

# Badanie biegłości laboratoriów oceny mleka surowego poprzez porównania międzylaboratoryjne

JOLANTA G. ROLA

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego  
Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Rola J. G.

## Proficiency testing of raw milk analytical laboratories by interlaboratory comparisons

Summary

This paper describes proficiency testing of laboratories evaluating the hygienic quality of raw milk. In the years 1999–2004, 21–89 laboratories participated in the interlaboratory studies, including the coordinator of the project, the National Veterinary Research Institute, Department of Hygiene of Food of Animal Origin in Puławy. The samples for analysis were prepared by the coordinator. Interlaboratory comparisons were performed according to ISO/IEC Guide 43-1:1997. Milk samples were analyzed for the total number of microorganisms using an instrumental method (BactoScan, Bactocount), Petrifilm method and plate count method. Samples were analyzed for somatic cell counts using the fluoro-opto-electronic method (Fossomatic, Somacount) and for freezing point using the cryoscop method. The presence of antibiotics was detected by routine standard methods. The results were evaluated by the z-score and were defined as unsatisfactory, questionable or satisfactory. In all ring trials and methods laboratories obtained satisfactory results as well as questionable and unsatisfactory results. Proficiency testing results indicated that 63–91% laboratories (instrumental method), 83–100% laboratories (Petrifilm method), 67–83% laboratories (plate count method), 56–93% laboratories (fluoro-opto-electronic method) and 53–91% laboratories (krioskop method) obtained satisfactory results. The presence or absence of antibiotics were correctly detected by 83–100% laboratories.

**Keywords:** raw milk, laboratory proficiency testing

Higieniczna jakość mleka surowego oceniana jest na podstawie takich kryteriów, jak: ogólna liczba drobnoustrojów (OLD) i liczba komórek somatycznych (LKS) w 1 ml mleka, obecność antybiotyków lub innych substancji bakteriostatycznych. Ponadto mleko powinno być regularnie sprawdzane, czy nie zostało zafałszowane – rozwodnione poprzez kontrolę punktu zamrażania (11, 14). Badania te, obok badań składu chemicznego mleka, wykonywane są w laboratoriach zakładów mleczarskich, laboratoriach prywatnych, a także w laboratoriach Krajowego Centrum Hodowli Zwierząt i Inspekcji Weterynaryjnej. Uzyskane wyniki badań są dowodem spełnienia gwarantujących bezpieczeństwo żywności wymagań prawnych oraz stanowią podstawę płatności za mleko (14, 15). Ze względu na wagę prowadzonych badań wyniki pochodzące z tych laboratoriów powinny być rzetelne i wiarygodne. W celu zapewnienia jakości prowadzonych badań laboratoria wdrażają system jakości i poddają się procesowi akredytacji (2, 4). Jednocześnie potwierdzają swoje kompetencje do prowadzenia badań poprzez systematyczny udział w międzylaboratoryjnych badaniach porównawczych (badanie biegłości laboratoriów) (1, 3, 4).

Celem opracowania było przedstawienie zasad organizacji i oceny wyników badań biegłości laboratoriów zajmujących się oceną jakości zdrowotnej mleka surowego.

## Materiał i metody

**Organizator badań.** Badania organizował Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Jednostka ta pełni funkcję krajowego laboratorium referencyjnego ds. mleka i przetworów mlecznych (12, 15).

**Uczestnicy.** Do udziału w porównaniach międzylaboratoryjnych zapraszano laboratoria zajmujące się oceną mleka surowego (laboratoria prywatne, zakładów mleczarskich, Inspekcji Weterynaryjnej, Krajowego Centrum Hodowli Zwierząt). W badaniach w latach 1999–2004 uczestniczyło od 21 do 89 laboratoriów badawczych, w tym organizator badań. Udział w badaniach był początkowo dobrowolny, obecnie jest obligatoryjny. Uczestnikom badań zapewniono anonimowość poprzez nadanie laboratoriom numerów kodowych.

**Organizacja badań.** Badania biegłości obejmowały następujące kierunki badań: oznaczanie ogólnej liczby drobn-

ustrojów, liczby komórek somatycznych i punktu zamarzania (badania ilościowe) oraz wykrywanie antybiotyków i innych substancji hamujących (badania jakościowe) metodami stosowanymi w badaniach rutynowych przez oceniane laboratoria (7-10, 13). Próbkę do badań przygotował organizator badań. Były to próbki mleka surowego i/lub pasteryzowanego, (schłodzone do temperatury 4°C, zamrożone lub utrwalone konserwantem w zależności od kierunku i metody badań) o objętości ok. 50 ml każda. Do oznaczania antybiotyków stosowano próbki fortyfikowane roztworem wzorcowym wybranego antybiotyku. Próbkę kontrolną przekazano uczestnikom wraz z instrukcją postępowania zawierającą informacje o liczbie i rodzaju próbek, sposobie transportu, zakresie i metodach badań, formie przekazania wyników badań oraz terminie wykonania i przesyłania wyników. Analizę próbek należało wykonać w ciągu 24-48 godz. od ich przekazania. Próbkę transportowano i przechowywano do momentu analizy w ustalonych warunkach (chłodziarka i/lub zamrażarka), zabezpieczających próbkę przed zniszczeniem. Przygotowanie próbki do analizy przeprowadzono wg podanej instrukcji i zgodnie z stosowaną procedurą badawczą.

**Analiza statystyczna wyników.** Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem przeznaczonych do tego typu badań testów (1, 3, 5, 6, 16). Z podanych przez laboratoria wyników analiz dla każdej badanej cechy i próbki wyliczono średnią, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności. Wyniki odbiegające odrzucano testem statystycznym. Stosowano test Dixona lub MAD (Median Absolute Deviation) (5, 16). Dla pozostałych wyników wyliczono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe i przedział ufności. Do kwalifikacji wyników analiz wykorzystano wartość z-score. Wartości z-score obliczano oddzielnie dla każdego laboratorium i każdego wyniku zgodnie ze wzorem  $z = (x_i - X)/s$ , gdzie:  $x_i$  – pojedynczy wynik analizy próbki (średnia z 2 lub 5 powtórzeń);  $X$  – wartość „prawdziwa”, wyznaczona (średnia wartość wyników wszystkich laboratoriów w danej turze badań, po odrzuceniu wyników odbiegających lub wartość ustalona przez laboratorium referencyjne);  $s$  – odchylenie standardowe. Interpretacja wartości z-score: wartość w zakresie od -2 do +2, wyniki laboratorium ocenia się jako zadowalające, dobre; między 2 a 3 wyniki ocenia się jako wątpliwe; wartość niższa od -3 lub wyższa od +3 wskazuje na wyniki niezadowalające, złe.

Tab. 1. Wynik oceny laboratoriów w badaniach międzylaboratoryjnych

Kierunek badania/metoda	Tura badań	Liczba laboratoriów	Liczba laboratoriów/odsetek z wynikiem zadowalającym	Liczba laboratoriów/odsetek z wynikiem wątpliwym	Liczba laboratoriów/odsetek z wynikiem niezadowalającym
OLD metoda instrumentalna	1	16	10/63	1/6	5/31
	2	17	13/76	2/12	2/12
	3	22	20/91	2/9	0/0
	4	26	19/73	3/12	4/15
	5	38	33/87	3/8	2/5
	6	32	29/91	1/3	2/6
OLD metoda Petrifilm	1	5	5/100	0/0	0/0
	2	5	5/100	0/0	0/0
	3	6	6/100	0/0	0/0
	4	6	5/83	1/17	0/0
	5	5	5/100	0/0	0/0
	6	12	10/83	1/8	1/8
OLD metoda płytkowa w temp. 30°C	1	15	10/67	1/7	4/27
	2	13	10/77	2/15	1/8
	3	15	13/87	1/7	1/7
	4	18	14/78	2/11	2/11
	5	15	13/87	2/13	0/0
	6	18	15/83	2/11	1/6
LKS metoda instrumentalna	1	18	10/56	3/17	5/28
	2	17	14/82	2/12	1/6
	3	25	21/84	2/8	2/8
	4	31	26/84	3/10	2/6
	5	39	34/87	3/8	2/5
	6	43	40/93	2/5	1/2
PZ metoda krioskopowa	1	17	9/53	2/2	6/35
	2	19	15/79	2/10	2/10
	3	27	24/89	2/7	1/4
	4	32	28/88	1/3	3/9
	5	33	30/91	1/3	2/6
	6	44	37/84	3/7	4/10
Wykrywanie antybiotyków	1	nb	nb	nb	nb
	2	nb	nb	nb	nb
	3	nb	nb	nb	nb
	4	36	33/92	1/3	2/6
	5	36	30/83	1/3	5/14
	6	47	47/100	0/0	0/0

Objaśnienia: nb – nie badano, OLD – ogólna liczba drobnoustrojów, LKS – liczba komórek somatycznych, PZ – punkt zamarzania

**Przedstawienie wyników badań.** Wyniki przeprowadzonych badań przekazywano uczestnikom w postaci raportu z badań i omawiano na seminariach podsumowujących badania. Raport zawiera wyniki analiz i wartości



z-score dla wszystkich laboratoriów zestawione w tabelach, a wartości z-score prezentowano także w postaci histogramu.

### Wyniki i omówienie

Wszystkie laboratoria, którym przekazano próbki kontrolne wykonały analizy i przesłały wyniki badań. Przekazane próbki kontrolne analizowano w kierunku ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby komórek somatycznych, punktu zamarzania i obecności antybiotyków. Laboratoria biorące udział w porównaniach, oznaczając ogólną liczbę drobnoustrojów, stosowały metodę instrumentalną (BactoScan, Bactocount), metodę Petrifilm i metodę płytkową w temp. 30°C. Liczba laboratoriów stosujących metodę instrumentalną w zależności od tury badań wynosiła od 16 do 38 laboratoriów. Pozostałe laboratoria wykonywały badania metodą Petrifilm (5-12 laboratoriów) i metodą płytkową (13-18 laboratoriów). Określanie liczby komórek somatycznych było prowadzone metodą fluoro-optoelektroniczną przy użyciu aparatów Fossomatic i Somacount (od 17 do 43 laboratoriów). Oznaczanie punktu zamarzania mleka wykonywane jest w rutynowej ocenie mleka surowego przy użyciu aparatu Milkoscan i metodą krioskopową, pozwalającą także na określenie procentu dodanej wody. W programie badań międzylaboratoryjnych metodą krioskopową zastosowało od 17 do 44 laboratoriów w zależności od tury badań. Przy wykrywaniu antybiotyków w próbkach kontrolnych stosowano jakościową metodę mikrobiologiczną (standardowe testy dyfuzyjne – Szybki test Dyfuzyjny (STD), Polutest M, BR Test, Delvotest) i/lub metodę enzymatyczną (metoda Penzym do wykrywania antybiotyków  $\beta$ -laktamowych) oraz inne testy komercyjne (Beta-star, Charm Farm). Najpowszechniej stosowaną metodą był test dyfuzyjny Delvotest.

Wyniki oceny biegłości laboratoriów w zakresie oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby komórek somatycznych i punktu zamarzania oraz wykrywania obecności antybiotyków przedstawia tab. 1. Bez względu na kierunek badania i zastosowaną metodę laboratoria uzyskiwały wyniki zarówno zadowalające (dobre), jak i wątpliwe lub niezadowalające (złe).

Oznaczając ogólną liczbę drobnoustrojów odsetek laboratoriów, które uzyskały wynik zadowalający metodą instrumentalną wyniósł od 63% w pierwszej turze badań do 91% w szóstej. Świadczy to o mniejszym zróżnicowaniu wyników analiz uzyskiwanych przez poszczególne laboratoria, pomimo wzrostu liczby laboratoriów w kolejnych turach badań. W przypadku laboratoriów posługujących się metodą Petrifilm odsetek wyników zadowalających był nieznacznie wyższy i wynosił 83-100%, metodą płytkową 67-87%.

Analizując wyniki porównań międzylaboratoryjnych w zakresie oznaczania liczby komórek somatycznych stwierdzono stały wzrost odsetka laboratoriów uzyskujących wyniki zadowalające. W pierwszej turze wynik zadowalający uzyskało 56% laboratoriów, a w ostatniej turze badań 93%. Wyraźny wzrost odsetka

laboratoriów uzyskujących wyniki zadowalające stwierdzono także w przypadku oceny wyników oznaczania punktu zamarzania. Odsetek ten wzrósł od 53% w pierwszej turze badań do 91% w piątej.

Odsetek laboratoriów, które uzyskały prawidłowy wynik oznaczania obecności antybiotyków (stwierdziły obecność lub brak antybiotyku w próbkach kontrolnych) zastosowanymi metodami wyniósł w zależności od tury badań od 83% do 100%.

### Podsumowanie

Wyniki prowadzonych regularnie międzylaboratoryjnych badań porównawczych dostarczają informacji na temat stosowanych metod badawczych w ocenie jakości mleka surowego. Umożliwiają systematyczną ocenę biegłości laboratoriów w zakresie wykonywanych analiz na tle wyników uzyskiwanych przez inne laboratoria. Zmniejszający się odsetek laboratoriów uzyskujących wyniki niezadowalające i wątpliwe świadczy o systematycznej pracy laboratoriów nad poprawą jakości wykonywanych badań. Obiektywna, zewnętrzna ocena mobilizuje laboratoria do utrzymywania wysokiej jakości badań, weryfikacji systemów kontroli wewnętrznej i właściwego kształtowania systemu zapewnienia jakości w laboratorium.

### Piśmiennictwo

1. Anon.: Draft International Standard ISO/DIS 13528:2002 (E) statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.
2. Anon.: Norma PN EN – ISO 17025:2001 Ogólne wymagania dotyczące laboratoriów badawczych i wzorcowujących.
3. Anon.: Przewodnik ISO/IEC 43 – 1:1997 Badania biegłości poprzez porównania międzylaboratoryjne. Część 1 Projektowanie i realizacja programów badania biegłości. PKN, Warszawa 2004.
4. Anon.: Przewodnik ISO/IEC 43 – 2:1997 Badania biegłości poprzez porównania międzylaboratoryjne. Część 2 Wybór i wykorzystanie programów badania biegłości przez jednostki akredytujące laboratoria. PKN, Warszawa 2004.
5. Hampel F. R., Ronchetti E. Z., Rousseeuw P. J., Stahel W. A.: Robust Statistics: The approach Based on Influence Functions. Wiley, New York 1986.
6. Ludwicki J. K., Góralczyk K., Czaja K., Struciński P.: Badania biegłości laboratoriów analitycznych – ogólne zasady organizowania i oceny wyników. Roczn. PZH 1995, 2, 105-112.
7. Rola J. G.: Badania biegłości laboratoriów oceny mleka. Roczn. Nauk. Zoot. Supl. 2000, z. 6, 103-107.
8. Rola J. G.: Ocena oznaczania liczby komórek somatycznych i punktu zamarzania w mleku surowym na podstawie międzylaboratoryjnych badań porównawczych. XI Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych. Ann. UMCS, sec. DD, Lublin 2000, vol. LV/A, s. 247.
9. Rola J. G.: Studying the proficiency of milk testing laboratories. Konferencja: Hygiene Alimentorum XXII, Strbske Pleso, Slovakia 2001, s. 121-122.
10. Rola J. G.: Badania biegłości laboratoriów oceny mleka. IV Sesja Przeglądowa Analityki Żywności, Warszawa 2002, s. 48-49.
11. Rola J. G.: Kryteria i metody oceny mleka surowego. PIWet, Puławy 2003.
12. Rola J. G., Wojtoń B.: Work programme of the Polish National Reference Laboratory for Milk and Milk Products. TAIEX Workshop Inter-laboratory testing with regard to hygiene of milk and milk products. Maisons – Alfort, France, Report 2003, Anex D, 1-5.
13. Rola J. G.: Program międzylaboratoryjnych badań porównawczych dla laboratoriów oceny mleka i przetworów mlecznych – organizacja i ocena wyników. V Sesja Przeglądowa Analityki Żywności. Warszawa 2004, s. 18.
14. Rozporządzenie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 sierpnia 2004 r. w sprawie wymagań weterynaryjnych dla mleka oraz produktów mlecznych (Dz. U. Nr 188, poz. 1946).
15. Rozporządzenie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 21 października 2004 r. w sprawie wykazu laboratoriów referencyjnych właściwych dla poszczególnych rodzajów i kierunków (Dz. U. Nr 251, poz. 2513).
16. Wernimont G. T.: Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. AOAC International, Gaithersburg MD, USA 1996, s. 87-141.

Adres autora: dr Jolanta G. Rola, ul. Kaniowczyków 11/2, 24-100 Puławy;  
e-mail: jolarola@piwet.pulawy.pl