подсчете с использованием камеры Горяева необходимо соблюдать следующие основные правила:

- использовать только стандартные покровные стекла;
- проводить подсчет только чистых культур;
- избегать недостаточного заполнения и переполнения камеры;
- избегать наличия пузырьков воздуха в камере;
- учитывать все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата;
- подсчет клеток производить с объективом $8\times$ ($10\times$), реже $40\times$. С иммерсионным объективом работать нельзя.

Подсчет клеток на мембранных фильтрах

Этот метод рекомендуется использовать для определения количества микроорганизмов во взвесьях с низкой концентрацией клеток.

Определенный объем исследуемой суспензии фильтруют через мембранный фильтр с нанесенной сеткой. Размер пор фильтра 0,22 или 0,45 мкм. Затем микроорганизмы на фильтре окрашивают карболовым эритрозином и подсчитывают в 20 полях зрения с помощью микроскопа, оснащенного окулярным микрометром. Расчет общего количества микроорганизмов (x) в 1 мл производят по формуле:

$$x = \frac{S \cdot N \cdot 10^6}{s \cdot V},$$

где: S – фильтрующая площадь (мм^2);

10^6 – переводной коэффициент квадратных миллиметров в квадратные микрометры;

N – среднее количество бактерий в одном квадрате;

s – площадь квадрата окулярного микрометра, мкм^2 ;

V – объем профильтрованной жидкости, мл.

При подсчете клеток на мембранных фильтрах с помощью люминесцентного микроскопа используют нелюминесцирующие фильтры. После концентрирования клеток на их поверхности проводят флюорохромирование акридиновым оранжевым и подсчитывают. Этот метод позволяет подсчитать общее количество микроорганизмов и определить среди них количество жизнеспособных клеток, так как при окрашивании акридиновыми красителями жизнеспособные клетки имеют зеленую, а нежизнеспособные – красную окраску.

Методы непрямого определения концентрации клеток микроорганизмов

К непрямым методам определения концентрации клеток микроорганизмов относятся визуальные методы, методы, основанные на светопоглощении (турбидиметрия), светорассеянии (нефелометрия),

электропроводности микробных взвесей (кондуктометрия) и др.

Рост микроорганизмов в питательной среде обычно приводит к изменению ее мутности. Мутность – это способность оптически неоднородной среды рассеивать проходящий свет. Мутность взвесей микроорганизмов является оптическим эквивалентом концентрации содержащихся в них микробных клеток. Мутность зависит как от свойств микроорганизмов (размер, показатель преломления), так и от их количества в единице объема. Мутность микробных взвесей определяют путем сравнения со стандартными образцами мутности.

Турбидиметрия и нефелометрия

Мутность микробной взвеси может быть определена путем измерения оптической плотности при определенной длине волны.

Интенсивность пучка света, проходящего через пробу, уменьшается за счет рассеивания (нефелометрия) или поглощения света (турбидиметрия). Светорассеяние и светопоглощение зависят не только от количества клеток в суспензии, но также от их размеров и формы.

Для более концентрированных взвесей обычно применяют турбидиметрический метод. Для очень разбавленных суспензий используют метод нефелометрии вследствие его большей чувствительности. Действие нефелометра основано на сравнении интенсивности света, рассеянного испытуемой средой, с интенсивностью рассеяния эталона.

При испытании пробу ярко освещают, а затем измеряют интенсивность прошедшего излучения или излучения, рассеянного под определенным углом. Для определения количества клеток в среде используют калибровочный график, отображающий зависимость между величиной светорассеяния и числом клеток в единице объема взвеси. Для построения калибровочного графика измеряют величину светорассеяния в ряде проб с известным содержанием клеток. Калибровочные графики индивидуальны для каждого микроорганизма.

Для измерения оптической плотности взвесей микроорганизмов

возможно использование автоматических систем-анализаторов.

Визуальный метод

Для определения концентрации микроорганизмов может быть использован метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой взвеси со стандартным образцом мутности.

Визуальные методы оптической стандартизации микробных взвесей основаны на принципе установления равенства показателей мутности двух сред – исследуемой взвеси и стандартного образца мутности. Для этого исследуемую взвесь и стандартный образец сравнивают между собой в проходящем или отраженном свете с помощью специальной сравнительной таблицы. Если при одинаковом освещении видимость просвечивающихся через пробирки с исследуемой взвесью и стандартным образцом линий элементов сравнительной таблицы одинакова, то считают, что мутность исследуемой взвеси равна мутности стандартного образца. Зная показатель мутности стандартного образца и его числовой микробный эквивалент, рассчитывают концентрацию микробных клеток в исследуемой взвеси.

Международный стандартный образец мутности Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)

Международный стандартный образец мутности ВОЗ (International Reference Preparation of Opacity (IRP), World Health Organization), равный 10 ME мутности (международным единицам мутности) – это утвержденный ВОЗ первичный эталон мутности для стандартизации бактериальных взвесей визуальным методом, который выпускается под эгидой ВОЗ (International Laboratory for Biological Standard, National Institute for Biological Standards and Control, London, England).

Стандартный образец мутности

Стандартные образцы мутности (СО мутности), равные 10 ME, 5 ME и 20 ME мутности соответственно, предназначены для стандартизации бактериальных взвесей визуальным методом и обеспечения единства определения концентрации микробных клеток в бактериальных взвесах при

микробиологических исследованиях. СО мутности аттестованы с использованием 5-го Международного стандартного образца мутности ВОЗ (№76/522), одна международная единица которого соответствует мутности взвеси коклюшных бактерий, содержащей $1,1 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл.

Мутность экземпляра СО, равная 10 МЕ, ориентировочно соответствует следующим концентрациям других микробных клеток в 1 мл (коэффициент k):

$11 \cdot 10^9$ клеток/мл для бактерий коклюшной группы;

$0,93 \cdot 10^9$ клеток/мл для бактерий кишечной группы;

$1,7 \cdot 10^9$ клеток/мл для бруцеллезных бактерий;

$2,2 \cdot 10^9$ клеток/мл для холерного вибриона;

$5,0 \cdot 10^9$ клеток/мл для туляремиальных бактерий (франциселл).

Для экземпляра СО 5 МЕ концентрация микробных клеток в 2 раза меньше, чем для СО 10 МЕ.

Для экземпляра СО 20 МЕ концентрация микробных клеток в 2 раза больше, чем для СО 10 МЕ.

В случае, если исследуемый микроорганизм не указан в тексте выше, допускается использование значения концентрации для микроба, наиболее близкого по размеру к исследуемому.

Определение общей концентрации (ОК) микробных клеток с использованием СО мутности. Исходную взвесь микроорганизмов разводят стерильным 0,9% раствором натрия хлорида до тех пор, пока ее мутность не будет равна мутности стандартного образца, что определяют в соответствии с инструкцией по применению СО мутности по специальной сравнительной таблице.

Исследуемую микробную взвесь перемешивают встряхиванием или пипетированием в стерильной емкости до гомогенного состояния и переносят в пробирку, входящую в комплект с СО мутности, в объеме 6-7 мл, что соответствует объему жидкости в пробирке с СО. Для проведения

испытания с использованием СО работают только с пробирками, поставляемыми в комплекте с СО мутности.

Перед началом измерения стандартный образец встряхивают в течение 10–15 секунд до полного исчезновения осадка. Если после встряхивания в пробирке с СО мутности остается видимый глазом осадок, экземпляр изымают из обращения.

Совмещают пробирки с СО мутности и исследуемой взвесью микроорганизмов в вертикальном положении на уровне глаз, плотно прикладывают пробирки к сравнительной таблице и освещают источником рассеянного света таким образом, чтобы пробирки не экранировали друг друга от источника света. Источником света могут служить: люминесцентная лампа мощностью от 20 до 40 Вт, лампа накаливания матовая или с матовым фильтром (плафоном) мощностью от 40 до 60 Вт, рассеянный дневной свет. Проводить испытания при прямом солнечном свете не допускается. В случае одинаковой четкости просматриваемых элементов сравнительной таблицы через пробирку с СО и пробирку с исследуемой микробной взвесью, мутность их считают одинаковой и равной мутности, указанной на этикетке СО.

Погрешность визуального определения мутности с помощью СО мутности составляет около 10 %.

Не допускается оставлять экземпляры СО мутности под действием бактерицидного облучателя, а также замораживание.

Расчет ОК микробных клеток проводят по формуле:

$$OK = \frac{V_0 + V_i}{V_0} \cdot k,$$

где: V_0 – объем исходной взвеси, мл;

V_i – объем стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида, использованного для разведения исходной взвеси, мл;

k – коэффициент: концентрация исследуемых микробных клеток в мл, соответствующая 10 МЕ, КОЕ/мл.

Пример определения общей концентрации (ОК) микробных клеток в вакцине туляреминой живой сухой

Определение проводят, используя не менее чем три образца.

К 0,5 мл ресуспендированной вакцины ($V_0 = 0,5$ мл) прибавляют порциями стерильный 0,9% раствор натрия хлорида для доведения исследуемой взвеси до мутности, соответствующей 10 МЕ ($V_i = 1,0+0,2+0,3 = 1,5$ мл). Концентрация туляреминых бактерий во взвеси (коэффициент k), соответствующей 10 МЕ, составляет $5,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

$$OK = \frac{0,5 + 1,5}{0,5} \cdot 5,0 \cdot 10^9 = 2,0 \cdot 10^{10} \text{ КОЕ/мл.}$$

Итоговое значение общей концентрации микробных клеток рассчитывают как среднее арифметическое значений ОК по трем образцам.

Стандарт мутности Мак-Фарланда (McFarland)

Другим примером стандартизации по стандарту мутности микробной взвеси является использование стандарта Мак-Фарланда (McF). Согласно инструкции по применению, изготавливают 1 % растворы бария хлорида и серной кислоты. Для приготовления стандарта мутности и взвеси микроорганизмов, подлежащей исследованию, подбирают пробирки одного диаметра. В пробирки изготавливаемого стандарта разливают 1 % раствор серной кислоты в объеме, указанном в табл. 1 и добавляют 1 % раствор бария хлорида для получения общего объема 10 мл. Пробирки с изготовленным стандартом герметично закрывают. Жидкость в стандарте Мак-Фарланда и исследуемой пробирке должна быть гомогенно мутной.

Внимание! Бария хлорид и серная кислота – ядовитые вещества.

Количественную характеристику исследуемой микробной взвеси определяют сравнением с ближайшими по мутности пробирками тем же способом, как при использовании СО мутности с учетом данных, приведенных в табл. 1. Методика не предназначена для определения общей концентрации микробных клеток в бактериальных взвесях при производстве и контроле иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП).

Таблица 1 - Количественная оценка бактериальных взвесей по шкале Мак-Фарланда

Номер по шкале Мак-Фарланда	Объем, мл		Приблизительное количество КОЕ/мл	Соответствующая микробная взвесь, КОЕ/мл
	1% H_2SO_4	1% $BaCl_2$		
0,5	9,95	0,05	$1 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
1	9,9	0,1	$3 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$
2	9,8	0,2	$6 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8$
3	9,7	0,3	$9 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^8$
4	9,6	0,4	$12 \cdot 10^8$	$12 \cdot 10^8$
5	9,5	0,5	$15 \cdot 10^8$	$15 \cdot 10^8$
6	9,4	0,6	$18 \cdot 10^8$	$18 \cdot 10^8$
7	9,3	0,7	$21 \cdot 10^8$	$21 \cdot 10^8$
8	9,2	0,8	$24 \cdot 10^8$	$24 \cdot 10^8$
9	9,1	0,9	$27 \cdot 10^8$	$27 \cdot 10^8$
10	9,0	1,0	$30 \cdot 10^8$	$30 \cdot 10^8$

Кондуктометрические методы

Кондуктометрические методы основаны на зависимости сопротивления или проводимости среды от концентрации клеток. При росте и размножении в соответствующей жидкой питательной среде микроорганизмы продуцируют высокозаряженные ионные метаболиты, что приводит к изменению электрохимических свойств питательной среды. Эти изменения полного сопротивления, измеряемые проводимостью или емкостным сопротивлением, регистрируются электродами, находящимися в контакте с культуральной средой. Время определения обратно пропорционально концентрации микробных клеток в суспензии. Для дрожжевых и плесневых грибов, которые вызывают только незначительные изменения электропроводности, обычно применяют косвенные методы измерения

проводимости с использованием источника калия гидроксида, однако прямые измерения также могут быть применены.

Одним из таких методов является подсчет числа клеток в электронном счетчике Култера. Суспендированные в электролите клетки проходят через апертуру малого диаметра, расположенную между двумя электродами. Когда клетки проходят через апертуру («электрочувствительную зону»), каждая из них вытесняет определенное количество электролита, вызывая возрастание сопротивления. В результате происходит небольшое изменение величины электрического тока в усилителе, который преобразует колебания силы тока в импульсы напряжения, которые находятся в прямой зависимости от размера прошедшей через апертуру клетки.

К преимуществам данного метода относится возможность подсчета общего количества клеток и распределения клеток популяции по размерам.

Методы определения жизнеспособных клеток микроорганизмов

Метод мембранной фильтрации

С помощью мембранной фильтрации может быть определено как общее количество клеток, так и количество жизнеспособных микроорганизмов. В последнем случае после проведения фильтрации мембранный фильтр помещают на соответствующую плотную питательную среду. После инкубации в адекватных для исследуемого микроорганизма условиях подсчитывают видимые колонии. Метод мембранной фильтрации аналогичен методу подсчета клеток на чашках, но является более чувствительным, поскольку через фильтр можно пропускать большие объемы исследуемого материала.

Метод посева на питательные среды (чашечный метод)

Сущность метода заключается в посеве определенного объема из серии десятикратных разведений суспензии исследуемых микроорганизмов на плотную питательную среду, инкубации и подсчете образовавшихся колоний, учитывая, что каждая колония – результат размножения одной жизнеспособной клетки микроорганизма.

Посев осуществляют одним из чашечных методов, указанных в разделе «Микробиологическая чистота», а именно: глубинным, поверхностным, двуслойным или модифицированным агаровым методом. При этом из каждого разведения производят посев на набор чашек с плотной питательной средой (так называемый, метод параллельных высевов).

При учете результатов определяют среднее количество колоний, выросших при посеве каждого разведения. Для получения достоверных результатов отбирают чашки, где число колоний бактерий находится в пределах от 30 до 300, а колоний грибов – от 10 до 100.

Если чашки из двух последовательных разведений попадают в эту область, количество колониобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл рассчитывают как их среднее значение.

Рассчитывают среднее количество КОЕ (N) в 1 мл по формуле:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

где: c – сумма подсчитанных колоний на всех чашках;

n_1 – количество чашек первого разведения;

n_2 – количество чашек второго разведения;

d – коэффициент первого разведения;

0,1 – коэффициент, учитывающий кратность первого и второго разведения.

Пример: В двух последовательных разведениях 10^{-6} и 10^{-7} были получены результаты: 168; 215 и 14; 25 колоний соответственно.

Количество микроорганизмов в исходной суспензии равно:

$$N = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-6}} = 1,9 \cdot 10^8 \text{ КОЕ/мл.}$$

Окраска селективными красителями

Данное исследование основано на витальном (или прижизненном) окрашивании микроорганизмов, что позволяет различать живые и погибшие

клетки (живые клетки не окрашиваются, мертвые или поврежденные клетки окрашиваются). Наиболее часто используемые красители – трипановый синий, эритрозин В или нигрозин. Оптимальное значение рН 7,5. Концентрация красителя и время окрашивания валидируются.

Окрашивание клеточной суспензии, например раствором трипанового синего проводят, осторожно смешивая краситель с суспензией микробных клеток. Выдерживают в течение 2 мин. при комнатной температуре. Далее перемешивают и помещают в счетную камеру. Подсчет проводят незамедлительно. Необходимо, чтобы время контакта клеток с красителем при окрашивании составляло не более 4 мин., так как увеличение времени экспозиции с красителем значительно увеличивает количество окрашенных клеток.

Процентное содержание жизнеспособных клеток (X) определяют как отношение числа неокрашенных (живых) клеток к общему числу клеток под оптическим микроскопом. При этом учитывают как все неокрашенные (живые), так и все окрашенные (мертвые) клетки. Жизнеспособность (X) в процентах (%) определяется по формуле:

$$X = \frac{n}{N} \cdot 100;$$

где: n – число неокрашенных жизнеспособных клеток,

N – общее число клеток.