



Έλεγχος και Διακρίβωση εξοπλισμού μικροβιολογικού εργαστηρίου νερού-Μέρος 2

μ μ
WATERMICRO WORKSHOP

5&6 μ 2014

μ

N. Πανούσης

διεθνή πρότυπα διακρίβωσης

- DKD-R 5-7 “*Calibration of Climatic Chambers*”, για διακριβώσεις περιβαλλοντικών θαλάμων
- ISO 8655-2 “*Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes*”
- ISO 8655-6 “*Piston-operated volumetric apparatus – Part 6: Gravimetric methods for the determination of measurement error*”
- PTB-Mitteilungen 112 “*Guide for volume determination within the scope of reference measurement procedures in medical reference measurement laboratories, Part 1: Calibration liquid water*”, για ογκομετρικό εξοπλισμό
- LAB GTA 08 COFRAC “*Guide Technique D’Accreditation En Temperature*”, για τα θερμόμετρα
- ASTM International E715 – 80 “*Standard Specification for Gravity –Convection and forced-circulation Water Baths*”, για τα υδατόλουτρα

τυποποίηση διαδικασίας

- το εργαστήριο πρέπει να διαθέτει και να εφαρμόζει τυποποιημένη διαδικασία για τη διακρίβωση και τον έλεγχο καλής λειτουργίας του εξοπλισμού και
- να διαθέτει διαδικασία υπολογισμού της αβεβαιότητας, συνεκτιμώντας όλες τις επιμέρους συνιστώσες



μ μ), (. μ
ISO 17025

παράδειγμα ελέγχου καλής
λειτουργίας ογκομετρικού
εξοπλισμού



πεδίο εφαρμογής ελέγχου

- πιπέτα μεταβλητού όγκου που χρησιμοποιεί το εργαστήριο σε διαπιστευμένη δοκιμή, και ονομαστικού όγκου διανομής **100 μ l**
- επιλογή κατάλληλου εξοπλισμού για την διενέργεια του ελέγχου (απαίτηση ISO 8655-6)

μ	mg	μ μ m mg	μ
1 μ l < V 10 μ l	0,001	0,002	0,002
10 μl < V 100 μl	0,01	0,02	0,02
100 μ l < V 1000 μ l	0,1	0,2	0,2
1 ml < V 10 ml	0,1	0,2	0,2
10 ml < V 200 ml	1	2	2

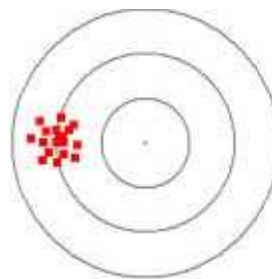
διαδικασία ελέγχου

- ο έλεγχος ακρίβειας των αυτόματων πιπετών σταθερού όγκου γίνεται στον ονομαστικό όγκο
- ο έλεγχος ακρίβειας των αυτόματων πιπετών μεταβλητού όγκου γίνεται στον **ονομαστικό όγκο**, στο **50%** περίπου του ονομαστικού όγκου και στον κατώτερο όγκο του εύρους μέτρησης ή στο **10%** του ονομαστικού όγκου (επιλέγεται ο μεγαλύτερος όγκος)
- πριν την έναρξη της διαδικασίας όπως και στο τέλος της καταγράφονται οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία νερού, βαρομετρική πίεση και υγρασία)
- το κύριο μέρος της διαδικασίας περιλαμβάνει δέκα ζυγίσεις σε κάθε μετρούμενο όγκο και τη μετατροπή των ζυγίσεων σε όγκους με τη βοήθεια του παράγοντα διόρθωσης Z, μια παράμετρος η οποία επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και τη βαρομετρική πίεση

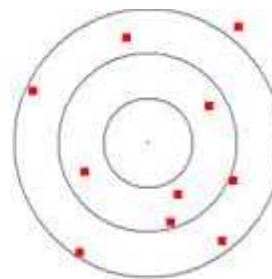
$$V_i = m_i * Z$$

υπολογισμοί

- συστηματικό σφάλμα από τον τύπο $\underline{e}_s = V_{\text{μέσο}} - V_s$ όπου $V_s = 0$
μετρούμενος όγκος ή σε ποσοστό από τον τύπο $e_s = 100 (V_{\text{μέσο}} - V_s) / V_o$
- τυχαίο σφάλμα από τον τύπο $Sr = \sqrt{\Sigma(V_i - V_{\text{μέσο}})^2 / n-1}$ και ως ποσοστό,
από τον συντελεστή μεταβολής CV, χρησιμοποιώντας τον τύπο $CV = 100 * Sr / V_{\text{μέσο}} * V_s / V_o$



Systematic Error



Random Error

αξιολόγηση διαδικασίας

- εάν οι ευρεθείσες τιμές είναι μικρότερες από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια που καθορίζει το πρότυπο η πιπέτα τίθεται προς χρήση χωρίς περιορισμούς, ενώ εάν δεν καλύπτει τις προδιαγραφές για κάποιον από τους ελεγχόμενους όγκους τότε θα πρέπει να υπάρξει η κατάλληλη σήμανση στην ετικέτα ώστε να αποφεύγεται η χρήση της στο συγκεκριμένο όγκο
- ωστόσο σύμφωνα με το πρότυπο ISO 8655-2 η επαλήθευση μιας πιπέτας γίνεται αποδεκτή και στην περίπτωση που το συστηματικό και το τυχαίο σφάλμα ενός μετρούμενου όγκου είναι εκτός των καθορισμένων ορίων για τον συγκεκριμένο όγκο, αρκεί να είναι εντός των ορίων του ονομαστικού όγκου της πιπέτας π.χ. στις πιπέτες μεταβλητού όγκου 10-100 μl το μέγιστο επιτρεπτό συστηματικό σφάλμα είναι $\pm 0,8$ μl και το μέγιστο επιτρεπτό τυχαίο σφάλμα είναι $\pm 0,3$ μl, τα οποία αντιστοιχούν στα 100 μl, για κάθε μετρούμενο όγκο
- **ειδικά όσον αφορά στη χρήση πιπετών για τη διενέργεια αποκλειστικά μικροβιολογικών δοκιμών σε νερά και αν δεν ορίζεται διαφορετικά το κριτήριο αποδοχής για κάθε μετρούμενο όγκο, βάσει του ISO 8199 είναι:**

μ	$\pm 5\%$
-------	-----------

παράδειγμα εσωτερικής
διακρίβωσης θαλάμου
ελεγχόμενης θερμοκρασίας



προϋποθέσεις θαλάμου που υπόκειται σε διακρίβωση

- πρέπει να υπάρχουν αισθητήρες και διατάξεις ελέγχου θερμοκρασίας με ενδείξεις ως συστατικό στοιχείο του θαλάμου
- πρέπει να διασφαλίζεται η ισοστάθμιση της πίεσης στον ωφέλιμο χώρο με την ατμοσφαιρική πίεση
- πρέπει να διαθέτει ενεργή θέρμανση ή/και ψύξη
- επιτρέπεται η διακρίβωση μόνο για ένα σημείο θερμοκρασίας, αλλά το αποτέλεσμα διακρίβωσης θα ισχύει μόνο για το συγκεκριμένο σημείο εργασίας

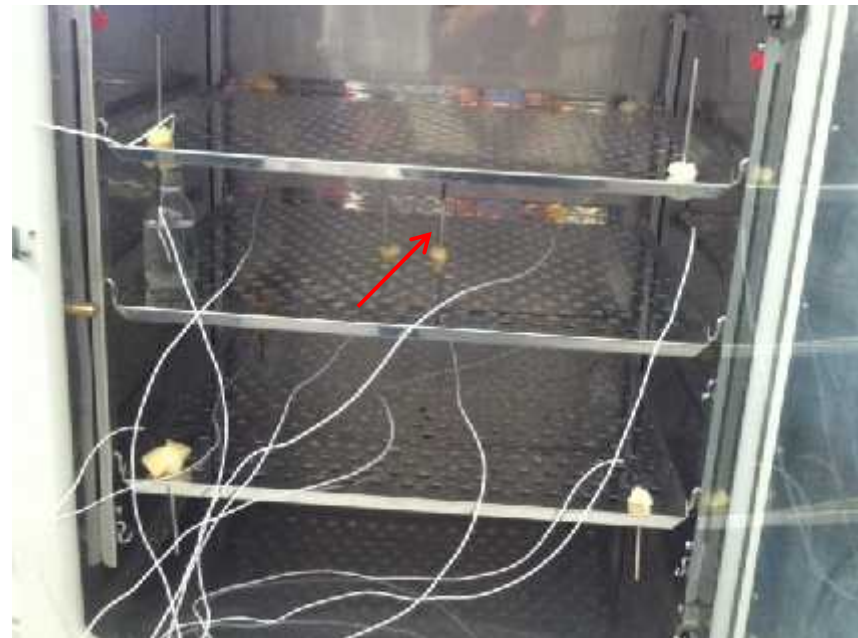
διαδικασία διακρίβωσης θαλάμου θερμοκρασίας

- τοποθέτηση 9 χωρικών σημείων μέτρησης στο εσωτερικό του θαλάμου (8 γωνιακά σημεία & 1 σημείο στο κέντρο) έτσι ώστε να δημιουργείται νοητός κύβος
- τοποθέτηση ενός θερμομέτρου υψηλού συντελεστή απορρόφησης και εκπομπής ($\epsilon > 0.6$)
- όταν ο θάλαμος σταθεροποιηθεί στην θερμοκρασία διακρίβωσης γίνεται καταγραφή των θερμοκρασιών για διάστημα μισής ώρας ανά ένα λεπτό
- από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων καθορίζεται η χρονική αστάθεια, η χωρική ανομοιογένεια, η επίδραση της θερμικής ακτινοβολίας, η διόρθωση ένδειξης ή η απόκλιση μεταξύ του θαλάμου και του προτύπου αναφοράς και υπολογίζεται η αβεβαιότητα της θερμοκρασίας του θαλάμου
- συμπληρώνεται το πιστοποιητικό διακρίβωσης και γίνεται αξιολόγηση αυτού λαμβάνοντας υπόψη τις απαιτήσεις της εκάστοτε μεθόδου δοκιμής (π.χ $44 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ μ *E.coli*)
- το όργανο φέρει ετικέτα με αναγραφόμενη την ημερομηνία διακρίβωσης, την ημερομηνία επόμενης διακρίβωσης καθώς και τη διόρθωση στην ένδειξη του θαλάμου όπου απαιτείται

DKD-R5-7

επιλογή σημείων ελέγχου

- 9 σημεία (8 γωνιακά & 1 σημείο στο κέντρο νοητού κύβου-σημείο αναφοράς)
- μέγιστος ωφέλιμος όγκος
- μέγιστη απόσταση από τα τοιχώματα 5 cm
- 10^ο αισθητήριο για καθορισμό επίδρασης ακτινοβολίας



Μετά την καταγραφή...

- εισαγωγή πρωτογενών δεδομένων σε πρότυπο excel
- υπολογισμός ελάχιστης και μέγιστης θερμοκρασίας κάθε σημείου μέτρησης
- υπολογισμός χωρικής ανομοιογένειας, χρονικής αστάθειας, ακτινοβολίας
- υπολογισμός διόρθωσης ένδειξης κλιβάνου
- υπολογισμός αβεβαιότητας θερμοκρασίας θαλάμου
- αξιολόγηση εργασίας (συμμόρφωση με προδιαγραφή μεθόδου)
- ανάληψη ενεργειών και επανάληψη διαδικασίας αν χρειάζεται
- έκδοση πιστοποιητικού διακρίβωσης θαλάμου

Ισοζύγιο αβεβαιότητας

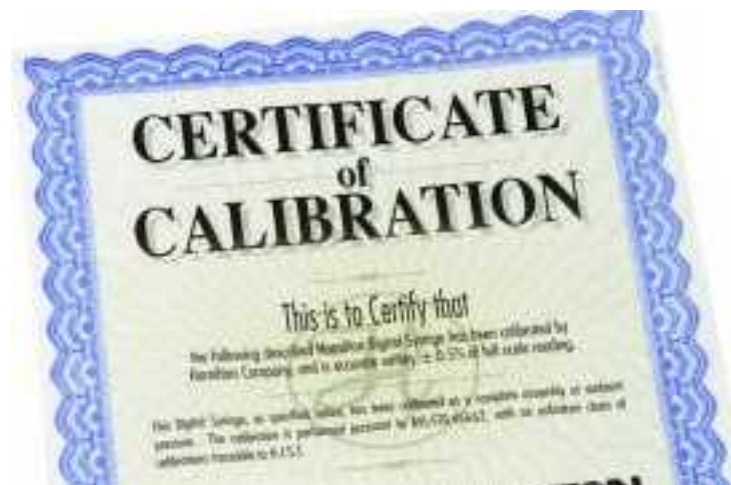
- Παράγοντες που συνεισφέρουν
- **χωρική ανομοιογένεια θερμοκρασίας** (δT_{inhom}) η μέγιστη απόκλιση της θερμοκρασίας ενός γωνιακού ή πλευρικού σημείου μέτρησης από το σημείο αναφοράς μέτρησης
- **χρονική αστάθεια** (δT_{instab}) καθορίζεται με την καταγραφή των θερμοκρασιών για διάστημα 30 min ανά 1 min και ορίζεται ως η μέγιστη απόκλιση της θερμοκρασίας στο σημείο αναφοράς στο διάστημα της μισής ώρας
- **επίδραση της ακτινοβολίας** ($\delta T_{radiation}$) η απόκλιση των δυο θερμομέτρων
- **διακριτική ικανότητα** του θαλάμου (δT_{res}) τελευταίο δεκαδικό ψηφίο της ένδειξης του θαλάμου
- **αβεβαιότητα μέτρησης του πρότυπου θερμομέτρου αναφοράς** (δT_{std}) από το πιστοποιητικό διακρίβωσης

$$\Delta T_{chamber} = T_{Std} - T_{Ind} + u_{T_{Std}} + u_{T_{inhom}} + u_{T_{instab}} + u_{T_{radiation}} + u_{T_{res}}$$

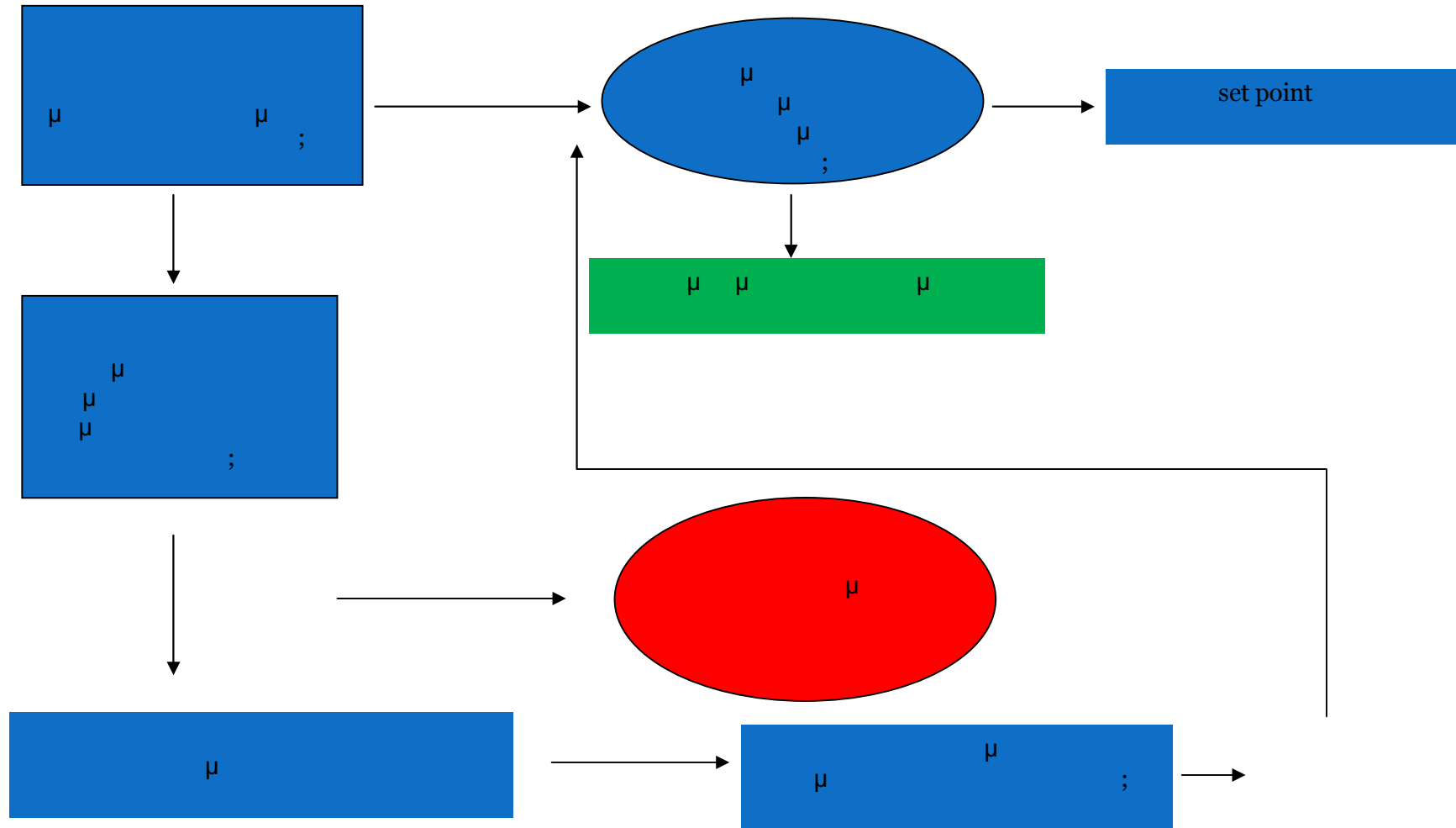
πιστοποιητικό διακρίβωσης θαλάμου

το πιστοποιητικό διακρίβωσης φέρει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

- τον τίτλο «πιστοποιητικό διακρίβωσης»
- ημερομηνία και τόπο διακρίβωσης
- σαφή προσδιορισμό ταυτότητας αντικειμένου που διακριβώθηκε
- προσδιορισμό ταυτότητας μεθόδου και εξοπλισμού
- περιβαλλοντικές συνθήκες
- λεπτομερή περιγραφή της διαδικασίας που ακολουθήθηκε
- αποτελέσματα διακρίβωσης
- αβεβαιότητα μέτρησης

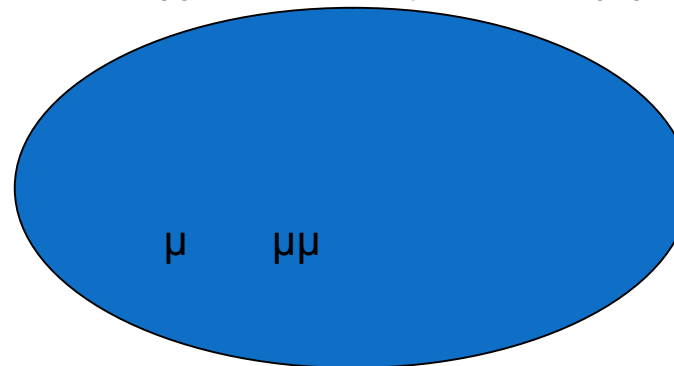


αξιολόγηση αποτελεσμάτων διακρίβωσης θαλάμων ελεγχόμενης θερμοκρασίας



εκτίμηση αποτελεσμάτων εργαστηρίων διακρίβωσης

- το εργαστήριο πρέπει να προκαθορίσει τις απαιτήσεις που έχει από τον εξοπλισμό του
- ανάλυση των στοιχείων που δίνονται σε ένα πιστοποιητικό διακρίβωσης, ώστε να διαπιστωθεί εάν οι παράμετροι του εξοπλισμού είναι εντός των τεθέντων ορίων
- αποδοχή διακρίβωσης ή επανάληψη διαδικασίας μετά από ανάληψη διορθωτικών ενεργειών
- περιορισμοί στη χρήση που προκύπτουν από τα ληφθέντα δεδομένα διακρίβωσης



παράδειγμα αξιολόγησης διακρίβωσης επωαστικού κλιβάνου

- επωαστικός κλίβανος για χρήση στους $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, για την καταμέτρηση καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών, σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 6222:2000
- Δεδομένα διακρίβωσης:
 - αβεβαιότητα: $0,98^{\circ}\text{C}$
 - ομοιομορφία θερμοκρασίας: $0,33^{\circ}\text{C}$
 - σταθερότητα θερμοκρασίας: $0,77^{\circ}\text{C}$
 - διόρθωση ένδειξης: $-0,3^{\circ}\text{C}$

είναι η αβεβαιότητα μικρότερη από την μέγιστη επιτρεπτή απόκλιση;

Βρίσκονται οι θερμοκρασιακές διακυμάνσεις όλων των σημείων εντός ορίων;

:20-24 °C

Set point	μ									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
22	means	21,63	21,46	21,75	21,67	21,76	21,61	21,74	21,96	21,79
	min	20,87	19,48	20,28	21,06	21,16	20,55	19,90	21,43	20,94
	max	22,17	22,32	22,51	22,11	22,19	22,23	22,56	22,34	22,29
μμ	μ									



...άλλο παράδειγμα

- επωαστικός κλίβανος για χρήση στους $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, για την μέθοδο της ανίχνευσης *Salmonella* spp. σε νερά, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 19250:2010
- Δεδομένα διακρίβωσης:
 - αβεβαιότητα: $2,58^{\circ}\text{C}$
 - ομοιομορφία θερμοκρασίας: $2,23^{\circ}\text{C}$
 - σταθερότητα θερμοκρασίας: $0,14^{\circ}\text{C}$
 - διόρθωση ένδειξης: $0,2^{\circ}\text{C}$

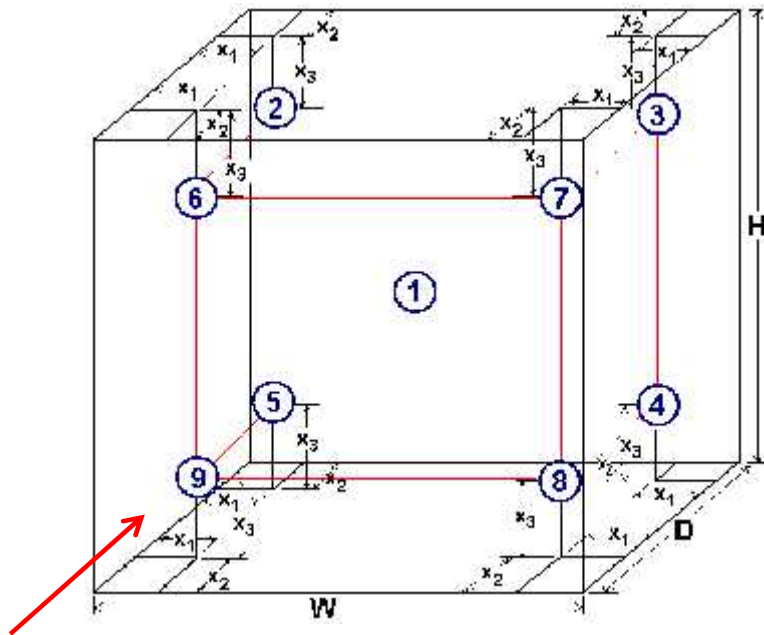
είναι η αβεβαιότητα μικρότερη από την μέγιστη επιτρεπτή απόκλιση;

μ

μ

;

απόρριψη της θέσης που καθορίζει την χωρική ανομοιογένεια



- από τις θερμοκρασίες αναφοράς (min, max) στα σημεία μέτρησης προκύπτει ότι η θέση 9 έχει την μεγαλύτερη απόκλιση σε σχέση με το σημείο αναφοράς (σημείο 1)
- απόρριψη του σημείου και εκ νέου διακρίβωση σε μικρότερο όγκο θαλάμου που θα περικλείεται από τα 8 χωρικά σημεία μέτρησης
- νέα αποτελέσματα διακρίβωσης
- νέος υπολογισμός αβεβαιότητας θερμοκρασίας θαλάμου

Βιβλιογραφία

- 1) ISO 17025:2005 “Γενικές απαιτήσεις για την ικανότητα των εργαστηρίων δοκιμών και διακριβώσεων”
- 2) DKD-R 5-7:2009 “Calibration of Climatic Chambers”
- 3) ISO 8655-2 “Piston-operated volumetric apparatus – Part 2: Piston pipettes”
- 4) ISO 8655-6 “Piston-operated volumetric apparatus – Part 6: Gravimetric methods for the determination of measurement error”
- 5) PTB-Mitteilungen 112 “Guide for volume determination within the scope of reference measurement procedures in medical reference measurement laboratories, Part 1: Calibration liquid water”



!