

УДК 006.015+579.63+579.68

Читайте и узнаете:

- почему перечни методик, обеспечивающих выполнение требований технических регламентов, могут становиться источником конфликтов;
- сильные и слабые стороны известных методик определения *E. coli* и колиформных бактерий в воде.

Ключевые слова:

вода бутилированная, микробиологические исследования, методики испытаний, валидация, сравнение, *E. coli*, колиформные бактерии

Валидация методики определения *E. coli* и колиформных бактерий в воде путем сравнения с другой методикой

С.Н. Тымчук, начальник отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА», канд. мед. наук

Е.Ю. Спиридонова, начальник сектора бактериологии и вирусологии ЗАО «РОСА»

С.Н. Устинова, бактериолог ЗАО «РОСА»

Е.В. Буданова, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИОЗ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Д.Н. Нечаев, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИОЗ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Представлен перспективный метод валидации методик проведения микробиологических исследований, внедряемых в практику работы лаборатории. Предлагаемое авторами подробное рассмотрение равноценных на первый взгляд методических документов позволяют исполнителю выбрать наиболее соответствующий своим задачам и возможностям.

СТБ ISO 9308-1-2016¹ и ГОСТ 31955.1-2013² представлены в Перечне стандартов³, обеспечивающих соблюдение требований ТР ЕАЭС 044/2017⁴ (далее — Перечень) как равноценные методические документы для определения показателей

«*E. coli*» и «БГКП» (бактерии группы кишечной палочки). Такой подход заведомо является источником конфликтных ситуаций, поскольку методы обладают разной чувствительностью и в них используются разные подтверждающие тесты. Кроме того, ни в одном из этих документов не упоминается показатель БГКП, а подразумевается определение показателя «колиформные бактерии», то есть формально они не могут быть рекомендованы для определения данного показателя. Однако лаборатории, выполняющие анализы упакованной питьевой воды, обязаны использовать методики, включенные в Перечень.

В отделе биологических методов анализа ЗАО «РОСА» для проведения анализов бутилированной питьевой воды на соответствие требованиям ТР ЕАЭС 044/2017, а также для анализа других типов

¹ СТБ ISO 9308-1-2016 «Качество воды. Подсчет количества кишечных палочек *Escherichia coli* и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации для вод с низким содержанием бактериальной флоры» введен в действие постановлением Госстандарта Республики Беларусь № 83 от 26.10.2016 г.

² ГОСТ 31955.1-2013 (ISO 9308-1:2000) «Вода питьевая. Обнаружение и количественный учет *Escherichia coli* и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации» Приказом Росстандарта № 1904-ст от 12.12.2012 г. введен в действие в качестве национального стандарта с 01.01.2014 г.

³ «Перечень стандартов, содержащих правила и методы исследований (испытаний) и измерений, в том числе правила отбора образцов, необходимые для применения и исполнения требований технического регламента Евразийского экономического союза «О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду» (ТР ЕАЭС 044/2017) и осуществления оценки соответствия объектов технического регулирования» утвержден Решением Коллегии ЕЭК № 164 от 05.12.2017 г.

⁴ ТР ЕАЭС 044/2017 Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду» принят Решением Совета ЕЭК № 45 от 23.06.2017 г.

Испытания, измерения, анализ

вод с низкими уровнями микробной контаминации была внедрена методика СТБ ISO 9308-1-2016.

Количественные микробиологические методики не являются методиками измерений, а значит, их верификация в понимании ГОСТ ISO/IEC 17025-2019⁵ в большинстве случаев невозможна ввиду отсутствия установленных разработчиками отечественных и международных нормативных документов, регламентирующих процедуры анализа, и характеристик, необходимых для оценки правильности применения методики в конкретной лаборатории. По сути, микробиологические лаборатории при внедрении методик должны проводить их валидацию, т. е. определять характеристики, демонстрирующие пригодность данной методики для предполагаемого использования.

Для валидации методики СТБ ISO 9308-1-2016 был использован один из подходов, рекомендуемых ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 (примеч. 2, п. 7.2.2.1. разд. 7.2.2. «Валидация методов»), а именно, сравнение с результатами, полученными с помощью других валидированных методик. Методики сравнивались по критериям их эффективности, представляющей собой долю подтвержденных типичных колоний из взятых в исследование.

Для сравнения была использована методика, регламентированная ГОСТ 31955.1-2013 [2], которая давно применялась в микробиологической лаборатории ЗАО «РОСА». Этот документ является

модифицированным вариантом ISO 9308-1:2000⁶, тогда как СТБ ISO 9308-1-2016 — это аутентичный перевод ISO 9308-1:2014⁷.

Оба стандарта регламентируют методики определения *E. coli* и колиформных бактерий (далее — колиформы, КФ) методом мембранной фильтрации. Основное различие сопоставляемых методик заключается в использовании при проведении анализа разных питательных сред. В более поздней версии документа рекомендуется применять современную хромогенную среду *Chromogenic Coliform Agar* (далее — хромокульт), которая позволяет определять наличие фермента β-глюкуронидазы, высокоспецифичной для *E. coli*, и β-галактозидазы — одного из ферментов пути утилизации лактозы, присутствующего у колиформных и некоторых других бактерий, включая аэромонады. ГОСТ 31955.1-2013, как и ISO 9308-1:2000 предполагает использование лактозной дифференциально-диагностической среды Тергитол-7, однако допускает и использование среды Эндо, которая не упомянута в исходном документе.

Методика ГОСТ 31955.1-2013 в целом более длительна и трудоемка по сравнению с СТБ ISO 9308-1-2016, особенно при определении *E. coli*. Инкубация на среде Тергитол-7 осуществляется в течение (44 ± 4) ч, тогда как на хромокульте — (21 ± 3) ч. Для подтверждения принадлежности типичных колоний к колиформным бактериям в обеих методиках ис-

пользуется тест на наличие цитохромоксидазы.

Согласно ГОСТ 31955.1-2013 к колиформным бактериям относятся оксидазоотрицательные микроорганизмы, утилизирующие лактозу на среде Тергитол-7 с образованием типичных желто-оранжевых или кирпично-красных колоний с желтым отпечатком на среде. По версии СТБ ISO 9308-1-2016 — оксидазоотрицательные микроорганизмы, обладающие ферментом β-галактозидазой и образующие на хромогенной среде колонии розового или красного цвета.

Для определения *E. coli* по ГОСТ 31955.1-2013 требуется постановка дополнительного теста на образование индола из триптофана при 44 °С в триптофановом бульоне, тогда как по СТБ ISO 9308-1-2016 никаких дополнительных тестов для этого не требуется.

Согласно ГОСТ 31955.1-2013 к *E. coli* будут относиться колиформные бактерии, образующие индол из триптофана при 44 °С, тогда как по версии СТБ ISO 9308-1-2016 — микроорганизмы, обладающие ферментом β-глюкуронидазой, которые дают типичные сине-фиолетовые колонии на хромогенной среде.

Сравнение эффективности методик выполнялось путем параллельного анализа модельных проб на основе бутилированной питьевой воды, контаминированной природной, технической или сточной водой с достаточным уровнем целевых микроорганизмов.

Были исследованы четыре модельные пробы: по одной на ос-

⁵ ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» Приказом Росстандарта № 385-ст от 15.07.2019 г. введен в действие в качестве национального стандарта с 01.09.2019 г.

⁶ ISO 9308-1:2000. *Water quality — Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method* (Вода питьевая. Обнаружение и количественный учет *Escherichia coli* и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации)

⁷ ISO 9308-1:2014. *Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria — Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora* (Качество воды. Подсчет количества кишечных палочек *Escherichia coli* и колиформных бактерий. Часть 1. Метод мембранной фильтрации для воды с низким содержанием бактериальной флоры).

нове сточной и технической воды и две на основе природной. Была проведена параллельная и перекрестная идентификация колоний, выросших на *Chromocult coliform agar* и среде Тергитол-7, по методикам СТБ ISO 9308-1-2016 и ГОСТ 31955.1-2013 с последующим сравнением результатов идентификации, представленных в таблице.

Несмотря на относительно небольшое количество *E. coli* по отношению к колиформным бактериям в исследованных модельных пробах, полученные результаты показали, что эффективность выделения *E. coli* по СТБ ISO 9308-1-2016 значительно выше, чем по ГОСТ 31955.1-2013 (100 и 8,6 %). Такое различие в эффективности методик обусловлено тем, что на среде Тергитол-7, в отличие от хромокульта, колонии *E. coli* ничем не отличаются от колоний других колиформных бактерий. Этот аспект обуславливает большую трудоемкость методики ГОСТ 31955.1-2013 из-за необходимости постановки большого количества подтверждающих тестов по определению индолообразования.

При определении колиформных бактерий методом, регламентированным СТБ ISO 9308-1-2016, возникла необходимость дифференцировать морфологию колоний, подозрительных на колиформы, хотя стандарт этого не требует. Проведенные исследования показали, что к колиформам следует относить только розовые колонии, дающие четкий отпечаток на обратной стороне фильтра и среде, а не все колонии от розового до красного без различия морфологических типов, как предписывает документ. Таким образом, от принятия решения о необходимости дифференциации морфологии колоний розового цвета

по наличию или отсутствию отпечатка на обратной стороне фильтра и среде зависит эффективность выделения колиформных бактерий методом СТБ ISO 9308-1-2016. Если идентификацию проводить с разделением колоний на морфологические типы, то эффективность

выделения КФ методом СТБ ISO 9308-1-2016 значительно выше, чем по ГОСТ 31955.1-2013 (87,9 и 61,4 %). Если же проводить ее без дифференциации морфологии колоний, то эффективность выделения КФ методом СТБ ISO 9308-1-2016 составляет всего 13 %.



Резюме

Сравнительные исследования двух методик определения *E. coli* и колиформных бактерий в воде, входящих в перечень стандартов, обеспечивающих соблюдение требований ТР ЕАЭС 044/2017, позволили установить, что с точки зрения эффективности, скорости и трудозатрат методика СТБ ISO 9308-1-2016 предпочтительнее. Однако ее эффективность при определении КФ зависит от принятия решения о дополнительной дифференциации колоний, подозрительных на КФ, по наличию или отсутствию отпечатка на среде и мембранном фильтре.

TITLE:

Validating a method for determining *E. coli* and coliform bacteria in water by comparison with another method

AUTHORS:

S.N. Tymchuk, Head of the Department of Biological Analysis Methods at ROSSA JSC, Candidate of Medical Sciences

E.Yu. Spiridonova, Head of the Bacteriology and Virology Sector at ROSSA JSC

S.N. Ustinova, Bacteriologist at ROSSA JSC

V.E. Budanova, Associate Professor at the Department of Microbiology, Virology and Immunology at Sechenov University

D.N. Nechayev, Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology at Sechenov University

ABSTRACT

A promising method of validation of microbiological research methods implemented in laboratories is presented. The authors' detailed consideration of methodological documents that are equivalent at first glance allows a performer to choose the most appropriate for his tasks and capabilities.

KEYWORDS:

bottled water, microbiological studies, test methods, validation, comparison, *E. coli*, coliform bacteria

SUMMARY

Comparative studies of two methods for determining *E. coli* and coliform bacteria in water included in the list of standards that ensure compliance with the requirements of EAEU TR 044/2017 enabled to establish that in terms of efficiency, speed and labor costs, the STB ISO 9308-1-2016 method is preferable. However, its effectiveness in determining coliform bacteria depends on the decision to further differentiate colonies suspected of coliform bacteria by the presence or absence of a print on the medium and the membrane filter.

Валидация методики определения *E.coli*
и колиформных бактерий в воде
путем сравнения с другой методикой

Таблица. Результаты сравнения методик определения *E. coli* и колиформных бактерий по СТБ ISO 9308-1-2016 и ГОСТ 31955.1-2013

Показатель	Метод	Морфология	Всего колоний	Взято колоний	Подтверждено	Из них ОХУ +	Из них ЛАК -	Эффективность (% подтвержденных из исследованных типичных колоний)
<i>E. coli</i>	СТБ ISO 9308-1-2016	Как <i>E. coli</i>	10	10	10	0	0	100
		Как посторонние	3	3	1	0	2	
<i>E. coli</i>	ГОСТ 31955.1-2013	Как <i>E. coli</i>	70	70	6	27	0	8,6
		Как посторонние	0	0	0	0	0	
КФ* (с учетом морфологии колоний)	СТБ ISO 9308-1-2016	Как КФ	58	58	51	4	4	87,9
		Как посторонние	329	31	0	31	24	
КФ* (без учета морфологии колоний)	СТБ ISO 9308-1-2016	Как КФ	387	89	51	337	32	13
		Как посторонние	0	0	0	0	0	
КФ*	ГОСТ 31955.1-2013	Как КФ	70	70	43	27	0	61,4
		Как посторонние	0	0	0	0	0	

* Колиформные бактерии