

Методика использования анализатора «mbOnline-COLIGUARD®» в качестве устройства раннего предупреждения

Каролина Корреа, Томас Ленденфилд, компания «mbOnline GmbH»

Краткий обзор

Анализатор семейства «mbOnline-COLIGUARD®» представляет собой прибор контроля, как фекального загрязнения, так и более общих микробиологических показателей источников воды на основе определения ферментативной активности. Очевидные преимущества в скорости, полной автоматизации и интерактивности проведения измерений противопоставляются тому факту, что для ферментативных методов корреляция с методами на основе культивирования изменяется в определенных пределах корреляции со стандартными методами на основе культивирования. Для определения пороговых значений представлен статистический метод надежного использования анализатора «COLIGUARD®» в качестве устройства раннего предупреждения.

Введение

Санитарно-гигиеническое качество является ключевым моментом в управлении водными ресурсами, используемыми людьми. Чем быстрее технолог узнает о критических факторах, тем быстрее он сможет предпринять ответные действия и снизить риск для населения. Время между отбором проб и получением результатов при использовании методов, основанных на культивировании, достигает 48 часов. Это слишком долго с точки зрения возможности быстро отреагировать и свести к минимуму риск для населения. Документально зафиксировано несколько несчастных случаев, связанных с попаданием загрязнений систем снабжения питьевой водой, что привело к вспышке заболеваний (в г. Нокиа [4]).

Таким образом, идея «раннего предупреждения» для микробиологических параметров не нова, так как методы, основанные на культивировании, занимают не менее 18 часов только лишь на анализ/культивирование, не считая времени на взятие пробы, хранение, оценку и передачу отчета. Было опробовано множество мер и подходов (см. полную информацию в [8]), но до недавнего времени ни одна концепция не добилась прорыва, как среди экспертов, так и на рынке.

Технология «mbOnline-COLIGUARD®» представляет новую аналитическую концепцию с реальными возможностями «раннего предупреждения» благодаря измерению ферментативной активности во время полностью автоматизированного процесса без культивирования исследуемых бактерий. Данные анализируются удаленно, для незамедлительного реагирования в критических случаях пороговые значения срабатывания сигнализации можно установить.

В данном документе описана процедура определения пороговых значений статистическими средствами с использованием только данных анализатора «COLIGUARD®» либо совместно с данными методов, основанных на культивировании.

Что необходимо для системы «раннего предупреждения»

Сопоставимость/взаимосвязь

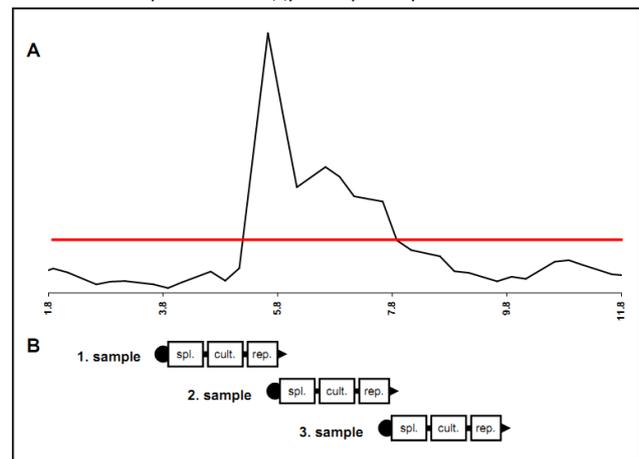
Критические аналитические различия между процедурой «COLIGUARD®» и стандартными методами, основанными на культивировании – это отсутствие этапа культивирования в процедуре «COLIGUARD®». Данное различие является существенным для оценки полученных данных (дальнейшая информация дана в техническом бюллетене 010 компании «mbOnline»).

Конечно же, взаимосвязь между различными подходами возможна в особом случае и является более или менее точной для определенных характеристик, но, тем не менее, не всегда будет приводить к 100% совпадению результатов [1,2,3,5,6,7]. Это применимо ко всем аналитическим методам, включая стандартные методы, такие как ISO 9308!

Необходимо найти другую надежную связь между методами, основанными на основе ферментов и культивировании. Одним из простых способом является определение пороговых значений (значений сигнализации), в которых «ложные отрицательные» результаты исключаются с достаточной степенью достоверности.

Оперативность получения результатов

Принимая систему снабжения питьевой водой временно загрязненной фекальными загрязнениями (Рис. 1), используя стандартные интервалы контроля, в данном случае два дня, существует большая вероятность не обнаружить временный пик фекального загрязнения или неверно оценить ситуацию («отклонение от нормы») из-за разрешения по времени и больших интервалов между отбором проб.



Фиг.1: Временное фекальное загрязнение водных ресурсов

С помощью автоматизированных устройств, например, анализатора «COLIGUARD®», можно провести несколько измерений (до 6) в день с использованием больших объемов пробы (вплоть до 5000 мл), так что временные отклонения от нормы будут обнаружены с большой вероятностью.

Постановка задачи

Если брать во внимание тот факт, что автоматизированное устройство предоставляет измеренные значения в режиме «онлайн» и достаточно быстро, несколько раз в день, основным вопросом является:

Можно ли определить предел измерений, при превышении которого мы сможем быть уверенными, что водный ресурс загрязнен, чтобы начать осуществлять контрмеры?

Таким образом, если возможно определить порог ферментативной активности, где можно исключить «ложные отрицательные» результаты (отсутствие сигнала при загрязнении) с определенной вероятностью, то идея раннего обнаружения подходит идеально.

Перед тем, как описать процесс получения пороговых значений, важно знать значение терминов «ложный отрицательный» и «ложный положительный» результаты в данном контексте. В общем, эти категории должны рассматриваться в отношении фекального/микробного загрязнения. Однако фекальное загрязнение обычно определяется с использованием методов обычного подсчета, так что следует сравнить ферментативный метод анализатора «COLIGUARD®» непосредственно с методами, основанными на культивировании. Как описано в Техническом бюллетене № 010, данный подход является неподходящим, он может быть использован лишь для определенных характеристик образца, потому что оба метода дают разное видение микробной системы одного и того же образца. Ферментативная активность обычно обнаруживается благодаря наличию жизнеспособных, но не способных к культивации микроорганизмов.

Значения, измеренные с помощью данного метода, таким образом, не могут быть равны нулю! – данная ферментативная «фоновая» активность уникальна для каждого водного источника, так же как и отпечаток пальца.

Получение пороговых значений

Пороговые значения генерируются в четыре этапа (см. Рис.2):

- Установка и настройка прибора
- Получение данных
- Статистический анализ
- Подтверждение

Компания «mbOnline» разработала статистический инструмент для определения пороговых значений (данный инструмент можно загрузить с сайта www.mbonline.at).

Установка и настройка прибора: Размещение прибора в системе водоснабжения обязательно. Он должен находиться на важных участках, где измеряются и другие физико-химические свойства, а места взятия пробы для традиционного микробиологического контроля должны находиться настолько близко, насколько это возможно для совпадения результатов с результатами стандартных методов, основанных на культивировании.

Для того чтобы уменьшить влияние оборудования контрольных точек на прибор «COLIGUARD®», пробоотборная линия должна быть максимально короткой для снижения риска образования биопленки, разбавления и/или эффекта переноса.

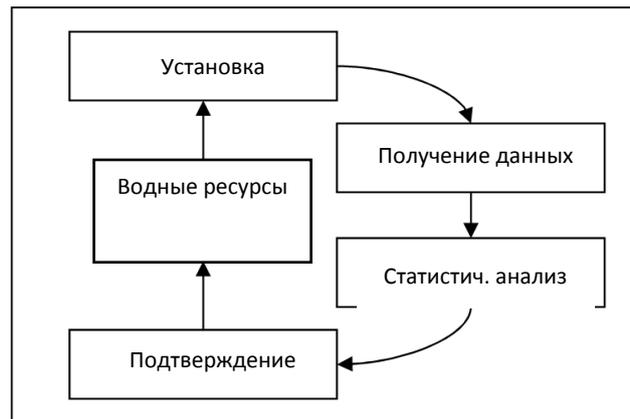


Рис. 2: Схема процесса генерирования пороговых значений

Не менее важным является объем пробы и частота измерений. Для ожидаемого малого числа КОЕ/100мл рекомендуются большие объемы проб (до 5000мл), если ожидается постоянное микробное загрязнение, можно предположить снижение объема пробы. Если ожидается наличие мутности воды и взвеси, то объем пробы следует точно отрегулировать в соответствии с максимальной чувствительностью и минимальными интервалами обслуживания.

Обычно требуется от 1 до 3 недель для правильной настройки прибора. Необходимо связаться с ближайшим сервисным партнером или техническим отделом компании «mbOnline» за техподдержкой.

Получение данных: следующий этап – это получение данных, которые должны сохраняться хотя бы в течение одного месяца, чтобы получить достаточные и достоверные данные для следующего этапа статического расчета.

Следует принять тот факт, что важны не только «значения для холостой пробы» (малая активность или ее отсутствие), но и некоторые «отклонения от нормы» полезны для подтверждения правильности модели. В общем, набор данных хотя бы 100 представительных данных должен быть сгенерирован для создания действующей статистической модели и пороговые значения, но в зависимости от свойств водных ресурсов может потребоваться больше данных.

Контроль физико-химических и микробиологических свойств водопровода к анализам прибора «COLIGUARD®» целесообразно провести для объяснения и отслеживания возможных отклонений, ложных пиковых значений и сигналов. Если параллельно проводятся стандартные микробиологические измерения, время взятия проб должно быть максимально близко ко времени взятия проб прибором «COLIGUARD®», так же как и должны быть близко расположены места взятия пробы (с целью традиционного контроля и подтверждения результатов использования рекомендуется использовать автоматический пробозаборник «COLIGUARD®»).

Следует понимать, что при низких концентрациях анализируемого вещества – это является обычным для числа бактерий в водных питьевых ресурсах – статистическая ошибка огромна, так что соответствующие измерения

обычно не будут предоставлены для сравнения (например, измерение повышенных значений одним методом для отдельного случая отклонения не обязательно означает, что другой метод покажет такие же значения, см. «Распределение Пуассона»).

Статистический анализ: Данные предыдущего этапа используются для проведения статистического анализа. В общем, существует два способа определения порога срабатывания сигнализации:

- Расчеты по методам, основанным на культивировании
- Расчеты согласно ферментативным данным прибора «COLIGUARD®»

Оба метода приводят к получению пороговых значений, которые должны быть подтверждены фактическими данными – может потребоваться адаптация к реальным условиям, выполненная вручную в последующем этапе. Оба метода предоставляют границы чувствительности и значимость измерений.

Пороговые значения, полученные методами, основанными на культивировании

- Сбор данных при значениях <1 (обычно «0»), большие значения приняты статистическим программным инструментом, обеспечивая большую гибкость модели.
- Устранение возможных отклонений данных прибора «COLIGUARD®» при использовании надежных статистических методов (например, «критерий Граббса»). Данная процедура необходима, потому что пробы для ферментативных измерений и методов на основе культивирования не могут совпадать (одна и та же проба не может быть дважды проанализирована) и особенно из-за статистического распределения при малых концентрациях ожидается большие колебания.
- Расчет пороговых значений для различных значимостей (66% - 95% - 99%, соответствующих одно-, двух- и трехкратному стандартным отклонениям)

Пороговые значения на основе ферментативных данных

- Сбор данных, при которых вы «уверены» в отсутствии микробного загрязнения.
- Устранение возможных отклонений данных прибора «COLIGUARD®» при использовании надежных статистических методов (например, «критерий Граббса»). Данная процедура необходима, потому что нет очевидности при простой визуальной проверке и выборе данных, чтобы действительно получить лишь пустые значения в наборе данных.
- Расчет пороговых значений для различных значимостей (66% - 95% - 99%, соответствующих одно-, двух- и трехкратному стандартным отклонениям)

Подтверждение и внедрение должно быть выполнено предпочтительно на разных наборах данных одинакового места взятия пробы, но также может быть выполнено с одним и тем же набором данных, используемых для генерации пороговых значений, и включает следующие этапы:

- Проверка пороговых значений на фоне различных данных с одного участка или, если это не возможно, на фоне исходного набора данных. Наборы данных с некоторыми «действительно» положительными измерениями полезны в процессе подтверждения.

- Поиск отклонений, в которых измерения прибора «COLIGUARD®» не соответствуют другим физико-химическим и/или микробиологическим данным (например: в случае реального загрязнения значения ферментативной активности ниже порогового значения) и адаптация пороговых значений к особым условиям микробного поведения водного ресурса.
- Задать пороговые значения в программное обеспечение «mbO-Client» для конкретного прибора и водного источника, а также опций сигнализации (сообщение о тревоге по электронной почте). Воздействие пороговых значений на сохраненные данные изображено на пользовательском интерфейсе клиента.

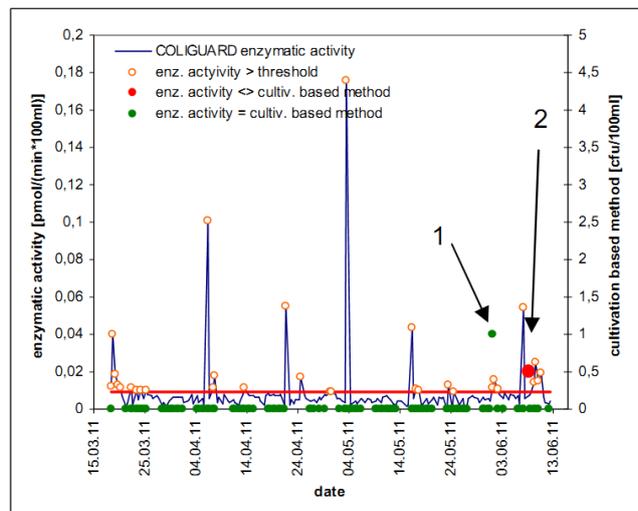


Рис. 3: схема образца из таблицы «EXCEL®», показывающая период измерений обоих методов (ферментативный и основанный на культивировании) и классификация данных; ферментативные данные (синяя линия); ферментативные данные превышающие пороговое значение, но метод, основанный на культивировании, отображает пустые или не соответствующие данные (оранжевые круги); данные по основанному на культивировании методу, подтвержденные соответствующими ферментативными данными (зеленые точки); данные по основанному на культивировании методу, не подтвержденные соответствующими ферментативными данными (красные точки); см. текст для описания точек «1» и «2».

Как обрабатывать полученные пороговые значения

Расчетные пороговые значения дают оценку для классификации некоторых измеренных значений как «отрицательных» или «положительных» для автоматического реагирования в случае отклонения от нормы.

Глядя на фактические данные на Рис. 3 (1), методы, основанные на культивировании, показывают 1 КОЕ/100мл, а также ферментативное значение прибора «COLIGUARD®» показывает превышение порогового значения, указывая на «правильное» обнаружение (зеленая точка) и вдобавок еще три значения выше порогового, в которых традиционный метод не обнаружил ничего («0»/100мл), что привело к «положительным» ферментативным значениям (оранжевый круги). В точке (2) подсчитано значение 0,5 КОЕ/100мл, но

ферментативное значение находится ниже порогового, что говорит об «отрицательной» результате (красная точка). Но ясно видно, что ферментативная активность увеличивается в этот короткий период, приводя к «положительному» значению выше порогового. Хотя соответствующие измерения не связаны, тенденция к повышенным значениям в течение периода времени явно видна. Различие двух значений наиболее вероятно из-за различия во времени между двумя взятиями пробы или статистических неоднородностей проб.

В конкретном случае (Рис. 3) необходимо дальнейшее исследование, чтобы объяснить количество одиночных измерений, которые превышают пороговое значение и не соответствуют значениям традиционного метода.

Более подробный анализ пороговых значений описан в следующем примере: измеренное значение при 95% порог с вероятностью 95% является не отрицательным значением. С другой стороны, измерение этой же воды методом ISO 9308 приведет к отрицательным значениям с вероятностью около 40% (на объем образца 100мл, значение 10КОЕ/л)! Добавленное значение для технолога это то, что сработает сигнализация с 95% точностью (водный ресурс загрязнен), лишь 5% будет ложной тревогой. Установка порогового значения на более высокий уровень точности увеличивает (измеренное значение не отрицательное (уменьшает ложный положительный результат)) значение, но, с другой стороны, это значит, что также положительные (загрязнение) результаты будут обнаружены с меньшей вероятностью (увеличивается риск ложных отрицательных результатов). Причины установки порогового уровня на определенное значение должны балансировать между риском не обнаружить загрязнение ресурса и дополнительными действиями из-за более частых сообщений о тревоге.

Следовательно, логично корректировать модель пороговых значений в соответствии с реальными наборами данных для проверки и уменьшения риска ложного отрицательного результата.

При использовании прибора должным образом, система «COLIGUARD®» является высоконадежной системой раннего предупреждения.

Список литературы

1. Servais, P. et al. An early warning method to detect faecal contamination of river waters; Ann. Microbiol., 55(2), 67 – 72 (2005)
2. Garcia-Armisen T., et al. (2005); β -D-glucuronidase activity assay to assess viable Escherichia coli abundance in freshwaters; Lett. Appl. Microbiol., 40, 278 – 282
3. Fiksdal, L. et al. (2008); Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality; Curr. Opin. Biotech. 19, 289 – 294
4. http://en.wikipedia.org/wiki/Nokia_water_supply_contamination
5. Garcia Armisen, T. et al. (2004); Enumeration of viable E. coli in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization; J. Microbiol. Meth. 58, 269 – 279
6. Farnleitner, AH. et al. (2001); Rapid enzymatic detection of Escherichia coli contamination in polluted river water, Lett. Appl. Microbiol. 33, 246 – 250
7. George, I. et al. (2000); Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwater; J. Appl. Microbiol. 88, 404 – 413
8. US-EPA (2005); Technologies and Techniques for Early Warning Systems to Monitor and Evaluate Drinking Water Quality: A State-of-the-Art Review

...Частота контроля для большинства систем обычно не подходит для выявления периодических загрязнений. Тем не менее, условия, приводящие к вспышке заболеваний, передающихся через воду, возникают часто, если обычно не связаны с временными, «необычными» случаями или обстоятельствами.

Стив Э. Хруди, IWA, Международная организация безопасности питьевой воды, сентябрь 2008г.