

ГЛАВА

8

СТАНДАРТ СРАВНЕНИЯ (МУТНОСТИ). ПРИГОТОВЛЕНИЕ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Вопрос о стандарте сравнения, который используют при приготовлении микробной взвеси (его обычно называют стандартом мутности), логично рассматривать в рамках раздела об инокулюме. Однако, отечественная практика заставляет обратить на него особое внимание. Для определения чувствительности микроба к антибиотикам величина т. н. посевного материала, который используют для нанесения на поверхность агара или вносят в жидкую питательную среду, имеет первостепенное значение. Без строгой стандартизации инокулюма невозможна стандартизация всего аналитического исследования в целом. Вместе с тем, некоторые микробиологические лаборатории целиком ориентируются на готовые стандарты мутности, которые используют многие и многие годы без контроля их качества. Последнее недопустимо. Сам по себе стандарт мутности, поставляемый учреждением, имеющим и формальное право это делать, и обеспечивающее надлежащее качество продукта, не может вызвать возражений. Но бесконтрольное использование стандарта, тем более длительный промежуток времени, чревато ошибками при приготовлении микробной взвеси, а следовательно и ошибками при тестировании чувствительности. В ряде стран мира предпочитают использовать свежеприготовленную стандартную взвесь хлорида бария или коммерческую взвесь, плотность которой обязательно проверяют с использованием нефелометрии. По имени автора эта контрольная взвесь с использованием $BaCl_2$ получила название стандарта McFarland. В зависимости от разведения, плотность взвеси хлорида бария близка к плотности микробной взвеси с определенным содержанием клеток микроорганизма. Примечательно, что J. McFarland разработал и внедрил свои стандарты еще в 1907 г. и с тех пор их используют в микробиологической практике. Для определения чувствительности обычно приемлем стандарт McFarland 0,5. Фактически их 11 (с отличающейся плотностью, от наименьшей до наибольшей), хотя на практике, как правило, используют только первые 4–5 стандартов мутности. Заметим также,

что в последние годы делаются попытки, причем небезуспешные, заменить хлорид бария на иные вещества, образующие взвесь. В частности, используют латекс. Уже есть коммерческие варианты стандарта мутности с латексом (латекс — природные или синтетические полимеры разной молекулярной массы, образующие в зависимости от количества частиц взвесь различной оптической плотности). Тем не менее, классический вариант стандартов McFarlanda с хлоридом бария пока остается доминирующим.

Приготовление стандартов McFarland нельзя назвать сложной процедурой. Оно вполне доступно микробиологической службе клинических учреждений. Остановимся на том его варианте, который используют для приготовления инокулюма при определении чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, т. е. стандарта 0,5, адекватного микробной взвеси, содержащей 150 000 000 КОЕ/мл ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Порядок действий можно представить себе следующим образом.

1. Приготовление 1%-ного раствора серной кислоты. В цилиндр или мерный флакон на 100 мл жидкости вливают 90 мл деионизированной воды. Мерной пипеткой вносят туда же 1 мл концентрированной серной кислоты. Доливают деионизированную воду до 100 мл и раствор готов. Внимание: следует помнить, что концентрированная серная кислота — агрессивная жидкость, следует соблюдать все необходимые меры предосторожности.
2. Приготовление 1,175% раствора BaCl_2 . Делают навеску хлорида бария ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) — 1,175 г. Можно взять большую или меньшую навеску, но тогда следует пересчитать объем воды, в котором вещество будет растворено. Навеску целесообразно делать в калиброванном флаконе объемом на 100 мл жидкости. Во флакон с BaCl_2 добавляют 50 мл деионизированной воды и, перемешивая, доводят соль до полного растворения; доливают объем воды до 100 мл. Раствор хлорида бария готов.

Оба раствора, серной кислоты и BaCl_2 , это два базовых компонента для приготовления стандарта мутности (причем любой плотности, не только стандарта 0,5); они предназначены для повторного использования в течение года при условии, если растворы будут храниться при комнатной температуре (около 25 °С), в стеклянной, хорошо укупоренной посуде с притертой пробкой,

материала или качественного латекса. Заливают пробку сургучом или парафином.

7. Полученный стандартный образец может храниться до 12 месяцев, периодически, не реже 1 раза в три месяца проходя контроль качества. (Отечественные МУ требуют ежемесячного контроля качества стандарта). Хранить стандарт можно при комнатной температуре в затемненном месте.
8. Контроль качества полученной смеси растворов в процессе приготовления стандарта мутности.

8.1. Визуальный осмотр позволяет оценить гомогенность взвеси, отсутствие включений. Далее следует убедиться в том, что степень мутности адекватна ожидаемой мутности взвеси микробных клеток $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Простой и привычный для микробиолога способ контроля, это приготовить, ориентируясь на предполагаемый стандарт, взвесь *E. coli* аналогичной плотности и сделать высев на плотную питательную среду с учетом через 16–18 ч инкубации числа колоний. Метод информативен, но требует определенных трудозатрат и много времени в ожидании результата — почти сутки. Если стандарт качественный, то при определенном разведении может быть получен рост изолированных колоний в том или ином количестве (таблица 8.2). Важно соблюдать несколько очевидных для микробиолога правил.

- 1) Среда, предназначенная для посева, должна обеспечить полноценный рост микроба. Можно использовать, в частности, мясо-пептонный агар с добавлением 5% бараньей или лошадиной крови.
- 2) Для приготовления микробной взвеси целесообразно использовать культуру (референс-штамм) с хорошо известными свойствами. В частности, это может быть *E. coli* ATCC 25922, но не исключается и другая кишечная палочка, рост которой хорошо знаком исследователю.
- 3) Посев, — 0,1 мл взвеси, приготовленный с использованием нового стандарта, тщательно шпателем распределить по поверхности агара.
- 4) Посевы следует делать в 2–3 повторях (параллельных).
- 5) При учете результата считать, что наличие более 300 колоний на поверхности среды в чашке Петри диаметром 90–100 мм исключает точность исследования (не дает истинной величины).

**Микробиологический контроль инокулюма,
приготовленного по стандарту McFarland 0,5
(около $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл)**

Разведение	Объем взвеси для посева (мл)	Количество колоний на поверхности среды (КОЕ)	Примечание
1: 19 (10^{-1})	0,1	> 1000	Посев не обязателен
1: 100 (10^{-2})	0,1	> 1000	Посев не обязателен
1: 1000 (10^{-3})	0,1	> 1000	Посев не обязателен
1: 10000 (10^{-4})	0,1	> 1000	Посев не обязателен
1: 100000 (10^{-5})	0,1	> 1000	Посев
1: 1000000 (10^{-6})	0,1	около 150	Посев
1: 10000000 (10^{-7})	0,1	около 15	Посев

Существуют определенные разночтения в том, какое количество колоний является приближенным к искомой величине, позволяющей судить о качестве стандарта. Есть достаточно высокие требования, предполагающие, что допустимы колебания в пределах 10% от искомого числа колоний. Однако, и контрольные эксперименты, и реальная практика позволяют считать, что при разведении 10^{-6} рост от 100 до 200 колоний делает возможным использовать стандарт с достаточной степенью надежности. Впрочем, повторные исследования, обычно, дают возможность при усреднении существенно сократить разброс полученных данных по отношению к искомой величине.

Микробиологический контроль стандарта мутности, при всей его несомненной ценности, в силу хорошо знакомой микробиологам специфики микробного роста всегда чреват вероятностью существенного разброса числа колоний при посеве казалось бы одинакового объема микробной взвеси. Поэтому рекомендуют использовать не только этот метод контроля (а по мнению некоторых его просто не целесообразно использовать), а нефелометрически устанавливать плотность биомассы в стандартном образце, измерять светопропускание взвеси хлорида бария с применением соответствующих устройств. Для этих целей существует ряд моделей приборов с самыми разными возможностями и спектром исследований: нефелометры, нефелометры-колориметры, спектрофото-