

Evaluation of competence of laboratories by the proficiency testing in the microbiology of milk and milk products in years 2008–2014

Rola J.G., Grudka D., Osek J., Department of Hygiene of Food of Animal Origin, National Veterinary Research Institute, Pulawy

This paper describes organization of proficiency testing (PT) of laboratories in microbiology of milk and milk products. In years 2008–2014 twelve PT rounds were organized by the national reference laboratory. Proficiency testing was organized and performed according to the ISO/IEC 17043 standard, which replaced the ISO/IEC 43–1:1997 and ILAC-G13:08/2007 standards. Food samples were analyzed for detection and enumeration of microorganisms in relation to the microbiological criteria for milk and milk products, described in the EU Regulation (EC) No. 2073/2005 and EU Regulation (EC) No. 1664/2006. All results obtained by the laboratories were compared to assigned results and were defined as positive or negative assessment of PT. For the qualitative analyses, depending on scope of examinations, positive PT assessment was obtained by 93–100% laboratories, for the quantitative analyses positive results were reached by 75–98% participated laboratories. The overall performance of network of microbiological milk and milk products diagnostic laboratories for official control was good.

Keywords: milk, milk products, microbiology laboratory, proficiency testing.

Zewnętrznym narzędziem kontroli jakości badań wykonywanych w laboratorium jest uczestnictwo w badaniach biegłości (proficiency testing – PT), które pozwalają na ocenę kompetencji laboratorium w zakresie rutynowo prowadzonych badań (1, 2, 3). Badania biegłości są również jednym ze sposobów porównania wyników badań z rezultatami uzyskanymi przez inne laboratoria przy zastosowaniu referencyjnej i/lub alternatywnej metody badawczej. Dają możliwość wykrycia ewentualnych błędów w użytych metodach badawczych i tym samym podjęcie działań korygujących (3, 4, 5, 6). Należy zaznaczyć, że uczestnictwo laboratorium w badaniach biegłości nie sprowadza się tylko do weryfikacji dokładności czy oceny wiarygodności uzyskanych wyników, ale również jest sposobem potwierdzenia kompetencji organizacyjnych związanych z wykonywaniem obliczeń czy przekazywaniem do organizatora badań biegłości uzyskanych rezultatów badań (7, 8). Pozytywne wyniki regularnego uczestnictwa w badaniach biegłości zwiększają także zaufanie klientów do laboratorium, a tym samym utwierdzają w przekonaniu, że stosowane procedury, metody badawcze i inne operacje laboratoryjne są poprawne (8, 9).

Ocena kompetencji laboratoriów poprzez badania biegłości w zakresie mikrobiologii mleka i produktów mlecznych w latach 2008–2014

Jolanta G. Rola, Dorota Grudka, Jacek Osek

z Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

W oparciu o informacje z udziału danego laboratorium w badaniach biegłości kierownictwo laboratorium uzyskuje potwierdzenie kompetencji swojego zespołu w zakresie prowadzonych analiz (6, 9).

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego (ZHZ PIWet-PIB) w Puławach, zgodnie z rozporządzeniem ministra rolnictwa i rozwoju wsi z 18 kwietnia 2012 r. pełni funkcję krajowego laboratorium referencyjnego, m.in. w zakresie mikrobiologii żywności zwierzęcego pochodzenia (10). Na mocy zapisów rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 882/2004/WE oraz ustawy z 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej krajowe laboratoria referencyjne zobowiązane są do organizacji badań biegłości dla laboratoriów urzędowych i późniejszego wykorzystania otrzymanych przez nie wyników (11, 12). ZHZ PIWet-PIB organizuje badania biegłości m.in. w kierunkach zgodnych z przyjętymi kryteriami bezpieczeństwa żywności i higieny procesu w odniesieniu do wymagań mikrobiologicznych dla mleka i produktów mlecznych, przedstawionych w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005. Określają one dopuszczalny poziom zanieczyszczenia produktu w zależności od rodzaju drobnoustroju oraz ustalają badawcze metody odniesienia (13).

Celem tego opracowania było przedstawienie zasad organizacji badań biegłości oraz ocena i analiza kompetencji laboratoriów wykonujących badania mikrobiologiczne mleka i produktów mlecznych w oparciu o wyniki badania biegłości zorganizowane przez ZHZ PIWet-PIB w latach 2008–2014.

Organizacja badań biegłości

W ciągu siedmiu lat zorganizowano 12 rund badań biegłości. Ich zakres obejmował kierunki jakościowe – wykrywanie obecności *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, koagulazo-dodatnich *Staphylococcus* spp., enterotoksyn

gronkowcowych oraz badania ilościowe: oznaczanie liczby koagulazo-dodatnich *Staphylococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, β -glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli* oraz bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (tab. 1).

W latach 2008–2010 badania biegłości przeprowadzane były w oparciu o wytyczne zawarte w przewodnikach ISO/IEC 43–1:1997 „Badania biegłości poprzez porównania międzylaboratoryjne” oraz ILAC-G13:08/2007 „ILAC Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Scheme” (14, 15). Od 2011 r. PT były natomiast realizowane zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17043:2011 „Ocena zgodności. Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości” (5, 16).

Program badań biegłości składał się z wielu etapów i obejmował m.in.: opracowanie regulaminu uczestnictwa dostępnego na stronie www.piwet.pulawy.pl, przygotowanie materiału badawczego, z jednoczesnym sprawdzeniem jednorodności i stabilności próbek, opracowanie dokumentacji dla uczestników (formularza zgłoszeniowego, instrukcji postępowania z materiałem badawczym, karty wyników danego kierunku w badaniach biegłości), rozesłanie obiektów badań, otrzymanie wyników i ocenę rezultatów. Na koniec wyniki uczestników poddano analizie statystycznej, opracowano je graficznie i sporządzono sprawozdanie z badań (5).

Jako matryce do badań biegłości najczęściej wykorzystywano ser twarogowy, mleko w proszku oraz mleko pasteryzowane. Próbkę tę sprawdzono w kierunku obecności i/lub liczby drobnoustrojów docelowych oraz obecności substancji przeciwbakteryjnych. Materiał do badań fortyfikowano zwykle odpowiednią objętością wybranego rozcieńczenia hodowli bulionowej drobnoustroju (toksyny) do uzyskania oczekiwanego poziomu zanieczyszczenia i/lub używano matrycy z liofilizatem zawierającym drobnoustroje docelowe. Do tego celu wykorzystano szczepy bakteryjne z kolekcji American Type Culture Collection (ATCC), pochodzące

z Banku Szczepów Zakładu Mikrobiologii PIWet-PIB oraz enterotoksynę gronkowcową A i/lub B uzyskaną ze *Staphylococcus aureus* (Sigma-Andrich). W zależności od organizowanej rundy badania biegłości i sposobu przygotowania próbek, materiał do badań poddawano procesowi liofilizacji bądź utrwaleniu konserwantem.

Jednorodność i stabilność próbek dla ilościowych kierunków badań sprawdzono zgodnie z procedurą zawartą w aneksie B normy ISO 13528:2005, a dla kierunków jakościowych na podstawie wytycznych w dokumencie Harmonised protocol for the proficiency testing of analytical laboratories (17, 18). Jednorodność materiału dla każdego kierunku badania oceniano poprzez zbadanie po 10 losowo wybranych próbek z każdego rodzaju (poziomu zanieczyszczenia) w warunkach powtarzalności. Badanie to wykonywane było przed rozseparowaniem próbek uczestnikom badania biegłości. Ocenę stabilności przeprowadzano dla 3 próbek z każdego rodzaju (poziomu zanieczyszczenia), wykonując dwa równoległe oznaczenia w dniu przeprowadzania analiz przez laboratoria uczestniczące w badaniach biegłości.

Zakodowane próbki przed dystrybucją były przechowywane w odpowiedniej temperaturze (chłodziarka i/lub zamrażarka), które następnie przesłano uczestnikom przesyłką kurierską, w termoopakowaniu styropianowym z wkładami chłodzącymi oraz instrukcją postępowania z próbką. Badanie ilościowe należało rozpocząć w dniu otrzymania próbek, natomiast badanie jakościowe w ciągu 24 godzin od ich dostarczenia.

Organizator badania biegłości zagwarantował każdemu laboratorium anonimowość, poprzez nadanie indywidualnego numeru identyfikacyjnego (kodu). Uczestnicy zobowiązani byli do przestrzegania ustalonych terminów, poczynając od wysłania formularza zgłoszeniowego do nadesłania wyników badania zgodnie z harmonogramem badania biegłości. Przeprowadzali analizy nadesłanych próbek żywności przy zastosowaniu metod, rutynowo stosowanych w bieżącej pracy laboratoryjnej, podawali informacje dotyczące postępowania z próbką oraz szczegółowe dane odnośnie do zastosowanej procedury badawczej.

Kryteria oceny wyników badania biegłości

Wyniki uzyskane przez uczestników badań biegłości zostały poddane analizie statystycznej zgodnie z normą ISO 13528 (17). Obliczono wartość odchylenia standardowego dla oceny biegłości oraz wartość przypisaną i jej niepewność (niepewność standardowa u_x).

Tabela 1. Ocena laboratoriów w badaniach biegłości w latach 2008–2014

Kierunek badania	Runda/rok	Liczba laboratoriów uczestniczących	Odsetek lub liczba laboratoriów z oceną pozytywną
Wykrywanie <i>Salmonella</i> spp.	05/2008	24	100%
	D1/2009	25 ⁽¹⁾	96%
	03/2010	25	92%
	01/2014	35 ⁽²⁾	97%
Wykrywanie <i>Listeria monocytogenes</i>	05/2008	24 ⁽³⁾	100%
	01/2011	19 ⁽³⁾	72%
	01/2014	29 ⁽²⁾	100%
Wykrywanie koagulazo-dodatnich <i>Staphylococcus</i> spp.	05/2008	12	100%
Wykrywanie enterotoksyn gronkowcowych	02/2008	4	4
	D2/2009	2	2
	02/2010	2	1
	03/2011	5	5
	03/2012	3	3
	04/2014	3	3
Liczba koagulazo-dodatnich <i>Staphylococcus</i> spp.	05/2008	22	82%
	02/2010	20	100%
	03/2011	18	94%
	03/2012	18	94%
	03/2013	23	91%
Liczba <i>Listeria monocytogenes</i>	01/2011	17 ⁽³⁾	75%
Liczba β -glukuronidazo-dodatnich <i>Escherichia coli</i>	03/2010	25	100%
	04/2014	25	96%
Liczba <i>Enterobacteriaceae</i>	03/2013	24 ⁽⁴⁾	91%

Objaśnienia: ⁽¹⁾ dwa laboratoria nie przesłały wyników; ⁽²⁾ jedno laboratorium nadesłało wyniki po terminie; ⁽³⁾ jedno laboratorium nie przesłało wyniku; ⁽⁴⁾ jedno laboratorium wycofało się z badań

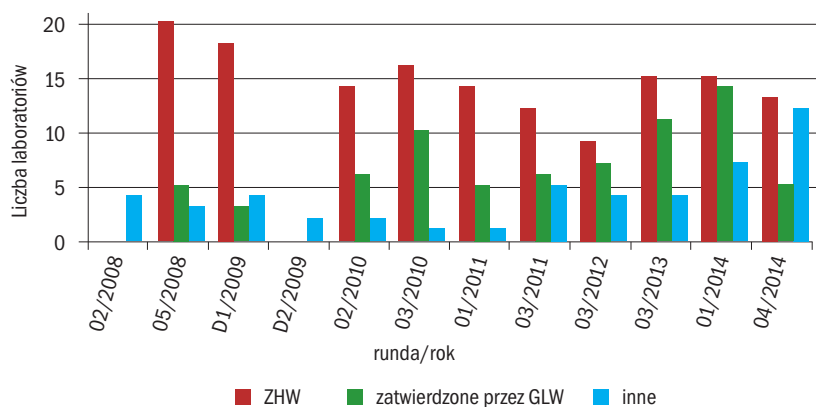
Do oceny wyników badań ilościowych zastosowano wskaźnik z' lub z , których wartości obliczono dla każdego wyniku zgodnie ze wzorami $z = (\chi - X) / \sigma$ lub $z' = (\chi - X) / \sqrt{\sigma^2 + u_x^2}$, gdzie: χ – wynik laboratorium; X – wartość przypisana; σ – odchylenie standardowe wszystkich wyników; u_x – niepewność standardowa wartości przypisanej X . Parametr z' stosowany był w przypadkach, gdy wartość niepewności standardowej nie spełniła kryterium $u_x \leq 0,3 \sigma$. Na podstawie wymienionych wskaźników oceniano osiągnięte rezultaty laboratoriów uczestniczących w badaniach biegłości: $|z| \leq 2$ wynik zadowalający; $2 < |z| < 3$ wynik wątpliwy; $|z| \geq 3$ wynik niezadowalający. Wyniki badań jakościowych porównywane były z wartością przypisaną oznaczoną przez organizatora badania biegłości. Ogólna ocena laboratorium biorącego udział w badaniach biegłości, w odniesieniu do danych kierunku badań, zależała od osiągniętych rezultatów i przyjęto, że laboratorium uzyskiwało ocenę negatywną nawet przy jednym wyniku niezadowalającym (badanie ilościowe) lub niezgodnym (badanie jakościowe).

Wyniki badań biegłości

Uczestnikami badania biegłości były Zakłady Higieny Weterynaryjnej (ZHW), laboratoria zatwierdzone przez Głównego Lekarza Weterynarii (GLW) do wykonywania badań dla celów kontroli urzędowych, a także inne laboratoria prowadzące rutynowe badania żywności, m.in. Stacje Sanitarne-Epidemiologiczne, laboratoria prywatne czy laboratoria zakładów mleczarskich.

Na ryc. 1 przedstawiono liczbę laboratoriów uczestniczących w poszczególnych rundach badań biegłości. Było to najczęściej od 20 do 36 laboratoriów w danej rundzie. Największy udział wykazały ZHW, których odsetek w poszczególnych rundach wahał się od 42 do 72%, następnie laboratoria zatwierdzone przez Głównego Lekarza Weterynarii (od 12 do 39%).

W rundach badań dotyczących wykrywania *Salmonella* spp. brało udział 24–35 laboratoriów, *L. monocytogenes* od 19 do 29, a w przypadku identyfikacji koagulazo-dodatnich *Staphylococcus* spp. udział wzięło 12 laboratoriów. Liczba uczestników w kierunku wykrywania



Ryc. 1. Liczba laboratoriów biorących udział w poszczególnych rundach badania biegłości

enterotoksyn gronkowcowych wyniosła od 2 do 5, w zależności od danej rundy. W badaniach ilościowych dotyczących oznaczania liczby koagulazo-dodatnich *Staphylococcus* spp. brało udział od 18 do 23 laboratoriów, natomiast w pozostałych kierunkach było to w zakresie od 17 do 25 uczestników.

W każdej rundzie badania biegłości uczestnicy otrzymali próbki zgodnie z harmonogramem badań, a w przypadku jednej rundy kilku uczestników zgłosiło zastrzeżenia co do ich stanu (próbki były zamrożone), jednak nie miało to wpływu na wynik badań żadnego laboratorium. W sześciu przypadkach laboratoria rozpoczęły badania ilościowe w terminie niezgodnym z harmonogramem, który przewidywał przeprowadzenie oznaczenia w dniu otrzymania próbek. Z kolei w oznaczeniach jakościowych jedno laboratorium nie podjęło badania w wyznaczonym terminie, czyli w ciągu 24 godz. od otrzymania próbek. W pięciu przypadkach laboratoria nie przesyłały wyników, mimo zadeklarowanej chęci wzięcia udziału w badaniach biegłości i odebrania próbki, jedno laboratorium zrezygnowało z przeprowadzenia analizy, a jedno nadesłało wyniki po terminie wskazanym w regulaminie. Laboratoria te nie zostały uwzględnione w ocenie (tab. 1).

Odsetek laboratoriów, które uzyskały pozytywny wynik w badaniach biegłości w badaniach jakościowych, w różnych rundach wyniósł od 72 do 100%, natomiast w ilościowych od 75 do 100%. W przypadku sześciu rund zorganizowanych w zakresie wykrywania enterotoksyn gronkowcowych tylko jedno laboratorium uzyskało ocenę negatywną. Biorąc pod uwagę kierunek badań, odsetek laboratoriów z wynikiem pozytywnym wyniósł odpowiednio 93%, 95%, 96% i 100% przy wykrywaniu *L. monocytogenes*, enterotoksyn gronkowcowych, *Salmonella* spp. i *Staphylococcus* spp. oraz odpowiednio 75%, 91%, 92% i 98% w przypadku oznaczania liczby *L. monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*,

Staphylococcus spp. i *E. coli*. Odsetek ten w przypadku laboratoriów ZHW był wyższy i wyniósł 96% (obecność *L. monocytogenes*) oraz 100% (obecność *Salmonella* spp.). Wyniki laboratoriów ZHW w zakresie wykrywania enterotoksyn gronkowcowych i *Staphylococcus* spp. były w pełni zgodne z wartością przypisaną. Podobnie w badaniach ilościowych odsetek laboratoriów ZHW z wynikiem pozytywnym był wyższy i wyniósł dla poszczególnych kierunków badań odpowiednio 86% (liczba *L. monocytogenes*), 94% (liczba *Staphylococcus* spp.), 100% (liczba *Enterobacteriaceae* i *E. coli*). Jako metody badawcze laboratoria stosowały przede wszystkim metody referencyjne, zgodnie z wymaganiami rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005. Stanowiły one od 20 do 100% dla kierunków jakościowych oraz od 83 do 100% dla oznaczeń ilościowych. Metody alternatywne stosowano znacznie rzadziej i były to techniki ELFA czy PCR wykorzystywane do wykrywania obecności *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes* lub testy 3M Petrifilm i TEMPO w oznaczeniach ilościowych. Odsetek laboratoriów posiadających akredytację metod badawczych, którymi posługiwały się w badaniach biegłości, wyniósł od 60 do 100%.

Podsumowanie

Organizacja badań biegłości jest procesem pracochłonnym, począwszy od przygotowania planu badań biegłości do opracowania raportu z badań. Każdego roku badania biegłości organizowane przez ZHZ PIWet-PIB obejmowały najczęściej dwie rundy i zazwyczaj dwa kierunki, w odniesieniu do przyjętych kryteriów mikrobiologicznych dla mleka i produktów mlecznych przedstawionych w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005. Analiza wyników z przeprowadzonych w latach 2008–2014 dwunastu rund badań biegłości pozwoliła organizatorowi w obiektywny sposób ocenić pracę danego laboratorium na tle wyników uzyskanych przez

inne laboratoria. Zorganizowane badania wykazały, że odsetek laboratoriów, które uzyskały pozytywną ocenę w zależności od rodzaju badań wyniósł 95% dla oznaczeń jakościowych i 92% dla ilościowych. Odsetek ZHW z pozytywną oceną sięgał 98% (badania jakościowe) i 95% (badania ilościowe). Na tej podstawie można stwierdzić, iż laboratoria urzędowe oraz inne laboratoria prowadzące rutynowe badania żywności prawidłowo wykonują badania w zakresie mikrobiologii mleka i produktów mlecznych.

Piśmiennictwo

1. PN-EN ISO/IEC 17025. Ogólne wymagania dotyczące laboratoriów badawczych i wzorujących.
2. Buckle T.: Analiza wyników analitycznych, czyli badania biegłości. *Analityka* 2001, 1, 18–21.
3. Jędrzejczak R.: Rola badań biegłości w zapewnieniu jakości analizy żywności. *Analityka* 2005, 1, 34–39.
4. Konieczka P., Namieśnik J.: *Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007.
5. PN-EN ISO/IEC 17043:2011. Ocena zgodności. Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości.
6. Juniper I. R.: Quality issues in proficiency testing. *Accred. Qual. Assur.* 1999, 4, 336–341.
7. Stang H.L., Anderson N.L.: Use of proficiency testing as tool to improve quality in microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Newsl.* 2013, 35, 145–152.
8. Bułska E., Bienkowski P.: Udział laboratorium w porównaniach międzylaboratoryjnych. *Analityka* 2009, 49–51.
9. Matras T.: Badania biegłości i porównania międzylaboratoryjne (PT/ILC). *LAB Lab. Apar. Bad.* 2010, 3, 31–33.
10. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z 18 kwietnia 2012 r. sprawie krajowych laboratoriów referencyjnych. Dz.U. z 2014, poz. 256 z późn. zm.
11. Rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regulami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt. Dz.U. UE L 191/1 z 30.04.2004.
12. Ustawa z dnia 29 stycznia 2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej. Dz.U. z 2004 nr 33 poz. 287 z późn. zm.
13. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz.U. L 338 z 22.12.2005 z późn. zm.
14. Przewodnik ISO/IEC 43–1:1997. Badanie biegłości poprzez porównania międzylaboratoryjne. Część 1: Projektowanie i realizacja programów badania biegłości.
15. ILAC-G13:08/2007. ILAC guidelines for the requirements for the competence of providers of proficiency testing scheme.
16. Komunikat Polskiego Centrum Akredytacji nr 79 z 8.03.2011 r. w sprawie okresu przejściowego związanego z opublikowaniem normy PN-EN ISO/IEC 17043:2011 (<http://www.pca.gov.pl/doc/komunikaty/KOMUNIKAT-NR-79.pdf>).
17. ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons
18. Thompson M., Wood R.: The harmonised protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem.* 2006, 78, 145–196.

Dr Jolanta G. Rola, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: jolarola@piwet.pulawy.pl