

2.1.11.20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы определения концентрации клеток микроорганизмов в лекарственных препаратах и промежуточных продуктах, содержащих микроорганизмы в качестве активной фармацевтической субстанции, а также в суспензиях (взвесьях) тест-штаммов микроорганизмов, используемых в биологических испытаниях, требующих подсчёта клеток микроорганизмов.

Концентрация клеток микроорганизмов может быть выражена как число клеток (включая нежизнеспособные и поврежденные) на единицу объема суспензии; содержание жизнеспособных клеток устанавливают по числу колоний (колониобразующих единиц, КОЕ) на единицу объема суспензии.

Для определения концентрации клеток микроорганизмов используют методы прямого (в счётной камере, на мембранных фильтрах) и непрямого (визуальный, турбидиметрия, нефелометрия, кондуктометрия) определения, которые могут быть выполнены вручную или с использованием автоматических устройств. Могут быть использованы другие подходящие методы.

МЕТОДЫ ПРЯМОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Методы прямого определения позволяют наиболее точно определить общее количество микроорганизмов, определить размеры и морфологию исследуемых клеток, а также, при использовании подходящих красителей для дифференцировки живых и нежизнеспособных клеток, определить количество жизнеспособных клеток.

ПОДСЧЁТ КЛЕТОК В СЧЁТНОЙ КАМЕРЕ

Прямое определение количества клеток микроорганизмов проводят подсчётом под микроскопом с использованием гемоцитометра (*Номер. Определение количества и жизнеспособности эукариотических клеток*).

Например, при использовании камеры гемоцитометра с сеткой из 225 больших квадратов (15 рядов по 15 больших квадратов в каждом, 25 из них разделены на 16 маленьких квадратов) (камеры Горяева) подсчитывают количество клеток в 5 горизонтальных и 15 диагональных больших квадратах, учитывая все клетки, лежащие в квадрате сетки, а также пересекающие верхнюю и правую стороны квадрата. Для подсчёта неокрашенных бактериальных клеток используют фазово-контрастный микроскоп.

Рассчитывают концентрацию клеток в 1 мл испытуемой суспензии по формуле:

$$\frac{a}{20} \times N \times n \times d = \frac{a \times 225 \times 1111}{20} \times d = a \times 12499 \times d,$$

- где a — число клеток в 20 квадратах;
 d — коэффициент разведения исходной суспензии микроорганизма;
 N — число больших квадратов в камере ($N = 225$);
 n — коэффициент, равный величине, обратной объёму камеры ($k = \frac{1}{v} = \frac{1}{0,0009} = 1111$).

ПОДСЧЁТ КЛЕТОК НА МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРАХ

Метод рекомендуется использовать для определения количества микроорганизмов в суспензиях с низкой концентрацией клеток.

Определенный объём испытуемой суспензии фильтруют через мембранный фильтр с нанесенной сеткой. Допускается использовать фильтры размером пор 0,22 мкм или 0,45 мкм. После фильтрации микроорганизмы на фильтре окрашивают подходящим красителем и подсчитывают в 20 полях зрения с помощью микроскопа, оснащенного окулярным микрометром.

Рассчитывают концентрацию клеток в 1 мл испытуемой суспензии по формуле:

$$\frac{S \times N \times 10^6}{s \times V},$$

- где S — площадь фильтрующей поверхности, в миллиметрах квадратных;
 s — площадь квадрата окулярного микрометра, в микрометрах квадратных;
 N — среднее количество клеток в одном квадрате окулярного микрометра;
 V — объём профильтрованной жидкости, в миллилитрах;
 10^6 — коэффициент пересчёта миллиметров квадратных в микрометры квадратные

При подсчёте клеток на мембранных фильтрах с помощью люминесцентного микроскопа используют нелюминесцирующие фильтры. После осаждения на их поверхности клеток проводят флюорохромирование подходящим красителем и подсчитывают. Метод позволяет подсчитать общее количество микроорганизмов и определить среди них количество жизнеспособных клеток, так как, например, при окрашивании акридиновыми красителями жизнеспособные клетки имеют зеленую, а нежизнеспособные — красную окраску.

МЕТОДЫ НЕПРЯМОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Рост микроорганизмов в питательной среде обычно приводит к изменению ее мутности. Мутность суспензий микроорганизмов является оптическим эквивалентом концентрации содержащихся в них клеток и зависит как от свойств (размер, показатель преломления), так и от количества микроорганизмов в единице объёма.

ВИЗУАЛЬНЫЙ МЕТОД

Визуальный метод определения концентрации клеток микроорганизмов в суспензиях основан на сравнении показателей мутности испытуемой суспензии и стандартного образца мутности или стандарта мутности бария сульфата. Для этого исследуемую суспензию и стандартный образец мутности или стандарт мутности бария сульфата сравнивают между собой путем просматривания в проходящем или отраженном свете перпендикулярно оси пробирки на фоне специальной сравнительной таблицы. Если при одинаковом освещении видимость линий элементов на сравнительной таблице, просвечивающихся через пробирки с испытуемой суспензией и стандартным образцом мутности или стандартом мутности бария сульфата, одинакова, то считают, что мутность испытуемой суспензии соответствует мутности стандартного образца мутности или стандарта мутности бария сульфата. Показатель мутности стандартного образца мутности или стандарта мутности бария сульфата эквивалентен концентрации микроорганизмов в испытуемой суспензии.

Определение общей концентрации клеток микроорганизмов с использованием стандартного образца мутности.

За международную единицу мутности, устанавливаемую Всемирной организацией здравоохранения, принимают мутность суспензии коклюшных бактерий, содержащей $1,1 \times 10^9$ клеток в 1 мл.

В качестве стандартного образца мутности может быть использован *СО ФЕАЭС мутности бактериальных взвесей*, мутность которого установлена относительно Международного стандартного образца мутности. Эквивалентность мутности *СО ФЕАЭС мутности бактериальных взвесей* концентрациям коклюшных бактерий, бактерий кишечной группы, микроорганизмов рода бруцелл, холерного вибриона, возбудителей туляремии, чумы, сибирской язвы указана в инструкции по применению.

В случае, если испытуемый образец содержит микроорганизм, не указанный в инструкции по применению *СО ФЕАЭС мутности бактериальных взвесей*, допустимо использование значения концентрации для микроорганизма, наиболее близкого по размеру.

Для приготовления испытуемой суспензии микроорганизмов, используют пробирку, входящую в комплект со стандартным образцом мутности. Испытуемую суспензию разводят стерильным раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* до момента соответствия мутности испытуемой суспензии и мутности стандартного образца на фоне специальной сравнительной таблицы.

Рассчитывают концентрацию клеток в 1 мл испытуемой суспензии по формуле:

$$\frac{V_0 + V_i}{V_0} \times k,$$

где V_0 – объём исходной суспензии, в миллилитрах;

V_i – объём стерильного раствора 9 г/л натрия хлорида P , использованного для разведения исходной суспензии, в миллилитрах;

k – концентрация исследуемых клеток микроорганизма, соответствующая аттестованному значению стандартного образца мутности, клеток в миллилитре.

Определение общей концентрации клеток микроорганизмов с помощью стандарта мутности бария сульфата.

Методика не применима для вакцин и анатоксинов.

Стандарт мутности бария сульфата представляет собой мелкодисперсную суспензию бария сульфата, степень мутности которой установлена относительно взвеси *E. coli*: стандарт мутности 0,5 соответствует концентрации суспензии *E. coli* $1,5 \times 10^8$ клеток/мл.

Стандарт мутности бария сульфата. Смешивают раствор 11,7 г/л бария хлорида P с 1 % (об/об) раствором серной кислоты P в объёмах в соответствии с номером стандарта (таблица номер-1). Поглощение (оптическая плотность) стандарта мутности бария сульфата 0,5 при длине волны 625 нм по сравнению с водой в качестве компенсационной жидкости должно составлять от 0,08 до 0,13 (2.1.2.24.). Полученный раствор хранят не более 3 месяцев.

Могут быть использованы коммерчески доступные наборы стандартов мутности бария сульфата.

Таблица номер – 1. Количественная характеристика стандарта мутности бария сульфата

Номер стандарта мутности бария сульфата	Объём (мл)		Концентрация клеток <i>E. coli</i> , $\times 10^8$ (клеток/мл)
	1 % (об/об) раствор серной кислоты P	раствор 11,7 г/л бария хлорида P	
0,5	9,95	0,05	1,5
1	9,9	0,1	3
2	9,8	0,2	6
3	9,7	0,3	9
4	9,6	0,4	12
5	9,5	0,5	15

6	9,4	0,6	18
7	9,3	0,7	21
8	9,2	0,8	24
9	9,1	0,9	27
10	9,0	1,0	30

Для испытуемой суспензии микроорганизмов подбирают пробирки того же диаметра, что и для приготовления стандарта мутности бария сульфата. Содержимое пробирок со стандартом мутности бария сульфата и испытуемой суспензии микроорганизмов должны быть гомогенно мутными. Мутность испытуемой суспензии микроорганизмов сравнивают со стандартом мутности бария сульфата и определяют концентрацию микроорганизмов по таблице номер-1.

ТУРБИДИМЕТРИЯ И НЕФЕЛОМЕТРИЯ

Мутность суспензии микроорганизмов может быть определена путем измерения проходящего через образец (турбидиметрия) или рассеиваемого образцом (нефелометрия) света. Светорассеяние и светопоглощение зависят как от количества клеток в суспензии, так от их размеров и формы. Для концентрированных суспензий обычно применяют турбидиметрический метод, а для разбавленных - метод нефелометрии вследствие его большей чувствительности. Принцип нефелометрического и турбидиметрического методов описан в общей фармакопейной статье *2.1.2.1. Прозрачность и степень опалесценции жидкостей*.

Испытуемую суспензию микроорганизмов помещают в пучок проходящего света и измеряют интенсивность прошедшего излучения или излучения, рассеянного под определенным углом. Для определения количества клеток используют калибровочный график зависимости величины светорассеяния или светопоглощения от числа клеток в единице объема суспензии. Для построения калибровочного графика измеряют величину светорассеяния или светопоглощения в ряде проб с известным содержанием клеток. Калибровочные графики индивидуальны для каждого микроорганизма.

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. Изменения полного сопротивления, выраженные в единицах

проводимости или емкостного сопротивления, регистрируются электродами, находящимися в контакте с питательной средой. 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 электронных счетчиках, основанных на измерении проводимости (например, счетчика Култера). Суспендированные в электролите клетки проходят через апертуру («электрочувствительную зону») малого диаметра, расположенную между двумя электродами, вытесняя 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 клетки, прошедшей через апертуру. К преимуществам данного метода относится возможность подсчета общего количества клеток и распределения клеток популяции по размерам.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

МЕТОД ПОСЕВА НА ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Сущность метода заключается в посеве определенного объема из серии разведений суспензии исследуемых микроорганизмов на питательную среду, инкубации и подсчете образовавшихся колоний.

Посев осуществляют с использованием соответствующей питательной среды, например, одним из чашечных агаровых методов: глубинным, поверхностным, двухслойным или модифицированным глубинным (2.1.6.6. *Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество жизнеспособных аэробных микроорганизмов*). При этом из каждого разведения производят посев на набор чашек с плотной питательной средой. Определяют среднее количество колоний, выросших при посеве каждого разведения. Для получения достоверных результатов подсчет ведут в чашках, где число колоний бактерий находится в пределах от 10 до 250, а колоний грибов – от 10 до 50.

Если количество колоний соответствует указанному диапазону в чашках из двух последовательных разведений, то концентрацию жизнеспособных клеток в 1 мл рассчитывают с учётом среднего количества колоний микроорганизмов на чашках каждого из этих разведений по формуле:

$$\frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times v} \times d,$$

- где $\sum c$ — количество колоний на всех чашках двух разведений;
 n_1 — количество чашек первого разведения;
 n_2 — количество чашек второго разведения;
 d — коэффициент первого разведения;
 v — объём образца, высеваемый на чашку, в миллилитрах;
 $0,1$ — коэффициент, учитывающий кратность первого и второго разведения.

В случае подсчёта колоний в чашках одного разведения концентрацию жизнеспособных клеток в 1 мл рассчитывают по формуле:

$$\frac{\sum c}{n \times v} \times d,$$

- где $\sum c$ — количество колоний на всех чашках разведения;
 n — количество чашек;
 d — коэффициент разведения испытуемого образца;
 v — объём образца, высеваемый на чашку, в миллилитрах.

МЕТОД МЕМБРАННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Общее количество клеток жизнеспособных микроорганизмов можно определить методом мембранной фильтрации (2.1.6.6. *Микробиологические испытания нестерильных лекарственных средств: общее количество жизнеспособных аэробных микроорганизмов*). После проведения фильтрации мембранный фильтр помещают на соответствующую плотную питательную среду. После инкубации в подходящих для исследуемого микроорганизма условиях подсчитывают видимые колонии.