



УДК 006.015+579.63+579.68

Читайте и узнаете:

- что полноценная верификация количественных микробиологических методик стала возможной;
- почему при внедрении отечественных количественных микробиологических методик по-прежнему не обойтись без межлабораторных сличительных испытаний.

Ключевые слова:

микробиология, верификация, валидация, лаборатория, эксплуатационные характеристики методик

Проблематика верификации и валидации микробиологических методик

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

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

Согласно ГОСТ *ISO/IEC 17025-2019* верификация методик стала обязательной для микробиологических лабораторий. Но в отсутствие установленных разработчиками критериев правильности исполнения полноценная верификация отечественных количественных микробиологических методик невозможна. Новый *ISO 13843:2017* определил соответствующую концепцию, в основе которой лежит определение эксплуатационных характеристик. Вместе с тем определение параметров, регламентированных документом, представляется сложным для рутинных лабораторий из-за масштабности необходимых исследований.

Принятый недавно ГОСТ *ISO/IEC 17025-2019*¹ ставит ряд новых задач. В частности, разд. 7.2 данного документа регламентирует правила выбора методов², а также содержит требования по их верификации и валидации, распространяющиеся на все лаборатории вне зависимости от направленности проводимых исследований. Это порождает ряд проблем для лабораторий, работающих в об-

ласти санитарной микробиологии. Они затрагивают как терминологические аспекты указанных процедур, так и их методическое и юридическое обеспечение.

Согласно п. 3.8 ГОСТ *ISO/IEC 17025-2019*, «верификация — предоставление объективных свидетельств того, что данный объект соответствует установленным требованиям». Если исходить из определения, верификация подразумевает наличие документаль-

ных доказательств того, что методика в исполнении конкретной лаборатории соответствует требованиям разработчика.

Вместе с тем уже в самом определении заложен конфликт, из-за которого невозможна верификация микробиологических методик согласно требованиям вышеуказанного документа. Проблем несколько.

Комплекс проблем

Во-первых, разработчик самостоятельно валидирует методики измерений, предназначенные для определения физико-химических показателей качества вод, а для применения в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений еще и аттестует их применительно к исследуемому объекту. Таким образом, пользователь получает документ с количественными критериями, позволяющими оценить правильность реализации методики в процессе верификации.

Что же касается микробиологических методик исследования, то первая и определяющая проблема состоит в том, что ни один

¹ ГОСТ *ISO/IEC 17025-2019* «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» Приказом Росстандарта от 15.07.2019 г. № 385-ст введен в действие в качестве национального стандарта с 01.09.2019 г. (*ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, IDT*).

² Термин «метод», используемый в международных документах, и термин «методика», используемый в данной статье, рассматриваются как синонимы.

из отечественных документов ранга ГОСТа, МУК и МУ, применяющихся для контроля санитарного состояния объектов окружающей среды, в том числе и воды, не содержит установленных количественных характеристик. Как следствие, верификация невозможна в том виде, в каком ее сегодня понимает большинство экспертов по аккредитации.

Во-вторых, традиционные количественные микробиологические методики не являются методиками измерений. В рамках реализации микробиологических методик результаты получают не с помощью средств измерений (внесенных в реестр СИ, аттестованных, поверенных, калиброванных и т. п.), а, по сути, органолептически — путем визуального учета результата исполнителем. Учет результата заключается в подсчете количества типичных колоний, положительных посевов в пробирках или ячейках, количества зон лизиса, а также при необходимости в проведении подтверждающих тестов, результаты которых учитываются также субъективно.

Применение валидации

В то же время существует требование к верификации методик. Поэтому в отечественной практике под верификацией микробиологических методик подразумевают документальное подтверждение требований, изложенных в методиках, которые касаются условий выполнения анализа и правил надлежащей лабораторной практики. Они включают в себя требования к помещениям, оборудованию, температуре и срокам инкубации, к питательным средам и мембранным фильтрам, компе-

тенции персонала, асептическим условиям работы и т. д.

Таким образом, речь идет о верификации не рабочих характеристик методики, а условий ее применения. В этом случае правильнее говорить о том, что микробиологические методики при внедрении в практику должны быть валидированы.

Согласно определению, изложенному в п. 3.9 ГОСТ *ISO/IEC 17025-2019*, валидация — это «*верификация, при которой установленные требования связаны с предполагаемым использованием*».

В соответствии с Примечанием 2, п. 7.2.2.1 разд. 7.2.2 «Валидация методов» способы, используемые для валидации методики, могут быть одним или комбинацией нескольких предлагаемых подходов. Среди перечисленных подходов пригодными для санитарных микробиологических лабораторий являются:

- систематическая оценка факторов, влияющих на результат;
- сравнение с результатами, полученными с помощью других валидированных методик;
- межлабораторные сличения.

Под систематической оценкой факторов, влияющих на результат, подразумевается система внутрилабораторного контроля качества, которая для лабораторий, выполняющих санитарно-микробиологический контроль воды, регламентирована МУ 2.1.4.1057–01³. Соответственно, документарным подтверждением валидации методики будут записи по качеству, включающие результаты контроля:

- помещений (результаты оценки микробной контаминации воздуха и поверхностей);

- оборудования (контроль стерильности фильтровальных установок, акты аттестации, свидетельства о калибровке или поверке);

- питательных сред (протоколы количественного контроля, записи о проведении качественного контроля и контроля стерильности);

- мембранных фильтров (протоколы контроля мембранных фильтров) и т. д.

Сравнение с результатами, полученными с помощью других валидированных методик, в принципе может дать некие статистические критерии оценки валидируемой методики. Но эти критерии, например оценка достоверности различия результатов по критерию Стьюдента или другим аналогичным способом, позволяют оценить лишь отличие валидируемой методики от другой, но не достоверность самого результата.

К тому же для использования такого подхода к валидации в лаборатории уже должны присутствовать другие валидированные методики определения данного показателя.

Межлабораторные сравнительные испытания (МСИ) также подразумевают вычисление статистических критериев оценки результатов участников, при этом и критерии оценки, и методы их определения назначаются провайдером МСИ, а не разработчиком методики. Кроме того, при оценке выполнения микробиологических методик определяются не метрологические характеристики полученного результата, а попадание результата в некий диапазон «большинства», который определяется методами робастной статистики.

³ МУ 2.1.4.1057–01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды», дата введения 01.10.2001 г.

Немаловажный аспект этого способа валидации методики состоит в том, что он может быть реализован только при наличии туров МСИ по оцениваемой методике. Следовательно, его сложно использовать при валидации редко применяемых или инновационных методик, так как организация туров МСИ по таким методикам маловероятна.

Международная практика: сравнение

В мировой практике не прекращается поиск критериев количественной оценки правильности выполнения микробиологических методик. Венцом таких усилий стал *ISO 13843:2017*⁴, который отменяет и замещает *ISO/TR* (Технические требования) 2000 г. «Качество воды. Руководство по валидации микробиологических методов».

В новой версии документа отсутствует термин «валидация». Его заменили термином «установление характеристик исполнения».

В *ISO 13843:2017* содержится обширный перечень терминов и определений (41 ед.), что необычно для микробиологических методических стандартов такого ранга. Обилие терминов, вероятно, обусловлено их новизной для специалистов микробиологических лабораторий.

Ключевым процессом в данном документе выступает «характеристика метода». Этот термин является революционным, поскольку отражает попытку нового нестандартного подхода к количественной оценке микробиологических методик. Он не тождественен классическим процеду-

рам валидации и верификации, но при этом может выполнять их функции.

Восприятие идеи документа в целом и процесса определения характеристики методики в частности осложняет тавтология, которая заложена в определении термина.

Пункт 4.2 «Характеристика [метода]» гласит, что «характеристика микробиологического метода в основном базируется на экспериментальном определении эксплуатационных характеристик данного метода». В связи с чем получается, что характеристика — это определение характеристик.

Под эксплуатационными характеристиками подразумеваются параметры, которые могут быть измерены для демонстрации того, что методика правильно выполняется при определенных условиях ее применения. К таким параметрам документ относит эксплуатационные характеристики, представленные в *таблице*.

Из приведенных в ней параметров первые семь являются «чисто» микробиологическими и не имеют прямых аналогов среди параметров оценки физико-химических методик анализа. Это интегральные параметры, отражающие влияние как условий обеспечения выполнения анализа (сред, фильтров и т. д.), так и персонала, проводящего оценку и учет результата. Остальные параметры направлены прежде всего на оценку влияния исполнителей и варьирования условий выполнения на результаты анализа.

Таким образом, эксплуатационные характеристики — это критерии, отражающие во многом субъ-

ективные особенности конкретной лаборатории. Поэтому документ гласит, что определение эксплуатационных характеристик каждой отдельной лабораторией в первую очередь необходимо для определения правильности исполнения методики в этой лаборатории. Цель документа состоит не в том, чтобы привести конкретные значения для каждой из перечисленных эксплуатационных характеристик, а скорее в том, чтобы дать указания, какие параметры следует определить и как лучше всего их получить для целей сравнения.

Тем не менее для шести параметров из 12 в документе приводятся ориентировочные значения:

- чувствительность: обычно >90 %;
- специфичность: обычно >80 %;
- селективность: результаты обычно недействительны, если селективность <10 %;
- неопределенность подсчета: индивидуальная неопределенность подсчета (1 чел.) обычно остается ниже $\pm 0,03$. Внутрिलाбораторная неопределенность подсчета — ниже $\pm 0,05$. Внутрिलाбораторная неопределенность подсчета более $\pm 0,1$ является определенным признаком проблем или трудностей;
- повторяемость (параллельные посевы на чашках): вариабельность должна быть в пределах распределения Пуассона. Если нет, то следует указать степень сверхдисперсии;
- верхний предел: для методов мембранной фильтрации указанный диапазон — от 0 до 80 колониеобразующих единиц (КОЕ), в то время как для методов прямого посева, в которых используются

⁴ *ISO 13843:2017. Water quality. Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods* (Качество воды. Требования к установлению рабочих характеристик количественных микробиологических методов).

чашки Петри 90 мм, диапазон может быть от 0 до 300 КОЕ. Площадь поверхности мембранного фильтра 47 мм составляет примерно 27 % от 90 мм чашки Петри. Указанные верхние пределы зависят от степени фонового (нецелевого) роста, количества различных типов целевых организмов (например, общих колиформных бактерий и кишечной палочки) и размера колонии.

Несмотря на либеральность, задекларированную в целях документа, в п. 5 «Спецификации: некоторые ориентировочные значения» достаточно категорично утверждается, что «во все стандарты ИСО, касающиеся методов микробиологии воды и относящиеся к определенным микробам или группам микробов, должен быть добавлен пункт об эксплуатацион-

ных характеристиках». Документ обязывает разработчиков стандартов устанавливать эксплуатационные характеристики методик для целей их дальнейшей верификации лабораториями.

Определение термина «верификация», которое дано в ISO

лабораторией для подтверждения результатов исходной характеристики». Но если подставить вместо термина «характеристика [метода]» его значение, а именно «определение эксплуатационных характеристик», то мы получаем определение, соответствующее ГОСТ

Внедрение ISO 13843:2017 в нашей стране возможно лишь после изменения нормативно-методической базы

13843:2017, на первый взгляд существенно отличается от определения, данного в ГОСТ ISO/IEC 17025-2019. В дословном переводе оно звучит так: «3.41 Верификация — проведение вторичной характеристики [метода] другой

ISO/IEC 17025-2019: верификация — это определение эксплуатационных характеристик метода лабораторией для подтверждения их соответствия исходным характеристикам, которые определены разработчиком.

ГАЗЕТА QUALITY NEWS

ЕЖЕНЕДЕЛЬНАЯ
ЭЛЕКТРОННАЯ
РАССЫЛКА НОВОСТЕЙ

ОПЕРАТИВНО ПОЛУЧАЙТЕ САМУЮ АКТУАЛЬНУЮ И ПОЛЕЗНУЮ ИНФОРМАЦИЮ!

- Законодательная и нормативная база национальной и межгосударственной систем стандартизации
- Системы менеджмента
- Безопасность — производственная, экологическая, энергетическая, информационная и др.
- Развитие персонала
- Контроль качества продукции и услуг
- Метрология, лабораторная практика
- Оценка соответствия, аккредитация испытательных лабораторий
- Импортзамещение, конкурентоспособность, стратегическое развитие, поддержка экспорта
- Переход к циркулярной модели экономики, экономика качества, принципы индустрии 4.0
- Бизнес-совершенствование и др.



НОВОСТИ • КОММЕНТАРИИ • РАЗЪЯСНЕНИЯ • ОБЗОРНО-АНАЛИТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ • ПРАКТИЧЕСКИЕ РУКОВОДСТВА

Если газета перестала Вам приходить, Вы можете бесплатно переподписаться, перейдя по ссылке: <https://ria-stk.ru/electronprint/rassilka.php> или кликнув по баннеру «Электронная газета» в меню на главной странице сайта www.ria-stk.ru

СПРАВКИ: тел.: (495) 771 6652 (доб. 123), e-mail: editor_site@mirq.ru

БЕСПЛАТНАЯ
ПОДПИСКА НА САЙТЕ RIA-STK.RU
В РАЗДЕЛЕ «ЭЛЕКТРОННАЯ ГАЗЕТА»

Нормативное регулирование и контроль

Таблица. Эксплуатационные характеристики

№	Параметр	Определение
1	Чувствительность ^{a, b, c}	Доля от общего количества положительных ^e результатов, правильно установленная при предварительном подсчете
2	Специфичность ^{a, b, c}	Доля от общего количества отрицательных ^f результатов, правильно установленная при предварительном подсчете
3	Коэффициент ложноположительных результатов ^{a, b}	Доля положительных результатов (например, типичных колоний), которые, как впоследствии было показано, не относятся к целевым организмам
4	Коэффициент ложноотрицательных результатов ^{a, b}	Доля отрицательных результатов (например, нетипичных колоний), которые, как впоследствии было показано, относятся к целевым организмам
5	Селективность ^{a, b, c}	Отношение количества целевых колоний к общему количеству колоний в объеме пробы
6	Эффективность ^{a, b}	Доля от общего количества колоний, правильно установленная при предварительном подсчете
7	Верхний предел ^a	Верхний край рабочего диапазона, при котором метод применим (например, максимальное подсчитываемое количество колоний на чашку или аналогичная величина в других системах обнаружения)
8	Повторяемость ^{a, b, c}	Сходимость при стабильных условиях (одни и те же операторы, одни и те же рабочие условия, короткий период времени и т. д.)
9	Воспроизводимость ^a	Сходимость при внутрилабораторных условиях воспроизводимости ^d
10	Надежность ^a	Измерение пределов нечувствительности теста к незначительным, но преднамеренным изменениям условий выполнения (например, температуры)
11	Относительная эффективность выделения ^a	Эффективность, с которой данный метод выделяет целевые организмы из пробы при сравнении с другой процедурой
12	Неопределенность подсчетов ^{a, b}	Относительное стандартное отклонение повторных количеств целевого организма, полученных повторным подсчетом (чашек, полей, пробирок и т. д.) при установленных условиях (тот же исполнитель, различные исполнители, в одной и той же лаборатории и т. д.)

Примечание.

^a Требуется для определения эксплуатационных характеристик.

^b Требуется для верификации отдельной лаборатории.

^c Дано ориентировочное значение.

^d Методы для межлабораторной воспроизводимости и сходимости описаны в Приложении *F ISO 13843:2017*. Применение указанных методов следует рассматривать в тех случаях, когда первостепенной является оценка межлабораторного исполнения, например, когда метод разрабатывается для применения в оценке соответствия.

^e Положительными могут быть подсчеты колоний, сосудов с положительной реакцией или подсчеты ячеек.

^f Отрицательными могут быть нетипичные колонии, сосуды с отрицательной реакцией или ячейки без требуемых специфических характеристик.

Таким образом, *ISO 13843:2017* предлагает подходы к полноценной верификации микробиологических методик, но в нашей стране внедрение данного стандарта станет возможным только после изменения нормативно-методической базы и появления методик, в которых будут представлены требования к эксплуатационным характеристикам.

Верификация микробиологических методик по версии *ISO*

13843:2017, особенно для небольших лабораторий, затруднена, поскольку способы определения эксплуатационных характеристик, представленных в документе, являются масштабными исследованиями, требующими высокой компетентности персонала, огромных трудозатрат и наличия большого количества образцов.

Например, требуется исследование не менее 20 образцов трех или более типов вод, а если ис-

следование проводится на модельных суспензиях, приготовленных на природной или сточной воде, то вода должна быть по меньшей мере из трех источников. Определение только микробиологических показателей подразумевает исследование 1–2 тыс. колоний. Исследованию подлежат как типичные, так и нетипичные колонии. При этом нетипичных колоний должно быть достаточное количество, что представляется проблемой в случае



высокоселективного метода. Кроме того, определение других характеристик требует многократного учета результата одним и несколькими исполнителями, а также вариацию условий методики в рамках указанных температурных и временных диапазонов. Все вышеперечисленное делает данные процедуры трудно осуществимыми для большинства отечественных лабораторий.

На настоящем этапе данный документ следует рассматривать как пособие скорее для разработчиков методик, чем для рутинных лабораторий.

Выводы

Новый *ISO 13843:2017* стал важным революционным шагом в определении количественных критериев оценки микробиологических методик. Вместе с тем определение параметров, регламентированных документом, представляется сложным для рутинных лабораторий из-за масштабности необходимых исследований.

Понятие верификации в *ISO 13843:2017* близко по значению к терминологии ГОСТ *ISO/IEC 17025-2019* и не совпадает с существующей практикой подтверждения исполнения требований методик, отражающих условия проведения испытаний.

Полноценная верификация микробиологических методик станет возможна только после изменения нормативно-методической базы и появления методик, в которых разработчиками будут представлены требования к эксплуатационным характеристикам.

В настоящее время подавляющее большинство как отечественных, так и международных методических документов, описывающих микробиологические методики, не

имеет установленных разработчиками количественных характеристик исполнения. Вследствие этого участие в МСИ еще длительное время будет оставаться единст-

венно возможным способом для лабораторий предоставить объективные доказательства «правильности» внедрения в практику новой для них методики.

Резюме

***ISO 13843:2017* стал прорывом в области верификации количественных микробиологических методов. Но полноценная верификация станет возможной только для новых методик, разработчики которых установили эксплуатационные характеристики, требующие подтверждения соответствия. При внедрении большинства существующих методик источником предоставления объективных доказательств правильности их исполнения по-прежнему остаются межлабораторные сличительные испытания.**

TITLE: _____

Problems of verification and validation of microbiological methods

AUTHORS: _____

S.N. Tymchuk, Head of the Sector of Bacteriology and Virology, Department of Biological Methods of Analysis, CJSC ROSSA, Candidate of Sciences (Medicine)

V.E. Larin, Head of the Department of Biological Methods of Analysis, CJSC ROSSA, Candidate of Sciences (Biology)

ABSTRACT _____

According to the latest edition of GOST ISO/IEC 17025-2019, the verification of methods has become mandatory for microbiological laboratories. Appropriate verification of domestic quantitative microbiological methods is impossible due to the lack of specified criteria for the correctness of their implementation.

The new ISO 13843:2017 has defined the verification concept for quantitative microbiological methods based on the determination of performance characteristics. At the same time, the determination of the parameters regulated by the document seems difficult for routine laboratories due to the scale of required investigation.

KEYWORDS: _____

microbiology, verification, validation, laboratory, performance characteristics of methods

SUMMARY _____

The new ISO 13843:2017 has become a breakthrough in the verification of quantitative microbiological methods. But appropriate verification will only be possible for new methods with specified performance characteristics, the compliance with which should be confirmed. When implementing most of the existing methods, interlaboratory comparisons remain the source of objective evidence of the correctness of their implementation.