

УДК 001.8

Читайте и узнаете:

- что межлабораторные сравнительные испытания — наиболее объективный способ проверки качества результатов микробиологических исследований;
- зависят ли результаты количественных значений МСИ от используемой среды;
- какие основные ошибки и причины неудовлетворительных результатов выявили МСИ микробиологических исследований.

Ключевые слова:

вода, микробиологические показатели, межлабораторные сравнительные испытания, стандартные образцы, питательные среды, выявленные ошибки

МСИ водных образцов по бактериологическим показателям

С.Н. Тымчук, начальник сектора бактериологии и вирусологии ЗАО «РОСА»

В.Е. Ларин, начальник отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА», канд. биол. наук

А.В. Карташова, начальник отдела контроля качества ЗАО «РОСА», канд. биол. наук

ГОСТ *ISO/IEC 17025–2019*¹ обязывает лаборатории осуществлять мониторинг достоверности результатов своей деятельности. К сожалению, большинство рекомендуемых для этого контрольных процедур невозможно реализовать, если лаборатория занимается микробиологическими исследованиями. В этом случае наиболее объективным способом проверки являются межлабораторные сравнительные испытания.

Приказ № 326 Минэкономразвития РФ² (п. 23.11) обязывает лаборатории включать в правила управления качеством результатов исследо-

ваний наряду с использованием стандартных образцов участие в межлабораторных сличениях или сравнительных испытаниях (МСИ). Их целесообразно проводить для оценки результатов контроля качества воды по санитарно-бактериологическим показателям, поскольку использование стандартных образцов в данном случае не представляется возможным.

Организация МСИ с целью проверки квалификации микробиологических лабораторий — сложная задача в первую очередь из-за трудностей создания стабиль-

ных и однородных образцов, поэтому таких программ в мире немного.

Подготовка МСИ

В 2019 г. ЗАО «РОСА» проведено два раунда МСИ по количественному определению микробиологических показателей. По данным авторов, в исполненном варианте (водные образцы, оценка количественных результатов, перечень определяемых показателей) — впервые в России. Это стало возможным благодаря разработке сотрудниками отдела биологических методов анализа (ОБМА) уникальной методики приготовления водных суспензий бактерий. Предлагаемые контрольные образцы представляли собой концентрированные взвеси целевых бактерий и обладали достаточной стабильностью и однородностью. Единственным их недостатком было ограничение по срокам хранения, в связи с чем круг участников МСИ ограничивался лабораториями, которые могли обеспечить транспортировку образцов в специальных термоконтейнерах в течение 24 часов.

Первый раунд проводился в период с февраля по июнь 2019 г.

¹ 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.

² Приказ Минэкономразвития России № 326 от 30.05.2014 г. «Об утверждении Критериев аккредитации, перечня документов, подтверждающих соответствие заявителя, аккредитованного лица критериям аккредитации, и перечня документов в области стандартизации, соблюдение требований которых заявителями, аккредитованными лицами обеспечивает их соответствие критериям аккредитации».

Лабораториям-участницам были предложены контрольные образцы для количественного определения следующих санитарно-микробиологических показателей:

- общих колиформных бактерий (ОКБ);
- термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ);
- спор сульфитредуцирующих клостридий (споры СРК).

Второй раунд по тем же показателям проходил в рамках программы МСИ «РОСА 2019» на 4-м этапе в период с 11.2019 по 02.2020 гг.

Приготовленные по специальной процедуре образцы прошли предварительные испытания в лаборатории провайдера с использованием метода мембранной фильтрации на большой выборке (всего было получено более 100 результатов по каждому показателю). Контроль образцов выполнялся по тем же методикам, по которым проводили исследования участники МСИ. Показатели ОКБ и ТКБ исследовались по регламентированному МУК 4.2.1018–01³ методикам. Споры СРК определялись по СТБ ИСО 6461–2–2016⁴. Выбор данной методики обусловлен тем, что из-за особенностей метода посева она обладает большей разрешающей способностью и позволяет учитывать большее число колоний благодаря отсутствию сливного роста.

Предварительные испытания позволили установить диапазон количественных значений, надежно воспроизводимых при приготовлении серии образцов по уста-

³ МУК 4.2.1018–01 «Санитарно микробиологический анализ питьевой воды», дата введения 01.07.2001 г.

⁴ СТБ ИСО 6461–2–2016 «Обнаружение и подсчет спор сульфитредуцирующих анаэробов (*clostridia*)» введен в действие постановлением Госстандарта Республики Беларусь № 83 от 26.10.2016 г.

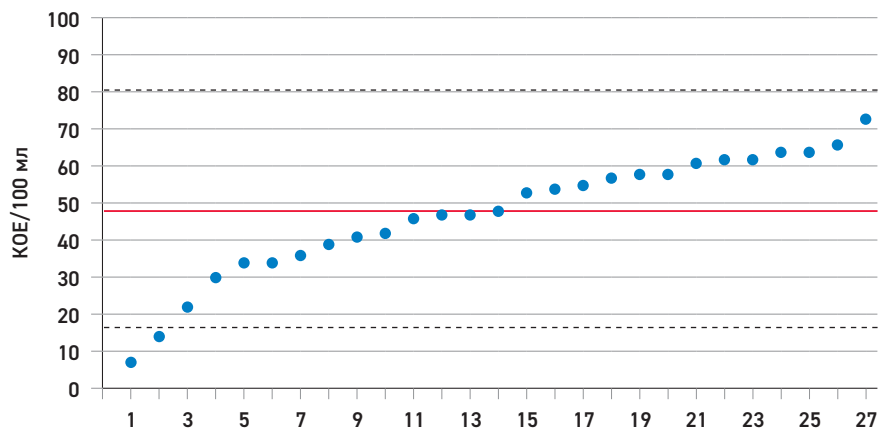


Рис. 1. Результаты определения ОКБ в первом раунде

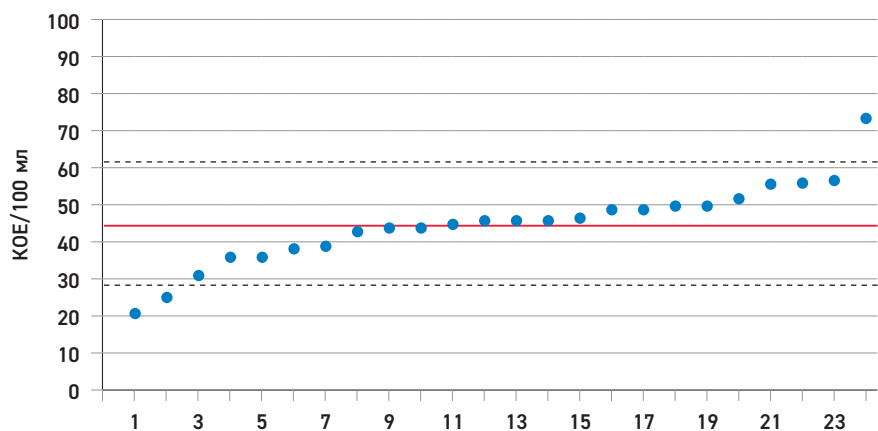


Рис. 2. Результаты определения ОКБ во втором раунде

новленной процедуре в определенных условиях.

Провайдером были разработаны и направлены участникам МСИ подробные инструкции по применению образцов и формы протоколов для представления результатов исследований.

Опорные значения в каждом раунде устанавливались в соответствии с рекомендациями ГОСТ Р 50779.60–2017⁵. В качестве опорного значения использовалось робастное выборочное среднее значение. Заключение о качестве результатов выдавалось по значе-

⁵ ГОСТ Р 50779.60–2017 (ИСО 13528:2015) «Статистические методы. Применение при проверке квалификации посредством межлабораторных испытаний» введен в действие Приказом Росстандарта № 1061-ст от 12.09.2017 г.

нию Z-индекса согласно следующим правилам: при $Z < 2$ результат признавался удовлетворительным, при $2 < Z < 3$ — сомнительным, при $Z > 3$ — неудовлетворительным. Для расчета Z-индекса использовалось робастное среднее квадратичное отклонение (СКО).

Определение ОКБ

В первом раунде данный показатель определяли 29 лабораторий: 25 лабораторий показали удовлетворительные результаты, а результаты двух были признаны сомнительными. Результаты еще двух лабораторий были исключены из расчетов по причине ошибки, допущенной при представлении результата в протоколе.

Испытания, измерения, анализ

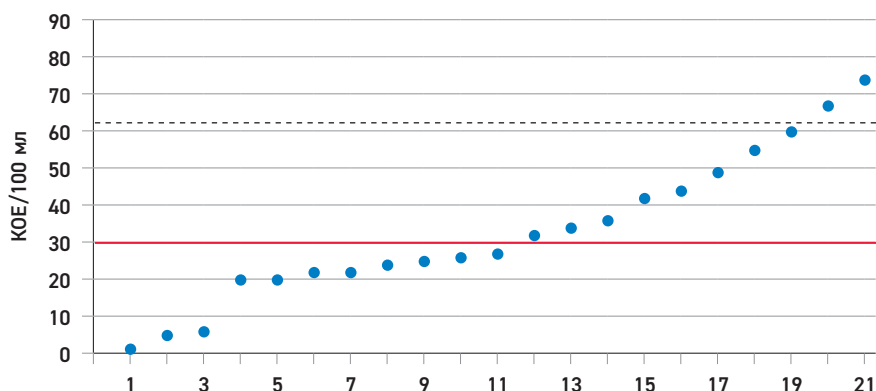


Рис. 3. Результаты определения ТКБ в первом раунде

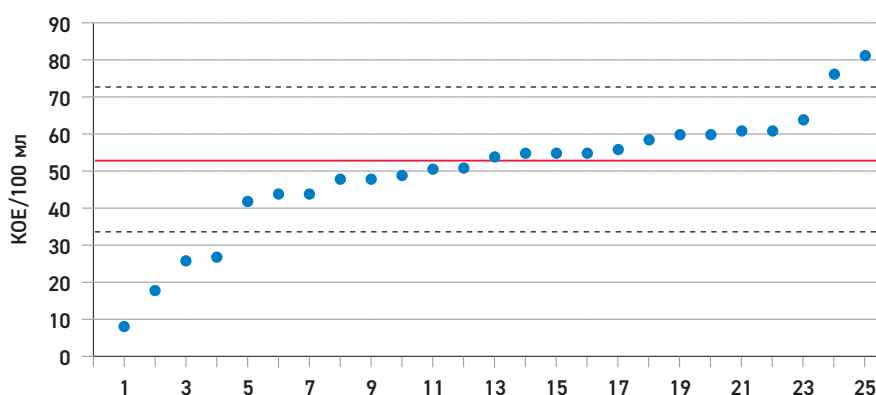


Рис. 4. Результаты определения ТКБ во втором раунде

Исполнители одной из них не произвели перерасчет результата на нормируемый объем, а сотрудники второй рассчитали результат только по количеству исследованных типичных колоний, не проводя пересчет результатов идентификации на суммарное количество типичных колоний в посевах.

Опорное значение — (48 ± 4) КОЕ/100 мл, СКО 16 КОЕ/100 мл.

Во втором раунде ОКБ определяли 24 лаборатории: 21 показала удовлетворительные результаты, результаты двух были признаны сомнительными, а одной — неудовлетворительным.

Опорное значение — (45 ± 2) КОЕ/100 мл, СКО 8,3 КОЕ/100 мл. Разброс результатов стал меньше, что свидетельствует о работе над

ошибками, проведенной лабораториями, принимавшими участие в МСИ во второй раз.

Результаты определения ОКБ приведены на диаграммах (см. рис. 1 и 2).

Определение ТКБ

В первом раунде показатель определяли 24 лаборатории: 19 показали удовлетворительные результаты, результаты двух были признаны сомнительными, а одной — исключены из расчетов из-за ошибки представления результата. Исполнители этой лаборатории не произвели пересчет результата на нормируемый объем.

Кроме того, две лаборатории не смогли получить количественный результат из-за сливно-

го роста на мембранных фильтрах. Зарост мембранных фильтров при определении ТКБ может быть обусловлен неудовлетворительным качеством фильтров по показателю «сливной рост». Данный дефект у некоторых производителей фильтров является достаточно частым и выявляется при входном контроле на штамме *E.coli* M17-02 согласно МУ 2.1.4.1057-01⁶.

Проявление сливного роста зависит от качества материала мембраны и подвижности бактерий. Неподвижные штаммы сливного роста не дают. Штамм, из которого изготавливался образец на ОКБ, неподвижен, а на ТКБ — подвижен. Это объясняет тот факт, что указанные лаборатории ОКБ смогли определить, а при определении ТКБ получили сливной рост. Для устранения причины проявления сливного роста провайдер рекомендовал выполнять входной контроль фильтров.

Опорное значение ТКБ — (30 ± 2) КОЕ/100 мл, СКО 16 КОЕ/100 мл.

Во втором раунде показатель определяли 25 лабораторий. Участники второго раунда по этому показателю продемонстрировали хорошую воспроизводимость результатов. При большем опорном значении — (53 ± 2) КОЕ/100 мл значение СКО стало почти в два раза меньше — $(9,7$ КОЕ/100 мл). Исключенных результатов не было. 19 лабораторий получили удовлетворительный результат, результаты четырех лабораторий были признаны сомнительными, а двух — неудовлетворительными.

Примечательно, что оба сомнительных результата по ОКБ, два из четырех сомнительных и

⁶ МУ 2.1.4.1057-01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды» дата введения 01.10.2001 г.

оба неудовлетворительных результата по ТКБ были значительно ниже опорного значения. Данный аспект может быть связан с низкими ростовыми свойствами используемой среды Эндо, что лишней раз подчеркивает важность проведения входного контроля питательных сред.

Результаты определения ТКБ приведены на рис. 3 и 4.

Определение спор СРК

В первом раунде показатель определяли 15 лабораторий. Особенностью определения данного показателя в первом раунде являлось то, что лабораториям предлагалось выполнить исследование контрольного образца параллельно на двух средах.

Стандартизованную коммерческую среду *LMI* (*Liver Meat Infusion agar*) предоставлял провайдер, а вторую участники готовили самостоятельно согласно методике, применяемой в конкретной лаборатории. Такой вариант организации МСИ был выбран в связи с тем, что российские документы не запрещают использование коммерческих сред, но большинство лабораторий определяет указанный показатель на железо-сульфитном агаре (ЖСА). Данная среда готовится из отдельных компонентов по прописи непосредственно перед применением, то есть она нестандартизована, и ее качество варьирует от варки к варке и зависит от качества используемых компонентов и исполнителя. Среда *LMI*, предоставленная провайдером, является коммерческой стандартизованной средой с проверенными характеристиками и рекомендуется к применению международными стандартами. Провайдер ставил целью определить влияние

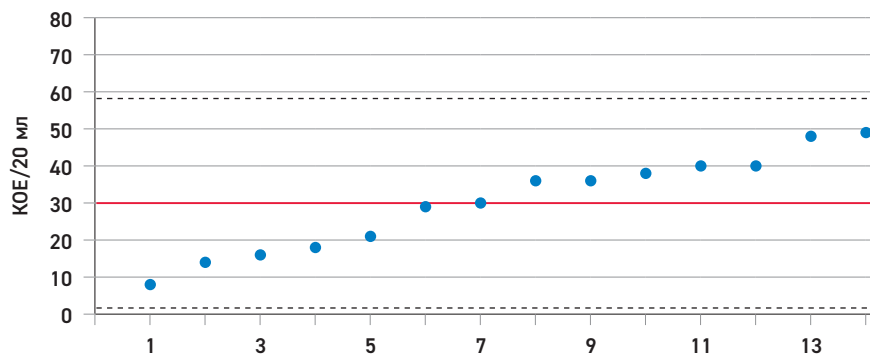


Рис. 5. Результаты определения спор СРК в первом раунде на среде *LMI*

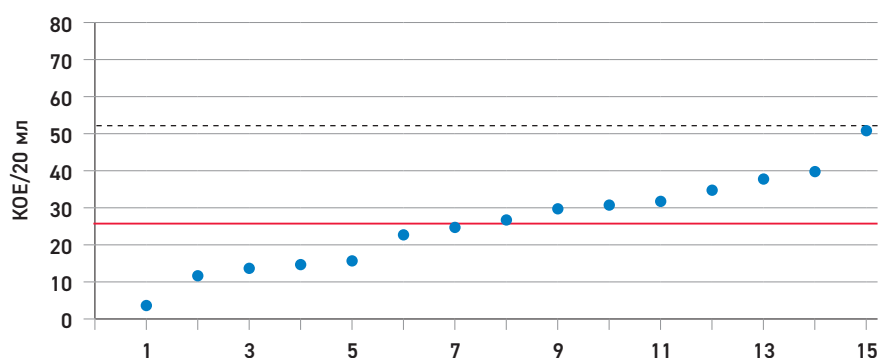


Рис. 6. Результаты определения спор СРК в первом раунде на лабораторной среде

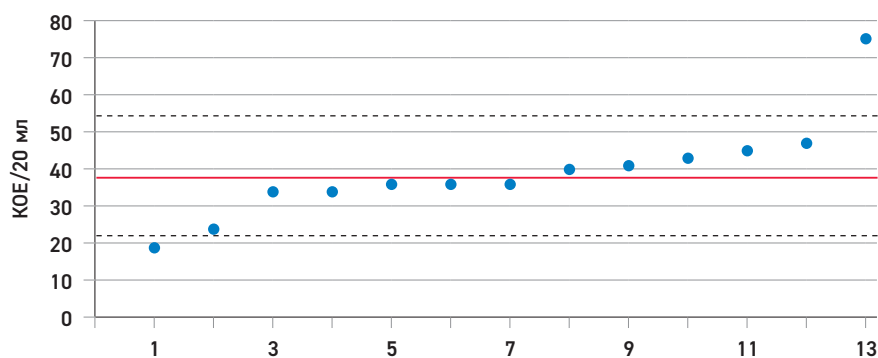


Рис. 7. Результаты определения спор СРК во втором раунде

качества среды на результаты анализа, так как сотрудниками его ОБМА неоднократно было показано, что ростовые свойства *LMI* не менее чем в два раза превышают ростовые свойства среды ЖСА. Качество последней зависит, в частности, от качества пи-

тательного агара, на основе которого готовится данная среда.

При определении показателя на стандартизованной среде *LMI* 14 лабораторий показали удовлетворительные результаты. Одна лаборатория не представила количественный результат, не сумев

выполнить расчет в связи с тем, что в одном посеве из трех наблюдался сплошной рост.

Опорное значение — (30 ± 5) КОЕ/20 мл, СКО 14 КОЕ/20 мл.

При определении показателя на среде, которая используется в лаборатории, все 15 лабораторий показали удовлетворительные результаты.

Опорное значение — (26 ± 4) КОЕ/20 мл, СКО 13 КОЕ/20 мл.

Четыре лаборатории использовали коммерческую среду отечественного производства. Оставшиеся 11 лабораторий использовали ЖСА, но только в трех случаях результаты, полученные на среде *LMI*, оказались приблизительно в два раза больше, чем на ЖСА. Остальные участники получили близкие значения.

Результаты МСИ не показали зависимости количественных значений от используемой среды, в связи с чем было принято решение во втором раунде определение спор СРК проводить только на стандартизованной среде, предоставляемой провайдером. Результаты первого раунда представлены на *рис. 5* и *6*.

Во втором раунде споры СРК определяли 13 лабораторий. 11 из них показали удовлетворительные результаты, результат одной был признан сомнительным, а одна лаборатория показала неудовлетворительный результат. Исключенных результатов не было.

Притисанное значение — (38 ± 3) КОЕ/20 мл, СКО 8 КОЕ/20 мл. Результаты второго раунда представлены на *рис. 7*.

Таким образом, проведенные туры МСИ по бактериологическим показателям можно считать успешными:

- контрольные образцы для количественных исследований про-

демонстрировали стабильность и однородность;

- установлено, что к исключению результатов исследования лабораторий из обработки привели ошибки в расчетах результатов анализов и недостаточный входной контроль мембранных фильтров;

- предполагаемой причиной низких сомнительных и неудовлетворительных результатов определения показателей «ОКБ» и «ТКБ» являются низкие ростовые свойства используемой среды Эндо, что в свою очередь может быть связано с недостаточным входным контролем питательных сред.



Резюме

Представленные МСИ убедительно подтвердили эффективность данного способа проверки достоверности результатов микробиологических исследований. Предложенные провайдером контрольные образцы для количественных исследований санитарно-бактериологических показателей качества воды продемонстрировали высокую стабильность и однородность. А работа участников над установленными в ходе испытаний причинами ошибок позволила уже во втором раунде показать улучшенные результаты.

TITLE: _____

Interlaboratory comparisons of water samples by bacteriological indicators

AUTHORS: _____

S.N. Tymchuk, Head of the Sector of Bacteriology and Virology of JSC ROSA
V.E. Larin, Head of the Department of Biological Methods of Analysis of JSC ROSA, Candidate of Biological Sciences
A.V. Kartashova, Head of Quality Control Department, JSC ROSA, Candidate of Biological Sciences

ABSTRACT _____

GOST ISO/IEC 17025–2019 obliges laboratories to monitor the reliability of the results of their activities. Unfortunately, most of the recommended control procedures cannot be implemented if a laboratory is engaged in microbiological research. In this case, the most objective method of verification is interlaboratory comparisons.

KEYWORDS: _____

water, microbiological indicators, interlaboratory comparisons, standard samples, nutrient media, detected errors

SUMMARY _____

The presented interlaboratory comparisons have convincingly confirmed the effectiveness of considered method of verifying the reliability of the results of microbiological studies. The control samples proposed by the provider for quantitative studies of sanitary and bacteriological indicators of water quality demonstrated high stability and uniformity, and the work of the participants on the causes of errors determined during the tests allowed them to show better results in the second round.