

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΑ ΟΔΗΓΙΑ
ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ
ΓΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ
ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΕΣΥΔ ΚΟ-ΜΙΚΡΟΒΙΟΛ

Έκδοση: 01

Αναθεώρηση: 01

Ημερομηνία Έκδοσης: 20-6-2007

Ημερομηνία Αναθεώρησης: 09-07-2008

Υπεύθυνος Έκδοσης: Ο Υπεύθυνος Διαχείρισης της Ποιότητας

Υπεύθυνος Έγκρισης: Ο Πρόεδρος του Ε.ΣΥ.Δ.

Ο Υπεύθυνος Διαχείρισης Ποιότητας

Ο Πρόεδρος του Ε.ΣΥ.Δ.

1. Σκοπός

Σκοπός της Οδηγίας αυτής είναι να επισημάνει ορισμένα σημεία με σκοπό την επεξήγηση τεχνικών ζητημάτων όσον αφορά τις μικροβιολογικές δοκιμές νερού και τροφίμων. Το κείμενο αποτελεί απόρροια εμπειριών από μη συμμορφώσεις που έχουν προκύψει στις κατά καιρούς αξιολογήσεις των μικροβιολογικών εργαστηρίων και σε καμία περίπτωση δεν αντικαθιστά το ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025:2005 και τη βασική κατευθυντήρια οδηγία EA-04/10. Επίσης, επισημαίνονται ορισμένες ιδιαιτερότητες της εφαρμογής του ISO/IEC 17025:2005 στην αξιολόγηση των μικροβιολογικών δοκιμών.

2. Ορισμοί

Ως **πρότυπες μέθοδοι** θεωρούνται οι μέθοδοι ISO και οι μέθοδοι που προτείνονται από διεθνώς καθιερωμένους οργανισμούς (AFNOR, AOAC, NMKL, Nordic Committed of Food Analysis, Esbo, Finland, EPA, International Dairy Federation, Brussels).

Ως **τροποποιημένες μέθοδοι** θεωρούνται μέθοδοι που στοχεύουν στην ανίχνευση του ίδιου μικροοργανισμού και στο ίδιο υπόστρωμα (matrix) αλλά έχουν μικρές τροποποιήσεις σε σχέση με την αντίστοιχη επίσημη μέθοδο (π.χ. αλλαγή στην θερμοκρασία επώασης, άλλο θρεπτικό υπόστρωμα πρώτης απομόνωσης κ.λ.π.). Επίσης, ο συνδυασμός πρότυπων μεθόδων, οδηγεί στη δημιουργία τροποποιημένων μεθόδων, εκτός από την περίπτωση που η μέθοδος συμπληρώνεται ως προς την ταυτοποίηση ή επιβεβαίωση από άλλη πρότυπη μέθοδο.

Ως **εσωτερικά αναπτυγμένα (in-house)** θεωρείται μια μέθοδος που έχει αναπτυχθεί εξ ολοκλήρου από το εργαστήριο.

Ως **ισοδύναμες μέθοδοι** θεωρούνται δύο ποσοτικές μέθοδοι όταν η μέση σχετική διαφορά των μετρήσεων μετά το στάδιο της επιβεβαίωσης βρεθεί «μη σημαντικά διαφορετική», σύμφωνα με υπολογισμούς που καθορίζονται από το ISO 17994.

3. Διευκρινίσεις σε ορισμένα τεχνικά θέματα

Παρακάτω αναφέρονται πρότυπα και οδηγίες στην εφαρμογή των οποίων τα εργαστήρια παρουσιάζουν συχνά μη συμμορφώσεις, σύμφωνα με την εμπειρία των αξιολογητών του ΕΣΥΔ. Παρατίθενται επίσης ορισμένες διευκρινιστικές παρατηρήσεις όπου και εφόσον απαιτείται. Οι παρατηρήσεις δεν καλύπτουν ολοκληρωτικά ούτε αντικαθιστούν τα αναφερόμενα πρότυπα. Επίσης, προτείνονται ερμηνευτικά κείμενα/δημοσιεύσεις (χωρίς υποχρέωση των εργαστηρίων να περιορίζονται σε αυτά).

3.1 Επικύρωση μεθόδων

Σχετικά Πρότυπα/Κείμενα: ISO 16140:2003, ISO/TR 13843:2000, ISO 17994:2004, EA-4/10 §4

Όταν το εργαστήριο χρησιμοποιεί μια πρότυπη ή ισοδύναμη μέθοδο, πρέπει να την επαληθεύσει. Η επαλήθευση είναι μια περιορισμένης έκτασης επικύρωση και πρέπει να περιλαμβάνει κατ' ελάχιστο την εκτίμηση της επαναληψιμότητας, της αναπαραγωγιμότητας και του ορίου ανίχνευσης. Εάν η μέθοδος αφορά συγκεκριμένο είδος δείγματος (π.χ. γάλα) η επαλήθευσή της πρέπει να γίνεται σ'

Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης Α.Ε.

αυτό το είδος δείγματος. Εάν η μέθοδος είναι οριζόντια, το εργαστήριο πρέπει να την επαληθεύει τουλάχιστον για ένα προϊόν από κάθε κατηγορία του Πίνακα του Παραρτήματος. Η μέθοδος πρέπει υποχρεωτικά να επαληθεύεται στα κρίσιμα επίπεδα συγκέντρωσης τουλάχιστον (π.χ. στο νομοθετικό όριο και στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης).

Όταν το εργαστήριο χρησιμοποιεί εσωτερικά αναπτυγμένες (in-house) ή τροποποιημένες μεθόδους απαιτείται πλήρης επικύρωσή τους, είτε από το ίδιο το εργαστήριο, είτε από άλλο φορέα, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των προτύπων ISO 16140:2003 ή ISO/TR 13843:2000. Όταν το εργαστήριο χρησιμοποιεί ισοδύναμες με τις πρότυπες μεθόδους απαιτείται η εκτέλεση άσκησης ισοδυναμίας με τη συμμετοχή τουλάχιστον 6 εργαστηρίων.

- Για τη δημιουργία ενοφθαλμισμένων δειγμάτων, ο ενοφθαλμισμός πρέπει να γίνεται στην 1^η αραίωση.
- Κριτήριο αποδοχής RSD <0.1 ή RSD % <10.
- Αν $R > 2r$ τότε υπάρχει ένδειξη ότι πιθανότατα γίνονται σοβαρά τεχνικά λάθη.

Η επαλήθευση του ορίου ανίχνευσης μπορεί να γίνει με την εξέταση διαδοχικών δεκαδικών (ή άλλου τύπου) αραιώσεων, εναιωρήματος του υπο εξέταση μικροοργανισμού σε τρόφιμο ή νερό, ξεκινώντας από όσο το δυνατό χαμηλότερο πληθυσμό του μικροοργανισμού στόχου. Ο αρχικός πληθυσμός θα πρέπει να είναι γνωστός. Ως όριο ανίχνευσης μπορεί να θεωρηθεί ως ο χαμηλότερος πληθυσμός του μικροοργανισμού που ανιχνεύεται σε συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος. Η ανωτέρω διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (κατ' ελάχιστο έξι (6) μετρήσεις).

3.2 Αβεβαιότητα των μετρήσεων

Σχετικά Πρότυπα/Κείμενα: ISO/TS 19036 (2006), Niemela S (2003), NSH /HPA (2005)

Η εκτίμηση της αβεβαιότητας πρέπει να ενημερώνεται περιοδικά ή εναλλακτικά να ανατροφοδοτείται σε μόνιμη βάση με νέα στοιχεία

Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας τύπου A, με βάση την αναπαραγωγιμότητα και την επαναληψιμότητα, και για τις κατηγορίες 1-4 (τρόφιμα) του Πίνακα του Παραρτήματος, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 δείγματα (ή υλικά αναφοράς) σε ένα προϊόν κάθε κατηγορίας που περιλαμβάνεται στις δραστηριότητες του εργαστηρίου. Για τις κατηγορίες 5-7 (νερά-λύματα) του ίδιου Πίνακα χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 φυσικά δείγματα (ή υλικά αναφοράς).

Για την εκτίμηση τύπου B πρέπει να αξιολογούνται όλες οι πιθανές πηγές αβεβαιότητας (π.χ. από τον ογκομετρικό εξοπλισμό, τους ζυγούς, τις παρτίδες υλικών, τις αραιώσεις και άλλες πηγές). Πρέπει να αποδεικνύεται ότι έχει εκτιμηθεί επίπτωση στην αβεβαιότητα των μη μετρήσιμων παραμέτρων (π.χ. ομοιογένεια δείγματος, λήψη υποδείγματος, καθορισμός κανόνων υποδειγμάτισης ανάλογα με την φύση του δείγματος, ποικιλία και φύση επιμέρους συστατικών, αναφορά στα πιστοποιητικά, κλπ). Οι συνιστώσες της αβεβαιότητας που τεκμηριωμένα συνεισφέρουν στην συνολική αβεβαιότητα λιγότερο από το 1/4 ή 1/5 της μεγαλύτερης συνιστώσας μπορούν να αγνοούνται.

Στη συνέχεια πρέπει να υπολογίζεται η συνδυασμένη και η διευρυμένη αβεβαιότητα της μεθόδου στο σχετικό επίπεδο εμπιστοσύνης, συνήθως 95%, για τις μικροβιολογικές δοκιμές.

3.3 Σχήματα δοκιμών ικανότητας

**Σχετικά Πρότυπα/Κείμενα: ΕΣΥΔ ΠΔΙ, Tillet et all, 2000
(Ίδε ΠΔΙ, παρ. 3.5)**

Αποτυχία σε μία διανομή δεν τεκμηριώνει ανεπάρκεια του εργαστηρίου αλλά πρέπει να διερευνάται. Ασφαλής αξιολόγηση γίνεται αφού το εργαστήριο συμμετάσχει σε 3 διανομές τουλάχιστον ή σε λιγότερες διανομές που περιλαμβάνουν περισσότερα δείγματα. Συνιστάται, στην περίπτωση του πρώτου αποτυχημένου διεργαστηριακού το εργαστήριο να συμμετάσχει την επόμενη χρονιά σε ικανό αριθμό διανομών ώστε να μπορεί να γίνει έγκαιρα ασφαλής εξαγωγή συμπερασμάτων.

4. Βιβλιογραφία

1. NSH /HPA (2005). Uncertainty of measurement in testing. QSOP 4. National Standard Method. Guidance note.
2. Niemela S (2003): Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Nordic Committee of Food Analysis. NMKL. Report no 1, 2nd edition
3. Tillet H.E., Lightfoot N.E, Eaton S. and Place B.M (2000): External quality assessment of microbiological counts form water. To score or not to score for proficiency. The Journal of the chartered institution of water and environmental management.
4. ISO 17994:2004 Water quality-Criteria for establishing the equivalency of two microbiological methods.
5. ISO 13843:2000 Water quality- Guidance on the validation of microbiological methods.
6. EA-04/10 Accreditation for microbiological laboratories.
7. ISO 19036:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
8. ISO 16140: 2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs-protocol for the validation of alternative method.
9. NSH/HPA:2005 Uncertainty of measurement in testing. QSOP 4.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ

Κατηγορίες υποστρωμάτων για δείγματα τροφίμων και νερού (ISO 19036:2006)

Κατηγορία 1	υγρά τρόφιμα και τρόφιμα σε σκόνη (π.χ. γάλα, γάλα σε σκόνη κλπ)
Κατηγορία 2	ομοιογενή στερεά τρόφιμα (π.χ. κιμάς, προϊόντα με βάση το κρέας, αλλαντικά, μηχανικά διαχωρισμένο κρέας, σαντιγύ, παγωτά κλπ)
Κατηγορία 3	μικρά στερεά τρόφιμα π.χ. αποξηραμένα αρτύματα (μαϊντανός, ρίγανη κλπ),μανιτάρια, τριμμένα καρότα, γαρίδες, δημητριακά, ξηροί καρποί κλπ
Κατηγορία 4	τα υπόλοιπα τρόφιμα (κρέας, ιχθυρά, τυριά, γλυκά κλπ)
Κατηγορία 5	Πόσιμα νερά, επιφανειακά και νερό κολυμβητηρίων
Κατηγορία 6	Θαλάσσια νερά
Κατηγορία 7	Λύματα