

Научная статья
УДК 57.086

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ СЧЁТНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛЕТОК В ЖИДКОСТИ

Елена Валериевна Кулябина^{1✉}, Ольга Николаевна Мелкова²,
Татьяна Валериевна Кулябина³, Мария Вячеславовна Дорман⁴,
Федор Владиленович Булыгин⁵, Александр Анатольевич Кирилук⁶,
Валерия Витальевна Морозова⁷, Виталий Юрьевич Морозов⁸

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} ФБУ «Научно-исследовательский центр прикладной метрологии —
Ростест», Москва, Россия

¹ ElenaVK@rostest.ru, kuliabina@mail.ru✉, SPIN-код: 7317-3410,
ORCID: 0000-0002-6076-4569, Scopus ID: 56078986100, WoS Researcher ID: C-5857-2019

² OlgaNM@rostest.ru, ORCID: 0000-0003-0580-1352

³ TatyanaVK@rostest.ru, SPIN-код: 8961-8491, ORCID: 0000-0003-3923-5571

⁴ MariyaVD@rostest.ru

⁵ FedorVB@rostest.ru, ORCID: 0000-0002-5026-9361

⁶ AleksandrAK@rostest.ru

⁷ Калифорнийский государственный университет, Лос-Анджелес, Калифорния, США
lerapuri@gmail.com, ORCID: 0000-0003-1251-5872, WoS Researcher ID: HJY-3009-2023

⁸ Независимый эксперт, Москва, Россия
rexttd@mail.ru, ORCID: 0009-0009-8728-1039

Аннотация. Статья посвящена разработке методики измерений счётной концентрации клеток в жидкости, предназначенной для определения количества живых микроорганизмов, таких как бактерии *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus*, *Enterococcus*, бактерии группы кишечных палочек (колиформы), бактерии *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* в жидкости. В методике реализованы два основных метода измерений — метод мерного посева на чашке Петри и метод прямого подсчёта с использованием инвертированного люминесцентного микроскопа. Описаны условия и операции, обеспечивающие точность измерений, область применения методики, новые подходы, позволившие разработать методику с наилучшими на сегодняшний день значениями точности измерений указанными методами.

Установленный диапазон измерений счётной концентрации клеток варьируется от 1 до $1 \cdot 10^5$ 1/см³, что позволяет применять методику к различным образцам, включая как сильно разбавленные, так и концентрированные растворы.

В области применения методики входят здравоохранение, ветеринария, пищевая промышленность, что делает методику важным инструментом для контроля качества проводимых лабораторных анализов и оценки безопасности продуктов питания. Разработанная методика может служить основой для создания стандартных образцов счётной концентрации клеток, что будет способствовать стандартизации процессов измерений и повышению доверия к результатам анализов со стороны потребителей и регуляторных органов.

© Кулябина Е.В., Мелкова О.Н., Кулябина Т.В., Дорман М.В., Булыгин Ф.В., Кирилук А.А., Морозова В.В., Морозов В.Ю., 2026

Статья вносит значимый вклад в развитие методов измерений в области микробиологии и может быть полезна как для научных исследований, так и для практического применения в различных отраслях.

Ключевые слова: методика измерений счётной концентрации клеток в жидкости, метод мерного посева, метод прямого подсчёта с применением инвертированного люминесцентного микроскопа

Для цитирования: Кулябина Е.В., Мелкова О.Н., Кулябина Т.В., Дорман М.В., Булыгин Ф.В., Кирилюк А.А., Морозова В.В., Морозов В.Ю. Разработка методики измерений счётной концентрации клеток в жидкости // Альманах современной метрологии. 2026. № 2 (46). С. 135–148.

Original article

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR MEASURING CELL NUMBER CONCENTRATION IN LIQUID

**Elena V. Kulyabina¹✉, Olga N. Melkova²,
Tatiana V. Kulyabina³, Maria V. Dorman⁴,
Fedor V. Bulygin⁵, Alexander A. Kirilyuk⁶,
Valeriia V. Morozova⁷, Vitaliy Yu. Morozov⁸**

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} FSBI “Research Center for Applied Metrology — Rostest”, Moscow, Russia

¹ ElenaVK@rostest.ru, kulyabina@mail.ru✉, SPIN-code: 7317-3410,

ORCID: 0000-0002-6076-4569, Scopus ID: 56078986100, WoS Researcher ID: C-5857-2019

² OlgaNM@rostest.ru, ORCID: 0000-0003-0580-1352

³ TatyanaVK@rostest.ru, SPIN-code: 8961-8491, ORCID: 0000-0003-3923-5571

⁴ MariyaVD@rostest.ru

⁵ FedorVB@rostest.ru, ORCID: 0000-0002-5026-9361

⁶ AleksandrAK@rostest.ru

⁷ California State University, Los Angeles, California, USA

lerapuri@gmail.com, ORCID: 0000-0003-1251-5872, WoS Researcher ID: HJY-3009-2023

⁸ Independent expert, Moscow, Russia

rexttd@mail.ru, ORCID: 0009-0009-8728-1039

Abstract. This article is devoted to the development of a measurement procedure of the cell number concentration in liquids. This procedure is intended to determine the number of viable microorganisms, such as *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus*, *Enterococcus*, coliforms, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Bacillus cereus*, in liquids. This methodology implements two main measurement methods: the Petri dish method and direct counting using an inverted fluorescence microscope. It describes the conditions and procedures that ensure measurement accuracy, the scope of the methodology, and the new approaches that enabled the development of a methodology with the best measurement accuracy available for these methods.

Альманах современной метрологии № 2 (46) 2026

The established measurement range for cell number concentration varies from 1 to $1 \cdot 10^5$ 1/cm³, allowing the methodology to be applied to a variety of samples, including both highly diluted and concentrated solutions.

The methodology's application areas include healthcare, veterinary medicine, and the food industry, making it an important tool for quality control of laboratory analyses and food safety assessments. The developed methodology can serve as the basis for the creation of reference materials for cell number concentration, which will facilitate the standardization of measurement processes and increase confidence in the analysis results among consumers and regulatory authorities.

This article makes a significant contribution to the development of measurement methods in microbiology and can be useful for both scientific research and practical applications in various fields.

Keywords: liquid cell counting method, volumetric seeding method, direct counting method using an inverted fluorescence microscope

For citation: Kulyabina E.V., Melkova O.N., Kulyabina T.V., Dorman M.V., Bulygin F.V., Kiri-lyuk A.A., Morozova V.V., Morozov V.Yu. Development of a method for measuring cell number concentration in liquid. *Almanac of Modern Metrology*. 2026; 46 (2): 135–148.

Введение

Измерение счётной концентрации клеток в жидкостях имеет важное значение в различных областях, включая здравоохранение, ветеринарию и пищевую промышленность. Для достижения точных результатов необходимо учитывать санитарно-эпидемиологические требования, а также применять стандартизированные методы.

Измерение счётной концентрации клеток в жидкостях является одной из ключевых задач в области микробиологии и биотехнологии. В условиях современного мира, где здоровье населения и безопасность продуктов питания становятся приоритетными задачами, необходимость в точных и надёжных методах определения количества живых микроорганизмов приобретает особую актуальность. Микроорганизмы, такие как бактерии *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria monocytogenes* и другие, играют важную роль как в нормальной микрофлоре человека и животных, так и в патогенезе различных инфекционных заболеваний. Поэтому точное измерение их счётной концентрации в различных пробах, включая биологические жидкости человека и продукты питания, является необходимым условием для обеспечения здоровья и безопасности.

Существующие методы измерения счётной концентрации клеток, такие как метод мерного высева и метод прямого подсчёта с использованием инвертированного люминесцентного микроскопа, имеют свои преимущества и ограничения. Так, метод мерного высева позволяет получать данные о жизнеспособности микроорганизмов, однако он требует значительных временных

затрат и может быть подвержен ошибкам, связанным с человеческим фактором. В то же время применение современных приборов, таких как инвертированные люминесцентные микроскопы, обеспечивает более высокую точность и скорость измерений, но требует специального оборудования и дополнительной подготовки персонала.

Важность разработки стандартизированных методик измерений также вытекает из необходимости соблюдения санитарно-эпидемиологических норм и требований и международных стандартов качества. В условиях увеличения объёмов международной торговли, особенно в сферах продуктов питания и медицинских услуг, наличие надёжных и воспроизводимых методов измерений становится критически важным для обеспечения их качества и безопасности. Это особенно актуально в свете вспышек инфекционных заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами, которые могут быть обнаружены в пищевых продуктах или биологических образцах¹ [1], [2].

Таким образом, разработка методики измерений счётной концентрации клеток в жидкости, сочетающей в себе высокую точность, воспроизводимость и соответствие международной практике, является важным шагом в области микробиологии. Эта методика не только позволяет улучшить качество контроля в здравоохранении и пищевой промышленности, но и послужит основой для дальнейших исследований в области микробиологии и биотехнологии, способствуя более глубокому пониманию роли микроорганизмов в экосистемах и их влияния на здоровье человека и животных.

Анализ международной практики на сегодняшний день

Точные измерения концентрации клеток необходимы для оценки микробной нагрузки в различных образцах, включая биологические жидкости и продукты питания. В соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения и Европейского Совета контроль за качеством и безопасностью продуктов питания требует применения стандартизированных методов измерений². Например, в исследованиях, связанных с безопас-

¹ WHO: Ebola situation report 7 January 2015 / World Health Organization. URL: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/fec4832b-f7d3-42e5-b780-815022a8811d/content> (дата обращения: 15.12.2025).

² Резолюция, принятая Генеральной Ассамблеей 1 апреля 2016 г. 70/259. Десятилетие действий Организации Объединённых Наций по проблемам питания (2016–2025 гг.) / Организация Объединённых Наций, Генеральная Ассамблея. URL: <https://undocs.org/A/RES/70/259> (дата обращения: 15.12.2025).

Резолюция, принятая Генеральной Ассамблеей 13 декабря 2018 г. 73/132. Здоровье населения мира и внешняя политика: улучшение здоровья населения мира посредством улучшения качества питания / Организация Объединённых Наций, Генеральная Ассамблея. URL: <https://docs.un.org/ru/a/res/73/132> (дата обращения: 15.12.2025).

Пособие по безопасности пищевой продукции. Международная финансовая корпорация (IFC). URL: <https://documents1.worldbank.org/curated/en/532611540488364071/pdf/131339-WP-v1-PUBLIC-Toolkit-RUSSIAN.pdf> (дата обращения: 15.12.2025).

ностью пищевых продуктов, таких как работа по предотвращению вспышек заболеваний, точность измерений является основополагающим фактором [3].

Методики измерений за рубежом разрабатываются в соответствии с международными стандартами, такими как ISO 17025, который определяет требования к компетентности лабораторий. Стандарты обеспечивают высокую степень доверия к результатам измерений, что особенно важно в контексте международной торговли и сертификации продукции. Например, методики, основанные на использовании инвертированных люминесцентных микроскопов и методов молекулярной биологии, активно применяются в лабораториях Европы и США для точного определения концентрации патогенных микроорганизмов [4]–[6].

В здравоохранении точные измерения концентрации клеток имеют критическое значение для диагностики инфекционных заболеваний. Например, в исследованиях, связанных с COVID-19, точное измерение количества вирусных частиц в образцах позволяет оценить степень заражения и эффективность лечения [7]. Разработка и стандартизация методик измерений в этой области способствуют улучшению диагностики и мониторинга инфекционных заболеваний, что подтверждается успешными примерами применения таких методик в клинической практике [8], [9].

В биотехнологии и фармацевтике точные измерения концентрации клеток необходимы для контроля качества производимых биопрепаратов. Например, в производстве вакцин и биологических лекарств контроль за количеством живых клеток в культурах является обязательным требованием для обеспечения безопасности и эффективности продукции [10], [11]. Разработка методик измерений, соответствующих международным стандартам, позволяет производителям уверенно выходить на международные рынки.

Несмотря на достижения в разработках методик измерений, есть и вызовы, связанные с их внедрением. Например, существующая востребованность в высококвалифицированном персонале и специализированном оборудовании должна быть восполнена для реализации точных методов [12]. Преодолению этих препятствий могут способствовать международное сотрудничество и обмен знаниями.

Регламент Комиссии (ЕС) 2073/2005 от 15 ноября 2005 г. о микробиологических показателях для пищевых продуктов. URL: <https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/fsvps-docs/ru/laws/eu/2073-2005.pdf> (дата обращения: 15.12.2025).

ISO 11290-1:2017(en). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.* — Part 1: Detection method. URL: <https://www.iso.org/obp/ui/ru/#iso:std:iso:11290:-1:ed-2:v1:en> (дата обращения: 15.12.2025).

Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) foods: attribution, characterization and monitoring. Meeting report / Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Rome, 2022. URL: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/d635734b-264a-40b0-9304-69085a20ddeb/content> (дата обращения: 15.12.2025).

Статья описывает исследования, связанные с разработкой стандартизированной методики на базе ФБУ «Научно-исследовательский центр прикладной метрологии — Ростест» (далее НИЦ ПМ — Ростест) и ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (далее НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи). Данная методика сочетает в себе два метода — метод мерного высева на чашке Петри и метод прямого подсчёта с использованием инвертированного люминесцентного микроскопа.

Методология

Исследования проводились в обоих институтах в условиях повторяемости и воспроизводимости — были проведены измерения как на одном типе оборудования одним оператором в одно время, так и на разных экземплярах оборудования разными операторами в различное время с применением различных наборов лабораторной посуды. Работы с клетками бактерий, для обращения с которыми необходимо наличие лицензии, так как они являются патогенными биологическими агентами IV или III группы патогенности¹, проводились на территории НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи. Работы с остальными клетками бактерий проводились на территории НИЦ ПМ — Ростест. В работе принимали участие сотрудники лаборатории метрологического обеспечения биологических и информационных технологий НИЦ ПМ — Ростест, получившие дополнительное профессиональное образование для работы с патогенными микроорганизмами, а также сотрудники лаборатории бруцеллеза и природно-очаговых инфекций испытательного центра и лаборатории молекулярной диагностики НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи.

Подсчёт живых клеток методом мерного высева

При выполнении процедур руководствовались требованиями правил СанПиН 3.3686-21.

Перед началом эксперимента необходимо подготовить соответствующую питательную среду и режим культивирования для каждого исследуемого субстрата. В случае небольшого количества живых клеток посев выполняется без разбавления, в противном случае — с разбавлением, чтобы обеспечить возможность подсчёта отдельных колоний.

Посевной материал распределяется стерильным шпателем по поверхности питательной среды. Чашки Петри помещаются в климатическую камеру с контролируемой температурой от +25 до +37 °С в зависимости от вида

¹ Санитарные правила и нормы СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 г. № 4.

микроорганизма. Подсчёт колоний производится через 1–3 суток. Для статистической достоверности рекомендуется проводить измерения не менее чем на трёх чашках с одинаковой концентрацией.

Количество живых микроорганизмов в 1 мл исследуемой жидкости, определяемое методом мерного высева, узнаётся по формуле:

$$C_{\text{мерн.высев } b} = k \cdot D \cdot 10,$$

где b — вид микроорганизма; k — количество колоний, соответствующее количеству исходных клеток в анализируемом образце; D — коэффициент разбавления; 10 — множитель приведения анализируемого объёма к 1 см³.

Подсчёт клеток методом прямого подсчёта с применением инвертированного люминесцентного микроскопа

Перед проведением измерений тщательно перемешивают на встряхивателе исследуемую жидкость (исследуемый образец), дозатором отбирают 1 мм³, наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом размером 18 × 18 мм и толщиной 0,25–0,35 мм и притирают покровное стекло до появления колец Ньютона, которые свидетельствуют о плотном прилегании покровного стекла и отсутствии воздушных пузырьков, затрудняющих подсчёт.

Перед началом измерений калибруют микроскоп с применением меры счётной концентрации. При контроле точности результатов измерений, выполняемых по методике, не реже 1 раза в год применяют также меру счётной концентрации.

Предметное стекло кладут на столик микроскопа и находят в его поле зрения каплю. При реализации данного метода необходимо принимать во внимание неопределённость, вносимую оператором, которая является вкладом в неопределённость, оцениваемую по типу В. Подсчитывают все клетки (в случае калибровки по мере — латексные шарики; в случае измерений клеток микроорганизмов — клетки микроорганизмов), находящиеся внутри капли, в том числе на её границе. При большой концентрации клеток (примерно 100 штук в мм³) фото капли на мониторе микроскопа или в распечатанном виде для удобства подсчёта делят на 4 сегмента. Если клетки пересекаются разделительными линиями пополам, то клетки считают только на двух смежных сторонах сегментов, например на правой и нижней.

Для того чтобы результат подсчёта был достоверен, проводят подсчёт не менее 200 образцов, каждый объёмом 1 мм³, а затем умножают полученную концентрацию на 5 для приведения объёма к 1 см³.

Счётную концентрацию клеток в 1 см³ исследуемого образца (C) методом прямого подсчёта с применением микроскопа определяют по формуле:

$$C_{\text{прям.подсч } b} = \frac{\left(\sum_{i=1}^m x_i \right) \cdot 5}{V},$$

где b — вид микроорганизма; i — номер капли, изменяется от 1 до m (m принимается равным 200); x_i — количество клеток в i -й капле; 5 — множитель для приведения объёма к 1 см^3 ; V — объём жидкости исследуемого образца 1 см^3 .

Результаты

Разработанная в соответствии с ГОСТ Р 8.563-2009¹ методика измерений счётной концентрации клеток в жидкости (номер в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений (ФИФ ОЕИ) ФР.1.31.2025.52059), сочетающая оба метода измерений, продемонстрировала высокую точность и воспроизводимость результатов, что подтверждается проведёнными экспериментами и межлабораторными сличениями. В ходе опробования методики были получены данные, которые подчеркивают её эффективность и надёжность в различных областях применения.

Методика позволяет определять счётную концентрацию клеток в диапазоне от 1 до $1 \cdot 10^5 \text{ 1/см}^3$. Этот широкий диапазон делает методику универсальной для различных типов образцов, включая как сильно разбавленные, так и концентрированные растворы. Возможность работы с низкими концентрациями особенно важна в микробиологии, где обнаружение даже небольшого количества патогенных микроорганизмов может иметь критическое значение для здоровья человека и животных.

Разработанная методика характеризуется относительной стандартной неопределённостью, не превышающей $\pm 14,8 \%$. Это значение включает в себя неопределённости типов А и В, которые составляют соответственно 2,7 и 14,6 %. Такие показатели свидетельствуют о высоком уровне точности измерений, что является важным критерием для научных исследований и практического применения в области контроля качества.

В процессе опробования методики были проведены измерения на различных образцах, включая образцы, содержащие бактериальные клетки патогенных биологических агентов и клетки полезных бактерий (ацидо- и бифидобактерии), применяемых в пищевой промышленности. Результаты показали, что методика обеспечивает стабильные и воспроизводимые данные, что подтверждается многократными измерениями на одинаковых образцах. Для повышения статистической достоверности результаты были получены на трёх чашках Петри с одинаковой концентрацией, что позволило минимизировать влияние случайных факторов на итоговые данные.

Сравнительный анализ, представленный в таблице, демонстрирует, что разработанная методика по своим характеристикам превосходит многие существующие методы измерений.

¹ ГОСТ Р 8.563-2009. Методы измерений. М.: Стандартиформ, 2019. 20 с.

Таблица

Сравнение характеристик методик измерений

Наименование характеристики	Наименование аттестованной методики и значение характеристики ¹				
	ФР.1.31.2021. 39894 УНИИМ 2021 г. (методом лазерной флуо- ресценции)	ФР.1.39.2018. 30323 ФМБА 2018 г. (методом прямого подсчёта)	ФР.1.39.2017. 28452 ВНИИМС 2006 г. (метод мер- ного высева)	ФР.1.39. 2009. 06596 ВНИИМС 2009 г.	ФР.1.31. 2025. 52059 НИЦ ПМ – Ростест 2025 г.
Счётная концентрация, $1/\text{см}^3$	от $1,0 \cdot 10^3$ до $2,0 \cdot 10^7$	от 1 до 2000	$(0,6 - 12) \cdot 10^4$	—	от 1 до $1 \cdot 10^5$
Относительная стандартная неопределён- ность типа A, $u_{A0}, \%$	—	—	—	—	2,7
Относительная стандартная неопределённость типа B, $u_{B0}, \%$	—	—	—	—	14,6
Суммарная стандартная неопределён- ность, $u_C, \%$	—	—	—	—	14,8
Расширенная неопределённость $U (k = 2), \%$	—	$\pm 62 \%$ (от 1,0 до 10) $\pm 46 \%$ (от 10 до 500) $\pm 36 \%$ (от 500 до 2000) $\pm 32 \%$ (свыше 2000)	—	—	29,7
Показатель точно- сти (границы погрешности при доверитель- ной вероятности $P = 0,95$), $\pm$	0,60	—	—	—	—
Показатель точно- сти (границы относительной погрешности при доверительной вероятности $P = 0,95$), $\pm$	20	—	$\pm 45 \%$	$\pm 32 \%$	—

¹ Аттестованные методики (методы) измерений / Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16> (дата обращения: 15.12.2025).

Например, в отличие от методики лазерной флуоресценции, которая имеет диапазон измерений от $1,0 \cdot 10^3$ до $2,0 \cdot 10^7$ 1/см³, рассматриваемая методика позволяет работать с более низкими концентрациями, что делает её более универсальной на низком диапазоне концентраций. Кроме того, относительная стандартная неопределённость, достигнутая в рассматриваемой методике, является одной из самых низких среди существующих, что подтверждает её высокую точность.

Необходимо отметить успешное участие лаборатории метрологического обеспечения биологических и информационных технологий НИЦ ПМ — Рос-тест в международных сличениях, проводимых под эгидой Международного бюро мер и весов (International Bureau of Weights and Measures, BIPM), — пилотных сличениях по измерению каталитической активности α -амилазы, содержания гормона роста в сыворотке крови, содержания паратиреоидного гормона в растворе и количества копий РНК коронавируса SARS-CoV-2, что подтверждает её соответствие высоким международным стандартам и требованиям. Положительные результаты международных сличений свидетельствуют о высоком уровне квалификации сотрудников лаборатории и надёжности используемых методов.

Когда сотрудники лаборатории участвуют в международных сличениях, они не только демонстрируют свои навыки и знания, но и получают возможность сравнить свои результаты с результатами других лабораторий. Это создаёт конкурентную среду, способствующую постоянному совершенствованию методов измерений и повышению уровня квалификации. В процессе подготовки к сличениям и их проведения сотрудники сталкиваются с различными вызовами, что требует от них глубокого понимания методик и технологий, а также способности к анализу и интерпретации данных. Таким образом, высокая квалификация сотрудников напрямую влияет на возможность получения высокоточных результатов измерений. Лаборатории, которые активно участвуют в международных сличениях, имеют доступ к последним достижениям в области метрологии и методологии, что позволяет им адаптировать свои процессы и улучшать качество измерений. Это, в свою очередь, подтверждается положительными результатами сличений, которые доказывают способность лаборатории обеспечивать высокую точность и воспроизводимость своих измерений.

Перспективы дальнейших исследований

Предложенная методика заложена в основу разработки стандартных образцов счётной концентрации клеток, что, в свою очередь, улучшит качество контроля в биомедицинских исследованиях и производстве, а также повысит доверие к результатам анализов со стороны потребителей и регуляторных органов. В дальнейшем планируются расширение области применения методики на новые виды микроорганизмов и исследование её эффективности в различных условиях.

Заключение

Разработка методики измерений счётной концентрации клеток в жидкости — это значительный шаг в области микробиологических исследований и контроля качества в различных отраслях, включая здравоохранение, ветеринарию и пищевую промышленность.

Методика, основанная на двух основных подходах — методе мерного высева и методе прямого подсчёта с использованием инвертированного люминесцентного микроскопа, — обеспечивает высокую степень точности и воспроизводимости результатов. Установлено, что диапазон измерений разработанной методики составляет от 1 до $1 \cdot 10^5$ 1/см³ и её относительная расширенная неопределённость не превышает $\pm 29,7$ %.

Методика может быть основой для создания стандартных образцов счётной концентрации клеток для обеспечения единства данных видов измерений, что, в свою очередь, приведёт к улучшению качества биомедицинских исследований и контроля на производстве, а следовательно, повышению доверия к результатам анализов со стороны потребителей и регуляторных органов.

Также важным аспектом является возможность применения данной методики для участия в международных сличениях и межлабораторных сличительных испытаниях.

Возможность точного измерения счётной концентрации клеток открывает новые горизонты для изучения микробиоты, её роли в здоровье человека и животных, а также в разработке новых вакцинных препаратов. Это особенно актуально в свете растущего интереса к пробиотикам и пребиотикам, а также к вопросам устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Таким образом, разработанная методика измерений счётной концентрации клеток в жидкости не только отвечает современным требованиям науки и практики, но и закладывает основу для дальнейших исследований и разработок в области микробиологии и смежных дисциплин. Её успешное внедрение и использование в различных областях позволит значительно повысить качество и безопасность продуктов и услуг, что, безусловно, будет способствовать улучшению здоровья населения и охране окружающей среды.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии сторонней финансовой поддержки при проведении исследования.

Вклад авторов. Е.В. Кулябина: формирование идеи, формулировка ключевых целей и задач, обеспечение выполнения работы, получение результатов измерений, составление черновика рукописи и первого варианта статьи. Ф.В. Булыгин: научное руководство проектом. Т.В. Кулябина: проведение исследований, в частности проведение экспериментов, анализ и интерпретация всех полученных данных. О.Н. Мелкова: проведение исследований с применением высокоточного лабораторного оборудования. В.В. Морозова: разработка дизайна исследования. М.В. Дорман: обеспечение выполнения работ с применением микроскопа. В.Ю. Морозов: применение статистических, математических методов для анализа данных, проведение анализа данных.

А.А. Кирилук: получение результатов измерений. Все авторы приняли участие в написании статьи и участвовали в её доработке. Все авторы прочитали и одобрили окончательную рукопись.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет потенциального конфликта интересов в связи с исследованием, представленным в данной статье.

Funding. The authors declare that they received no external financial support for this study.

Contribution of the authors. E.V. Kulyabina developed the concept, formulated the key goals and objectives, implemented the work, obtained the measurement results, and drafted the manuscript and the first version of the article. F.V. Bulygin provided scientific supervision of the project. T.V. Kulyabina conducted the research, including experiments, analysis, and interpretation of all obtained data. O.N. Melkova conducted the research using high-precision laboratory equipment. V.V. Morozova developed the study design. M.V. Dorman implemented the microscope. V.Yu. Morozov applied statistical and mathematical methods for data analysis and performed the data analysis. A.A. Kirilyuk obtained the measurement results. All authors contributed to the writing of the article and participated in its revision. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interests. The authors declare that they have no potential conflict of interest related to the research presented in this article.

Список источников

1. Doshi P. The elusive definition of pandemic influenza // Bulletin of the World Health Organization. 2011. V. 89. № 7. P. 532–538. <https://doi.org/10.2471/BLT.11.086173>.
2. Kraemer M. UG, Sinka M.E, Duda K.A. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* // Elife. 2015 Jun 30. 4. e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>.
3. Microbial Risk Management in Food Processes. 2nd Workshop Arranged by SAFOODNET — Food Safety and Hygiene Networking within New Member States and Associated Candidate Countries. VTT Symposium 260. Lyngby, Denmark, October 13–15, 2008 / G. Wirtanen, S. Salo (eds.). Espoo: VTT Technical Research Centre of Finland, 2009. 100 p.
4. Weidi Xie, Noble J.A., Zisserman A. Microscopy cell counting and detection with fully convolutional regression networks // Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering: Imaging & Visualization, 2016. P. 283–292. <https://doi.org/10.1080/21681163.2016.1149104>.
5. Jeremias J., Pape C. Stamped counting for biomedical images // Methods in Microscopy. 2025. V. 2. № 2. P. 203–213. <https://doi.org/10.1515/mim-2024-0021>.
6. Mohammed A.A., Fonder C., Ying Wei, Tavanapong W., Sakaguchi D.S., Qi Li, Mallapragada S.K. CellFMCount: a fluorescence microscopy dataset, benchmark, and methods for cell counting // Computer Vision and Pattern Recognition (cs.CV). The IEEE International Conference on Data Mining (ICDM). November 12–15, 2025, Washington, D.C., USA. IEEE, 2025. <https://doi.org/10.1109/ICDM65498.2025.00069>.

7. Mingyue Xiao, Ronghua Luo, Qinghua Liang et al. Anemoside B4 inhibits SARS-CoV-2 replication *in vitro* and *in vivo* // *Chinese Herbal Medicines*. 2024. V. 16. № 1. P. 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2023.09.005>.
8. Paltiel A.D., Zheng A., Walensky R.P. Assessment of SARS-CoV-2 screening strategies to permit the safe reopening of college campuses in the United States // *JAMA Network Open*. 2020. V. 3. № 7. e2016818. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.16818>.
9. Miller M.J., Dasgupta Sh., Ruffin J. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 testing trends among persons aged // *Journal of Adolescent Health*. 2021. V. 69. № 1. P. 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2021.04.010>.
10. Graham B.S., Sullivan N.J. Emerging viral diseases from a vaccinology perspective: preparing for the next pandemic // *Nature Immunology*. 2018. V. 19. № 1. P. 20–28. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0007-9>.
11. Excler J.-L., Saville M., Berkley S., Kim J.H. Vaccine development for emerging infectious diseases // *Nature Medicine*. 2021. V. 27. № 4. P. 591–600. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01301-0>.
12. Aladhadh M. A review of modern methods for the detection of foodborne pathogens // *Microorganisms*. 2023. V. 11. № 5. 1111. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051111>.

References

1. Doshi P. The elusive definition of pandemic influenza. *Bulletin of the World Health Organization*. 2011; 89 (7): 532–538. <https://doi.org/10.2471/BLT.11.086173>.
2. Kraemer M. UG, Sinka M.E, Duda K.A. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife*. 2015; 4: e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>.
3. Microbial Risk Management in Food Processes. 2nd Workshop Arranged by SAFOODNET — Food Safety and Hygiene Networking within New Member States and Associated Candidate Countries. VTT Symposium 260. Lyngby, Denmark, October 13–15, 2008 / G. Wirtanen, S. Salo (eds.). Espoo: VTT Technical Research Centre of Finland; 2009. 100 p.
4. Weidi Xie, Noble J.A., Zisserman A. Microscopy cell counting and detection with fully convolutional regression networks. In: *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering: Imaging & Visualization*. 2016. P. 283–292. <https://doi.org/10.1080/21681163.2016.1149104>.
5. Jeremias J., Pape C. Stamped counting for biomedical images. *Methods in Microscopy*. 2025; 2 (2): 203–213. <https://doi.org/10.1515/mim-2024-0021>.
6. Mohammed A.A., Fonder C., Ying Wei, Tavanapong W., Sakaguchi D.S., Qi Li, Mallapragada S.K. CellFMCount: a fluorescence microscopy dataset, benchmark, and methods for cell counting // *Computer Vision and Pattern Recognition (cs.CV)*. The IEEE International Conference on Data Mining (ICDM). November 12–15, 2025, Washington, D.C., USA. IEEE, 2025. <https://doi.org/10.1109/ICDM65498.2025.00069>.
7. Mingyue Xiao, Ronghua Luo, Qinghua Liang et al. Anemoside B4 inhibits SARS-CoV-2 replication *in vitro* and *in vivo*. *Chinese Herbal Medicines*. 2024; 16 (1): 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2023.09.005>.

8. Paltiel A.D., Zheng A., Walensky R.P. Assessment of SARS-CoV-2 screening strategies to permit the safe reopening of college campuses in the United States. *JAMA Network Open*. 2020; 3 (7): e2016818. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.16818>.
9. Miller M.J., Dasgupta Sh., Ruffin J. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 testing trends among persons aged. *Journal of Adolescent Health*. 2021; 69 (1): 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2021.04.010>.
10. Graham B.S., Sullivan N.J. Emerging viral diseases from a vaccinology perspective: preparing for the next pandemic. *Nature Immunology*. 2018; 19 (1): 20–28. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0007-9>.
11. Excler J.-L., Saville M., Berkley S., Kim J.H. Vaccine development for emerging infectious diseases. *Nature Medicine*. 2021; 27 (4): 591–600. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01301-0>.
12. Aladhadh M. A review of modern methods for the detection of foodborne pathogens. *Microorganisms*. 2023; 11 (5): 1111. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051111>.

Статья поступила в редакцию 16.03.2026; одобрена после рецензирования 17.03.2026; принята к публикации 14.04.2026.

The article was submitted 16.03.2026; approved after reviewing 17.03.2026; accepted for publication 14.04.2026.