

БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ: НОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ КОНТРОЛЯ

BIOLOGICAL QUALITY CONTROL OF MEMBRANE FILTERS: NEW PARAMETERS

Мембранные фильтры (МФ), которые используются в санитарно-микробиологических исследованиях, должны не только эффективно задерживать микроорганизмы, находящиеся в исследуемом материале, но и обеспечивать их отдельный рост в виде изолированных колоний со всеми типичными для данных бактерий или грибов культуральными свойствами. Поэтому при выполнении вх одного биологического контроля МФ помимо их у держающей способности, следует оценивать и свойства, влияющие на морфологию изолированных колоний, вырастающих на мембранах. К параметрам, которые позволяют оценить эти свойства, относятся, прежде всего, «сливной рост» и «тенденция к сливному росту», а также «равномерность промокания МФ». О важности введения новых параметров контроля свидетельствует тот факт, что «тенденция к сливному росту» наблюдалась у 59 партий МФ из 366, проверенных в ОБМА ЗАО «РОСА», а 14% партий мембранных фильтров были забракованы из-за наличия «сливного роста».

Ключевые слова: мембранные фильтры, контроль, МУ 2.1.4.1057-01, с ливной рост

Membrane filters (MF), which are used in sanitary and microbiological studies, should not only effectively retention the microorganisms, which are in the investigated material, but also ensure the separate growth of isolated colonies typical for all fungi or bacteria by culture properties. Therefore, during the input biological control MF their retention capacity and properties affecting the morphology of the isolated colonies growing on membranes should be evaluated. The parameters that evaluate these properties are, first of all, «merging» and «tendency of merging» and «uneven soaking of the membrane». The importance of the introduction of new control parameters indicated by the fact that «the tendency to crowding» was observed in 59 MF batches of 366 tested in the OBM A of CJSC «ROSA», and 14% of membrane filters parties were rejected because of the «crowding».

Key words: membrane filters, quality control, MR 2.1.4.1057-01, merging growth

С.Н. Тымчук*, кандидат медицинских наук, ведущий бактериолог отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА»
В.Е. Ларин, кандидат биологических наук, начальник отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА»
Е.Н. Ахапкина, начальник сектора бактериологии и вирусологии отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА»

S.N. Tymchuk, V. E. Larin, E. N. Akhapkina

*Адрес для корреспонденции: tsnsergtsn@yandex.ru

Введение

Посев методом мембранной фильтрации давно стал «золотым стандартом» санитарной микробиологии и является методом выбора, прежде всего, при исследовании объектов с низкими уровнями контаминации, таких как вода, напитки, лекарственные средства и т.д. [1]. Однако, введение мембранного фильтра (МФ) в систему «микроорганизм — питательная среда» может как положительно, так и отрицательно влиять на ростовые свойства микроорганизмов. В связи с этим, входной биологический контроль МФ является

одним из важных элементов системы внутреннего контроля качества любой санитарно-микробиологической лаборатории. Методика контроля МФ, которая регламентирована в МУ 2.1.4.1057-01 [2], за 15 лет существования документа, несомненно, устарела, содержит редакционные и методические недоработки и требует актуализации. Кроме того, опыт контроля МФ, накопленный в ЗАО «РОСА», свидетельствует о необходимости введения новых параметров качества МФ, не предусмотренных МУ 2.1.4.1057-01 [2] и характеризующих качество мембран в области, не связанной с их удерживающей способностью, о чем и пойдет речь в настоящей статье.

Параметры контроля МФ, не предусмотренные МУ 2.1.4.1057-01

За период с февраля 2004 года по июнь 2016 года в отделе биологических методов анализа (ОБМА) ЗАО «РОСА» был выполнен контроль 366 партий МФ разных производителей в 570 исследованиях, в которые также вошли повторные исследования партий МФ, не прошедших первичный контроль, и параллельные исследования на штаммах эталонных культур, альтернативных E.coli M17-02. За этот период была накоплена информация о существовании других параметров МФ, помимо «% удержания», которые необходимо оценивать при выполнении входного биологического контроля МФ в лаборатории.

Свойства мембран, о которых пойдет речь, влияют не на ростовые, а на культуральные свойства микроорганизмов и на саму возможность использования МФ для мембранного метода посева. К параметрам, которые позволяют оценить эти свойства, относятся, прежде всего, «сливной рост» и «тенденция к сливному росту», «равномерность промокания МФ», а также оценка степени деформации мембран после кипячения и степени уменьшения их линейных размеров. О важности введения новых параметров контроля свидетельствует тот факт, что «тенденция к сливному росту» наблюдалась у 59 партий МФ из 366, проверенных в ОБМА ЗАО «РОСА», а 14% партий мембранных фильтров были забракованы из-за наличия «сливного роста» (табл. 1).

«Сливной рост» и «тенденция к сливному росту»

В санитарной микробиологии метод мембранной фильтрации используется, в основном, для прямого подсчета количества колоний бактерий и грибов, выросших на мембране, а их идентификация во многом основывается на оценке характерных таксономических свойств изолированных колоний, которые они образуют. Поэтому мембранные фильтры, которые используются для такого исследования, должны обеспечивать раздель-

ный рост микроорганизмов в виде изолированных колоний со всеми типичными для данных бактерий или грибов культуральными свойствами. Способность или, точнее, *неспособность* МФ обеспечивать изолированный рост микроорганизмов описывается параметрами «сливной рост» и «тенденция к сливному росту».

«Тенденция к сливному росту»

«Тенденция к сливному росту» как феномен — это изменение типичной морфологии изолированных колоний тестового штамма под влиянием свойств МФ. Изменения морфологии колоний заключаются в том, что контуры колоний становятся расплывчатыми, форма неправильной, а края приобретают отростчатый, ползущий ха-

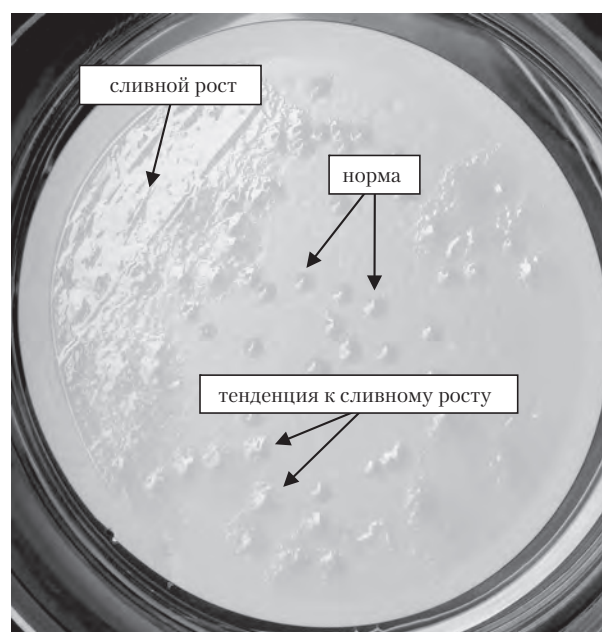


Рис. 1. Варианты изменения морфологии колоний эталонного штамма под влиянием свойств материала мембраны.

Таблица 1

Частота встречаемости «тенденции к сливному росту» и «сливного роста» у МФ разных производителей

Партии МФ	Всего	Владипор	Millipore	Sartorius	Владисарт	Другие
исследовано	366	229	124	3	3	7
с тенденцией к сливному росту	59	46	11	0	0	2
% партий с тенденцией к сливному росту	16	20	9	0	0	29
тенденция + сливной рост	27	27	0	0	0	0
% таких партий от всех с тенденцией	46	59	0	0	0	0
не пригодны по сливному росту	51	51	0	0	0	0
% непригодных по сливному росту	14	22	0	0	0	0



Рис. 2. Сливной рост на всей поверхности фильтрации МФ.



Рис. 3. Сливной рост на части поверхности фильтрации МФ.



Рис. 4. Вариант сливного роста на мембране с характерным линейным рисунком.

рактически (рис. 1). Однако, несмотря на склонность к расползанию, такие колонии должны оставаться изолированными и доступными для подсчета.

«Тенденция к сливному росту» как показатель контроля качества МФ — это процент мембран, на которых отмечен ползущий рост эталонного штамма, среди всех мембран, взятых на контроль из данной партии. Этот показатель носит *предупреждающий*, а не *запретительный* характер. Наличие мембран, на которых отмечен характерный ползущий рост колоний, предупреждает о том, что в исследуемой партии могут быть и мембраны, дающие сливной рост, поскольку контролю подвергается лишь мизерная часть МФ из партии. И чем выше значение показателя, тем вероятность сливного роста выше.

Использование данного показателя особенно целесообразно при принятии решения о покупке большой партии МФ, когда предварительно закупаются и исследуются пробные образцы мембран. Предпочтение следует отдавать тем партиям, у которых тенденция к сливному росту отсутствует.

Тенденция к сливному росту совсем не редкое явление и встречается у МФ разных производителей, однако частота проявления этого признака у мембран разного производства неодинакова (табл. 1). По полученным данным, тенденция к сливному росту чаще выявлялась на мембранах компании Владипор. Кроме того, на МФ Владипор у 59% партий МФ с «тенденцией к сливному росту» был выявлен и «сливной рост», причем у 3 партий «сливной рост» проявился, только при повторном контроле на удвоенном количестве посевов. Примечательно, что у МФ других производителей «тенденция к сливному росту» не сопровождалась «сливным ростом» ни в одной из партий. Причина подобного явления может заключаться в различии материала мембран. МФ Владипор изготавливаются из ацетата целлюлозы, а фильтры других производителей, у кото-

рых также отмечен данный феномен, но без сливного роста, из смеси эфиров.

«Сливной рост»

«Сливной рост», как феномен, это неспособность тестового штамма расти в виде изолированных колоний на всей поверхности МФ или ее части (рис. 1, 2, 3, 4). Рост бактерий на таких участках происходит в виде сплошного «газона», что делает невозможным учет результата. Поэтому, даже если сливной рост наблюдается только на части мембраны, такие МФ непригодны для использования в санитарно-микробиологическом контроле. Причина подобного феномена неизвестна. Сливной рост, по-видимому, как-то связан с особенностями физики поверхности отдельных партий мембран, благодаря которым бактерии получают возможность легко передвигаться по этой поверхности, что препятствует образованию изолированных колоний. В работе [3] было показано, что к сливному росту на таких мембранах способны только штаммы, обладающие подвижностью. Неподвижные штаммы сливного роста не дают. Важно также отметить, что появление сливного роста практически не зависит от количества бактерий, помещенных на фильтр (в пределах допустимой посевной дозы). Сливной рост наблюдается даже при посевных дозах порядка 20-30 КОЕ на МФ.

«Сливной рост» как показатель контроля качества МФ — это процент мембран, на которых отмечен сливной рост эталонного штамма, среди всех мембран, взятых на контроль из данной партии. Сливной рост должен отсутствовать. Любое положительное значение показателя, если оно подтверждается повторным исследованием, это основание для признания исследуемой партии МФ непригодной для санитарно-микробиологических исследований. Из 366 исследованных партий МФ сливной рост наблюдался только у МФ Владипор. Он был причиной неудовлетворительного биологического контроля у пятой части (22%) мембран данного

производителя, тогда как у МФ других производителей такой феномен выявлен не был (табл. 1).

Причина подобного явления непонятна и, видимо, связана с технологическими процессами компании, потому, что на многих мембранах сливной рост имеет вид четких геометрических структур и часто располагается вдоль непонятных прямых линий, пересекающих мембрану (рис. 1, 3, 4). На одних и тех же мембранах могут наблюдаться участки с нормальными колониями, с тенденцией к сливному росту и участки сливного роста (рис. 1, 3).

Пропускная способность мембранного фильтра и ее особенности

Помимо сливного роста, на способность МФ поддерживать рост микроорганизмов в виде изолированных колоний влияет и другая особенность мембран, которая была обнаружена при использовании фильтров Sartorius. Это *неравномерность промокания мембраны*.

Данный феномен заключается в том, что в отличие от нормальных фильтров (рис. 5), у МФ с таким дефектом (рис. 6) не вся поверхность мембраны одинаково пропускает жидкость, и эффективная фильтрация происходит лишь на ограниченных, порой весьма небольших, ее участках

(рис. 7). Это приводит к тому, что вместо равномерного распределения по фильтру микроорганизмы концентрируются только в местах эффективного пропускания, следствием чего является избыточное количество бактерий на единицу площади, что в свою очередь приводит к сливному росту на таких участках (рис. 8). Такая особенность была отмечена, по меньшей мере, у одной из трех партий МФ Sartorius, которые вошли в общую базу данных, анализируемую в обзоре, а также на трех партиях мембран, которые шли в комплекте со средами Sartorius на подложках.

По аналогии с показателями «тенденция к сливному росту» и «сливной рост» подобный дефект мембранных фильтров можно оценивать показателями: «неравномерность промокания мембраны» и «сливной рост». «Неравномерность промокания мембраны» как и «тенденцию к сливному росту» следует использовать как предупреждающий показатель, а показатель «сливной рост» как основание для признания непригодности исследуемой партии МФ.

Другие параметры пригодности МФ

Помимо вышеперечисленных параметров, существуют характеристики мембранных фильтров, которые менее значимы, но должны прини-

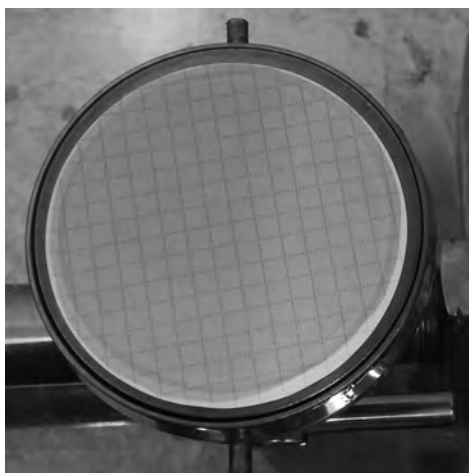


Рис. 5. Равномерное промокание мембраны.

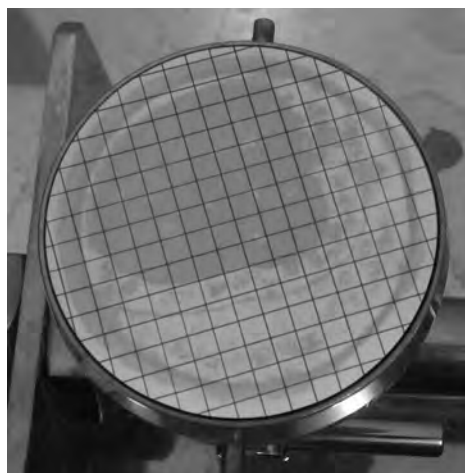


Рис. 6. Неравномерное промокание мембраны.

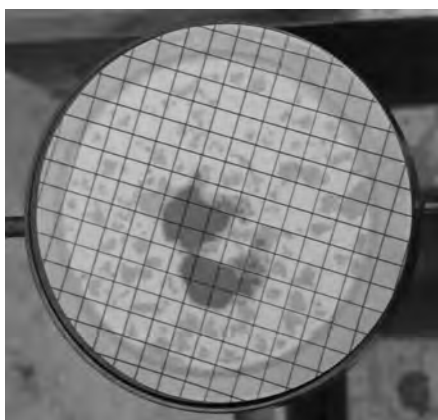


Рис. 7. Выраженная неравномерность промокания мембраны (до инкубации).

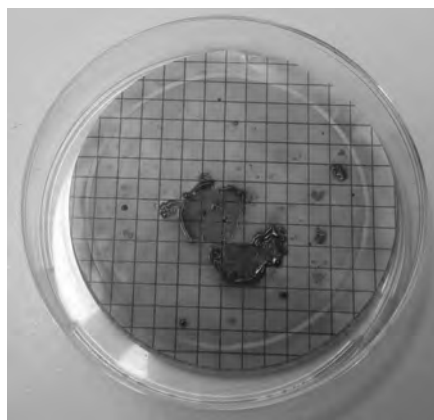


Рис. 8. Сливной рост из-за неравномерности промокания мембраны (после инкубации).

маться в учет при выполнении входного контроля. Основная масса из них относится к мембранам, которые перед применением подвергаются обеззараживанию кипячением. Кипячение МФ приводит к изменению их линейных размеров (их диаметр уменьшается) и к деформации мембран (волнообразной или дугообразной). Крайней степенью деформации является скручивание МФ в рулоны. Подобные изменения не являются стабильными и могут сильно отличаться от партии к партии, что в ряде случаев значительно затрудняет использование таких мембран.

Уменьшение диаметра мембран приводит к тому, что такие мембраны не способны закрыть всю площадь фритты фильтровальной установки, а значит, непригодны для использования. Следует отметить, что после того как компания Владипор изменила диаметр выпускаемых МФ с 35 и 45 мм на 37 и 47 мм, соответственно, уменьшение линейных размеров при кипячении перестало быть актуальным для мембран данного производителя. Однако, деформация мембран сохранила свое значение. Появление такого дефекта, безусловно, зависит не только от свойств материала мембран, но и от правильности выполнения их обеззараживания. Для уменьшения степени деформации мембран слой воды, в которой кипятятся МФ, должен быть по возможности минимальным. Тем не менее, встречаются партии, у которых деформация более выражена и не зависит от правильности кипячения. Мембраны таких партий часто визуально и тактильно выглядят толще, а материал жестче. В результате деформации такие мембраны изгибаются, и их невозможно уложить на поверхность питательной среды, так как жесткий деформированный край приподнимается. Это приводит

Литература:

1. Методы санитарно-бактериологических исследований внешней среды / Под ред. проф. Г.П.Калины. — Москва: Медицина, 1966. 154 с.
2. МУ 2.1.4.1057-01. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001. 92 с.
3. Ахапкина Е.Н. Опыт контроля качества мембранных фильтров для санитарно-микробиологических исследований / Е.Н. Ахапкина, С.Н. Тымчук, Е.Ю. Спиридонова, В.Е. Ларин // Гигиена и санитария. 2005. №1. С. 71-73.

к тому, что бактерии, осевшие на таком участке, не могут расти и образовывать изолированные колонии из-за недостатка влаги и питательных веществ.

Заключение

- ◆ Входной биологический контроль мембранных фильтров объективно необходим и является одним из важных элементов системы внутреннего контроля качества любой санитарно-микробиологической лаборатории.
- ◆ При входном биологическом контроле МФ следует оценивать не только их удерживающую способность, но и параметры, влияющие на культуральные свойства колоний микроорганизмов, вырастающих на мембране. Прежде всего, это показатели «тенденция к сливному росту» и «неравномерность промокания мембраны», а также показатель «сливного роста», который является основанием для признания непригодности исследуемой партии МФ для санитарно-микробиологического контроля.
- ◆ При необходимости закупки большого количества МФ оптимальным подходом была бы закупка нескольких пробных упаковок разных партий мембран определенного производителя, с последующим сравнением результатов их биологического контроля, включающего оценку не только их удерживающей способности, но и культуральных свойств.

References:

1. Kaliny G.P. (ed.) Metody sanitarno-bakteriologicheskikh issledovaniy vneshnei sredy [Methods of sanitary-bacteriological studies of the environment]. Moscow, Meditsina Publ., 1966, 154 p.
2. MU 2.1.4.1057-01. Organizatsiia vnutrennego kontrolya kachestva sanitarno-mikrobiologicheskikh issledovaniy vody: Metodicheskie ukazaniia [Methodology guidelines 2.1.4.1057-01. Organization of internal quality control of the sanitary and microbiological studies of water]. Moscow, Federal Centre of Sanitary Inspection Ministry of Health of Russia, 2001, 92 p.
3. Akhapkina E.N., Tymchuk S.N., Spiridonova E.Iu., Larin V.E. Opyt kontrolya kachestva membrannykh fil'trov dlia sanitarno-mikrobiologicheskikh issledovaniy [Experience of quality control of membrane filters for the sanitary-microbiological research]. Gigena i sanitaria — Hygiene and sanitary, 2005, no. 1, pp. 71-73.