

## Parametri validacije instrumentalne metode za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku

Nataša Mikulec, Dubravka Samaržija, Neven Antunac, Šimun Zamberlin,  
Zrinka Kuliš, Iva Horvat

Stručni rad – Professional paper

UDK: 637.055

### **Sažetak**

*Metoda protočne citometrije kao brza instrumentalna i rutinska mikrobiološka metoda, koristi se za određivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku. Rezultati protočne citometrije izražavaju se brojem individualnih bakterijskih stanica. Radi sprječavanja nesuglasnosti u tumačenju rezultata ukupnog broja bakterija u mlijeku, transformacija rezultata procijenjenih protočnom citometrijom u rezultate utvrđene referentnom metodom propisana je hrvatskom nacionalnom legislativom (HRN ISO 6610:2001.).*

*Metoda protočne citometrije, jednako kao i svaka analitička metoda, prema normi HRN EN ISO/IEC 17025:2000 mora biti validirana i verificirana. U radu su prikazani obvezni parametri validacije metode: točnost, preciznost, specifičnost, područje primjene, robusnost i mjerna nesigurnost, metode protočne citometrije.*

*Ključne riječi: protočna citometrija, parametri validacije, ukupan broj bakterija*

### **Uvod**

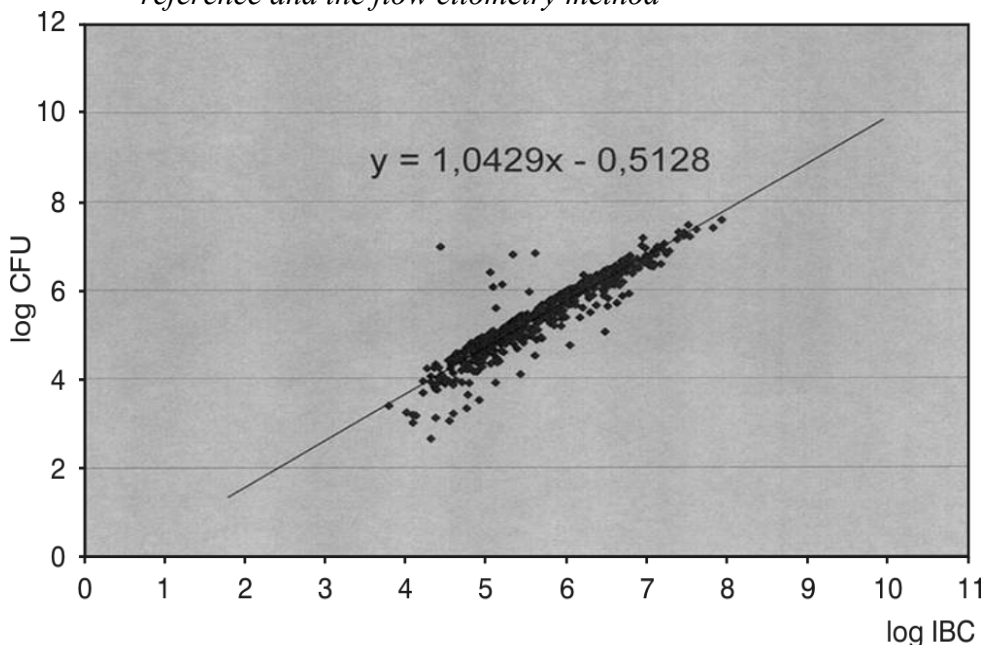
Prva generacija instrumenata za rutinsko utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protočne citometrije u primjeni je od 1980., a četvrta od 2000. godine. Referentni laboratorij Zavoda za mljekarstvo Agronomskog fakulteta koristi instrument Bactoscan FC četvrte generacije. Ovom metodom utvrđuju se pojedinačne bakterijske stanice (eng. IBC, Individual Bacterial Count). Prema normi HRN ISO 6610 (2001.), ukupan broj bakterija u mlijeku izražava se kao broj kolonija (eng. CFU, Colony Forming Units). Zbog toga, analizom linearne regresije, rezultati ukupnog broja bakterija utvrđenih metodom protočne citometrije preračunavaju se u jedinicu referentne metode. Osnovni regresijski pravac potreban za točnost rezultata analiza ukupnog broja bakterija metodom protočne citometrije, koje obavlja

Referentni laboratorij Zavoda za mljekarstvo, utvrđen je na osnovu 2 000 uzoraka sirovog mlijeka. Ukupan broj bakterija u svim uzorcima mlijeka procijenjen je istovremeno referentnom i instrumentalnom metodom protočne citometrije. Dobivene vrijednosti korištene su za izračun koeficijenta linearne regresije ( $y=ax+b$ ), prema kojem se pojedinačne bakterijske stanice mogu izraziti u jedinici referentne metode (grafikon 1). Također, zbog specifičnosti pojedinih bakterijskih vrsta prisutnih u sirovom mlijeku, s obzirom na utjecaj okoline i godišnjeg doba, a radi dobivanja što točnijeg rezultata, osnovni regresijski pravac instrumenta jedanput tjedno dopunjuje se rezultatima analiza 20 uzoraka mlijeka utvrđenih objema metodama. Postupak konverzije i provjeravanja odnosa između dvije metode izveden je prema principu nevedenom u standardu ISO 21187:2004.

Međutim, bez obzira na dobru laboratorijsku praksu koju Referenti laboratorij provodi u utvrđivanju ukupnog broja bakterija u mlijeku metodom protočne citometrije, za dobivanje ovlasnice prema normi HRN EN ISO/IEC 17025:2000, metodu je potrebno validirati i verificirati.

*Grafikon 1: Odnos rezultata ukupnog broja bakterija u mlijeku utvrđenih referentnom i metodom protočne citometrije*

*Graph 1: Relationship of total bacterial count in milk estimated by the reference and the flow citometry method*



Svrha ovog rada je prikazati postupak i parametre validacije potpuno automatizirane instrumentalne metode protočne citometrije za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeka.

## **1. Validacija metode protočne citometrije**

Validacija je postupak dokazivanja prikladnosti metode za točno određenu namjenu. Ispunjavanje određenih preduvjeta i pisanje protokola, opći su zahtjevi validacije mikrobioloških metoda. Jedan od preduvjeta validacije je kvalificirano osoblje, osposobljeno za izvođenje mikrobioloških analiza i za rad s instrumentima za mikrobiološka istraživanja prema principima dobre laboratorijske prakse. Uz taj uvjet obavezan je zapis o edukaciji djelatnika upisan u radni protokol. Definiranje i standardizacija uvjeta izvođenja mikrobioloških analiza sljedeći je preduvjet validacije metode. Za instrumentalno određivanje bakteriološke kvalitete mlijeka nije potreban sterilni prostor. Izvođenje mikrobioloških analiza referentnom metodom prema HRN ISO 6610 (2001.) provodi se u LF (Laminar Flow)-kabinetima u kojima je obavezno vođenje zapisa o sterilnosti prostora i mikrobiološkoj čistoći površina. Važno je osigurati optimalne uvjete rasta mikroorganizama. Za svu laboratorijsku opremu mora postojati dokaz o ispravnosti, upute za rukovanje s instrumentima i zapis o obaveznom umjeravanju i održavanju instrumenata.

Svaki radni protokol mora imati definiranu svrhu, namjenu i opis metode, parametre validacije i kriterije prihvatljivosti metode. Parametri validacije mikrobioloških metoda su: točnost, preciznost (ponovljivost, intermedijarna preciznost i obnovljivost); selektivnost/specifičnost, granica kvantifikacije, linearnost, područje i robustnost (Gašljević, 2004.)

### **1.1. Parametri validacije metode protočne citometrije**

Parametri validacije metode protočne citometrije instrumentom Bactoscan FC, koji se u Referentnom laboratoriju koristi za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku, prema tehničkoj dokumentaciji Foss Electric (2001.), prikazani su u tablici 1.

Tablica 1: Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti za instrument Bactoscan FC (Foss Electric, 2001.)

Table 1: Validation parameters and confidence limits for Bactoscan FC (Foss Electric, 2001.)

Selektivnost Selectivity	Informacija prema BCS-u* Information to BCS	
Točnost Accuracy	Sy, x	< 0,25 log
Područje mjerenja (IBC/mL) Range of measurement	5 000-20 000 000	
Ponovljivost Repeatability	Raspon/Range (IBC/μL)	Sr** (log jedinica)
	10-50	0,08
	51-200 > 200	0,06 0,05
Obnovljivost Reproducibility	Raspon/Range (IBC/μL)	SR*** (log jedinica)
	10-50	0,12
	51-200 > 200	0,085 0,07
Robustnost Robustness	Prenosivost Carry over	< 0,5%

\*BCS = **B**acterial **C**ontrol **S**ample (kontrolni uzorak)

\*\* Sr = ponovljivost

\*\*\* SR = reproducibilnost

### 1.1.1. Točnost (S<sub>y, x</sub>)

Točnost je kvantitativna vrijednost odnosa rezultata procijenjenih na instrumentu Bactoscan FC (CFU) dobivenih konverzijom i rezultata utvrđenih referentnom metodom. U tablici 2. prikazana je točnost ukupnog broja bakterija/mL mlijeka dobivenih referentnom i instrumentalnom metodom.

Ocjenu točnosti navodi proizvođač instrumenta (Foss Electric) a izračunava se prema formuli (FIL-IDF 128:1985):

$$S_{y,x} = \left[ \frac{1}{q-2} (\text{SOS}_y - \text{SOP}^2_{x,y} / \text{SOS}_x) \right]^{1/2}$$

gdje je:

$q$  = broj uzoraka

$\bar{x}_i$  = srednja vrijednost dva mjerenja kod rutinske metode

$\bar{y}_i$  = srednja vrijednost dva mjerenja kod referentne metode

$d_i$  =  $\bar{x}_i - \bar{y}_i$  (odstupanje rezultata indirektno metode od rezultata referentne metode)

$$\bar{y} = \frac{\sum \bar{y}_i}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum \bar{x}_i}{q}$$

Sume kvadrata izračunavaju se prema formuli:

$$\text{SOS}_y = \sum (\bar{y}_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - (\sum x_i)^2 / q$$

$$\text{SOS}_x = \sum (\bar{x}_i - \bar{x})^2 = \sum \bar{x}_i^2 - (\sum (\bar{x}_i))^2 / q$$

$$\text{SOS}_d = \sum (d_i - \bar{d})^2 = \sum d_i^2 - (\sum d_i)^2 / q$$

Utvrđena je vrijednost za točnost  $S_{y,x} = 0,12$  log jedinica, što znači da metoda protočne citometrije udovoljava propisanom validacijskom kriteriju točnosti ( $S_{y,x} < 0,25$  log jedinica) utvrđivanja ukupnog broja bakterija u mlijeku.

Tablica 2: Točnost ( $S_{y,x}$ ) rezultata ukupnog broja bakterija u mlijeku procijenjenih na instrumentu Bactoscan FC (CFU) i rezultata dobivenih referentnom metodom

Table 2: Accuracy ( $S_{y,x}$ ) of the results of total bacterial count in milk estimated on the instrument Bactoscan FC and results given by reference method

	CFU Bactoscan	Log CFU	CFU-SPC*	Log CFU-SPC
1	271 500	5,43	370 000	5,57
2	102 000	5,01	110 000	5,04
3	16 500	4,22	19 000	4,28
4	77 000	4,89	114 000	5,06
5	43 500	4,64	24 000	4,38
6	9 500	3,98	13 000	4,11
7	11 000	4,04	10 000	4,00
8	772 000	5,89	580 000	5,76
9	27 500	4,44	17 000	4,23
10	31 500	4,50	46 000	4,66
11	11 000	4,04	10 000	4,00
12	2 360 000	6,37	3 300 000	6,52
13	12 000	4,08	11 000	4,04
14	107 500	5,03	123 000	5,09
15	8 500	3,93	8 500	3,93
16	92 000	4,96	104 000	5,02
17	22 000	4,34	25 000	4,40
18	142 500	5,15	153 000	5,18
19	750 500	5,88	1 020 000	6,01
20	1 469 500	6,17	1 900 000	6,28

Y- log broja kolonija izbrojanih referentnom metodom

X – log CFU procijenjenog na instrumentu Bactoscan FC

\*CFU - SPC (Standard Plate Count) = broj kolonija izbrojan referentnom metodom

### 1.1.2. Preciznost

Preciznost je stupanj slaganja rezultata nizom mjerenja istog uzorka pod zadanim uvjetima. Iskazuje se u dvije kategorije: ponovljivost i obnovljivost. Granice prihvatljivosti preciznosti instrumentalne metode protočne citometrije

navodi i osigurava proizvođač instrumenta (Foss Electric), a izračunava se prema formuli (FIL-IDF 128:1985). Parametri preciznosti (ponovljivost i obnovljivost) podijeljeni su u tri razreda, ovisno o broju pojedinačnog broja bakterija (IBC) : 10 000-50 000 IBC/mL; 51 000-200 000 IBC/mL i >200 000 IBC/mL. U tablicama 3, 4 i 5 prikazane su utvrđene vrijednosti IBC-a za ponovljivost i obnovljivost instrumenta Bactoscan FC.

#### 1.1.2.1. Ponovljivost ( $S_r$ )

Ponovljivost je parametar validacije kojim se izražava preciznost rezultata analiza istog uzorka kojega pod istim uvjetima analizira isti analitičar, na istoj opremi u kratkom vremenskom razdoblju. Zahtjeve ponovljivosti rezultata mjerenja metodom protočne citometrije navodi i osigurava proizvođač instrumenta Foss Electric, (Tablica 1) a izračunava se prema formuli (FIL-IDF 128:1985):

$$S_r = \sqrt{1/2q \times \sum w_i^2}$$

gdje je:

$q$  = broj uzoraka

$\sum w_i^2$  = zbroj apsolutne razlike vrijednosti

#### 1.1.2.2. Obnovljivost ( $SR$ )

Obnovljivost je parametar validacije kojim se izražava preciznost vrijednosti rezultata analiza istog uzorka analiziranog pod različitim uvjetima u različitim laboratorijima. Zahtjeve obnovljivosti rezultata mjerenja za metodu protočne citometrije kao i formulu navodi i osigurava proizvođač instrumenta (Foss Electric):

$$SR = \sqrt{\text{Std}^2 / q}$$

gdje je:

Std = standardna devijacija između istog uzorka na dva ista instrumenta.

$q$  = broj uzoraka

Tablica 3: Ponovljivost i obnovljivost rezultata pojedinačnih bakterijskih stanica u mlijeku, u rasponu od 10-50 000 IBC, utvrđenih metodom protočne citometrije instrumentom Bactoscan FC

Table 3: Repeatability and reproducibility of the results of individual bacterial count in milk in the range of 10-50 000 IBC determined by the flow cytometry method for Bactoscan FC

Uzorak No.	IBC/mL instrument A*	log IBC instrument A*	IBC/mL instrument B*	log IBC instrument B*
1	23 000	4,362	22 000	4,342
1	17 000	4,230	21 000	4,322
2	36 000	4,556	28 000	4,447
2	34 000	4,531	25 000	4,398
3	50 000	4,699	56 000	4,748
3	49 000	4,690	54 000	4,732
4	46 000	4,663	30 000	4,477
4	44 000	4,643	37 000	4,568
5	31 000	4,491	31 000	4,491
5	30 000	4,477	41 000	4,613
6	43 000	4,633	46 000	4,663
6	43 000	4,633	46 000	4,663
7	50 000	4,699	50 000	4,699
7	48 000	4,681	52 000	4,716
8	24 000	4,380	34 000	4,531
8	32 000	4,505	45 000	4,653
9	23 000	4,362	19 000	4,279
9	18 000	4,255	16 000	4,204
10	35 000	4,544	35 000	4,544
10	26 000	4,415	33 000	4,519
11	34 000	4,531	26 000	4,415
11	37 000	4,568	30 000	4,477
12	30 000	4,477	27 000	4,431
12	35 000	4,544	29 000	4,462
13	32 000	4,505	19 000	4,279
13	31 000	4,491	20 000	4,301
Obnovljivost SR (log IBC) Reproducibility				0,07
Ponovljivost Bactoscana FC (instrument A) Sr (log IBC) Repeatability				0,05

\* Instrumenti A i B su dva identična instrumenta Bactoscan FC, proizveo ih je isti proizvođač (Foss Electric, Danska). Instrument A nalazi se u Referentnom laboratoriju, a instrument B u Središnjem laboratoriju za kvalitetu mlijeka u Križevcima.



Kriteriji prihvatljivosti za obnovljivost (SR) i ponovljivost (Sr) rezultata ukupnog broja bakterija u mlijeku u rasponu od 10-50 000 IBC utvrđenih instrumentom Bactoscan FC, prikazani su u tablici 1.

*Tablica 4: Ponovljivost i obnovljivost rezultata pojedinačnih bakterijskih stanica u mlijeku u rasponu od 51-200 000 IBC, utvrđenih protočnom citometrijom instrumentom Bactoscan FC*

*Table 4: Repeatability and reproducibility of the results of individual bacterial count in milk in the range of 51-200 000 IBC determined by the flow cytometry method for Bactoscan FC*

Uzorak No.	IBC/mL instrument A	log IBC instrument A	IBC/mL instrument B	log IBC instrument B
1	97 000	4,987	92 000	4,964
1	110 000	5,041	100 000	5,000
2	54 000	4,732	52 000	4,716
2	53 000	4,724	53 000	4,724
3	99 000	4,996	64 000	4,806
3	98 000	4,991	65 000	4,813
4	140 000	5,146	134 000	5,127
4	138 000	5,140	143 000	5,155
5	187 000	5,272	145 000	5,161
5	179 000	5,253	136 000	5,134
6	142 000	5,152	116 000	5,064
6	148 000	5,170	108 000	5,033
7	65 000	4,813	83 000	4,919
7	77 000	4,886	85 000	4,929
8	52 000	4,716	48 000	4,681
8	57 000	4,756	49 000	4,690
9	59 000	4,771	53 000	4,724
9	65 000	4,813	59 000	4,771
10	55 000	4,740	48 000	4,681
10	63 000	4,799	48 000	4,681
11	143 000	5,155	219 000	5,340
11	144 000	5,158	153 000	5,185
12	125 000	5,097	115 000	5,061
12	133 000	5,124	120 000	5,079
13	57 000	4,756	61 000	4,785
13	58 000	4,763	50 000	4,699
14	73 000	4,863	112 000	5,049
14	68 000	4,833	103 000	5,013
15	158 000	5,199	161 000	5,207
15	150 000	5,176	144 000	5,158

Uzorak No.	IBC/mL instrument A	log IBC instrument A	IBC/mL instrument B	log IBC instrument B
16	150 000	5,176	158 000	5,199
16	166 000	5,220	146 000	5,164
17	136 000	5,134	122 000	5,086
17	132 000	5,121	104 000	5,017
18	142 000	5,152	135 000	5,130
18	149 000	5,173	132 000	5,121
19	104 000	5,017	98 000	4,991
19	97 000	4,987	106 000	5,025
20	72 000	4,857	68 000	4,833
20	63 000	4,799	64 000	4,806
Obnovljivost SR (log IBC) / Reproducibility				0,06
Ponovljivost Bactoscana FC (instrument A) Sr (log IBC) / Repeatability				0,02

Kriteriji prihvatljivosti za obnovljivost (SR) i ponovljivost (Sr) rezultata ukupnog broja bakterija u mlijeku u rasponu od 51-200 000 IBC utvrđenih instrumentom Bactoscan FC, prikazani su u tablici 1.

*Tablica 5: Ponovljivost i obnovljivost rezultata pojedinačnih bakterijskih stanica u mlijeku, u rasponu >200 000 IBC, utvrđenih protočnom citometrijom instrumentom Bactoscan FC*

*Table 5: Repeatability and reproducibility of the results of individual bacterial count in milk in the range >200 000 IBC determined by flow cytometry method for Bactoscan FC*

Uzorak No.	IBC/mL instrument A	log IBC instrument A	IBC/mL instrument B	log IBC instrument B
1	2 173 000	6,337	2 115 000	6,325
1	2 347 000	6,371	2 234 000	6,349
2	5 478 000	6,739	5 453 000	6,737
2	5 658 000	6,753	5 479 000	6,739
3	2 158 000	6,334	2 593 000	6,414
3	2 281 000	6,358	2 390 000	6,378
4	2 096 000	6,321	2 292 000	6,360
4	2 201 000	6,343	2 308 000	6,363
5	495 000	5,695	499 000	5,698
5	411 000	5,614	457 000	5,660
6	846 000	5,927	822 000	5,915
6	841 000	5,925	824 000	5,916
7	369 000	5,567	430 000	5,633
7	458 000	5,661	524 000	5,719
8	3 257 000	6,513	3 381 000	6,529
8	3 439 000	6,536	3 291 000	6,517

Uzorak No.	IBC/mL instrument A	log IBC instrument A	IBC/mL instrument B	log IBC instrument B
9	1 646 000	6,216	1 627 000	6,211
9	1 604 000	6,205	1 621 000	6,210
10	588 000	5,769	543 000	5,735
10	564 000	5,751	554 000	5,744
11	3 086 000	6,489	2 708 000	6,433
11	2 824 000	6,451	2 663 000	6,425
12	5 171 000	6,714	5 414 000	6,734
12	5 517 000	6,742	4 972 000	6,697
13	5 831 000	6,766	5 350 000	6,728
13	5 505 000	6,741	5 925 000	6,773
14	2 774 000	6,443	2 874 000	6,458
14	2 797 000	6,447	2 877 000	6,459
15	3 235 000	6,510	3 240 000	6,511
15	3 129 000	6,495	3 162 000	6,500
16	2 332 000	6,368	2 346 000	6,370
16	2 052 000	6,312	2 459 000	6,391
17	2 845 000	6,454	3 062 000	6,486
17	2 864 000	6,457	2 859 000	6,456
18	265 000	5,423	243 000	5,386
18	237 000	5,375	238 000	5,377
19	1 744 000	6,242	1 574 000	6,197
19	1 675 000	6,224	1 619 000	6,209
20	328 000	5,516	253 000	5,403
20	312 000	5,494	258 000	5,412
Obnovljivost SR (log IBC) / Reproducibility				0,03
Ponovljivost Bactoscana FC (instrument A) Sr (log IBC) / Repeatability				0,02

Kriteriji prihvatljivosti za obnovljivost (SR) i ponovljivost (Sr) rezultata ukupnog broja bakterija u mlijeku u rasponu >200 000 IBC utvrđenih instrumentom Bactoscan FC, prikazani su u tablici 1.

## 1.2. Selektivnost / Specifičnost

Selektivnost/specifičnost je sposobnost metode identificiranja ili brojanja specifičnih mikroorganizama ili grupe mikroorganizama u uzorku. Selektivnost instrumentalne metode protočne citometrije za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku potvrđuje se kontrolnim uzorkom (eng. BCS, **B**acterial **C**ontrol **S**ample). Kontrolni uzorak (BCS) sadrži točno određeni broj bakterija koju navodi proizvođač. Selektivnost metode potvrđena je ako se instrumentalne vrijednosti podudaraju s vrijednostima kontrolnog uzorka.

Tablica 6: Odnos između referentne vrijednosti BCS-a (Foss Electric) i vrijednosti BCS-a izmjerenog na instrumentu Bactoscan FC u tri ponavljanja

Table 6: Relationship between reference value of BCS (Foss Electric) and value of BCS measured on instrument Bactoscan FC in three repetitions

	Referentna vrijednost Reference value BCS/ $\mu$ L	Izmjerena vrijednost Measured value BCS/ $\mu$ L
Prosječna vrijednost standarda Standard Count Average	2004	2005
Prosječna vrijednost standarda Standard Count Average	2004	1992
Prosječna vrijednost standarda Standard Count Average	2004	2080

### 1.3. Robustnost

Robustnost pokazuje otpornost metode na male, ali namjerne promjene u mediju, reagensima, uvjetima inkubacije i sl. Parametar robustnosti potrebno je validirati pri validaciji metode u razvoju. Prenosivost instrumenta jedna je od kategorija robustnosti.

### 1.4. Prenosivost (CO)

Prenosivost pokazuje koliki je utjecaj prethodnog rezultata na rezultat sljedećeg. Postupak određivanja i kriterij prihvatljivosti navodi proizvođač. U tablici 7. prikazan je postupak izračunavanja prenosivosti instrumenta Bactoscan FC.

$$CO = \frac{(\sum B_1 - \sum B_2)}{(\sum M - \sum B_2)} \times 100$$

gdje je:

$B_1$  = rezultat slijepe probe 1

$B_2$  = rezultat slijepe probe 2

$M$  = rezultat uzorka mlijeka

Tablica 7: Prenosivost instrumenta Bactoscan FC

Table 7: Carry over for Bactoscan FC

	IBC/ $\mu$ L
1. uzorak mlijeka 1 <sup>st</sup> milk sample	2 246
Slijepa proba Blank sample	5
Slijepa proba Blank sample	3
2. uzorak mlijeka 2 <sup>nd</sup> milk sample	18 855
Slijepa proba Blank sample	34
Slijepa proba Blank sample	15
3. uzorak mlijeka 3 <sup>rd</sup> milk sample	9 750
Slijepa proba Blank sample	33
Slijepa proba Blank sample	4
Rezultat Results	0,16

Kriterij prihvatljivosti za prenosivost instrumenta Bactoscan FC, prikazan je u tablici 1.

### 1.5. Utvrđivanje mjerne nesigurnosti

Mjerna nesigurnost je parametar pridružen rezultatu mjerenja, a karakterizira rasap vrijednosti koje su dodijeljene mjernoj komponenti. Mjerna nesigurnost se može izraziti kao standardna, kombinirana i proširena. Standardna nesigurnost je nesigurnost rezultata izražena kao standardna

devijacija. Kombinirana nesigurnost je standardna nesigurnost rezultata dobivenih iz većeg broja drugih određivanja, a koja uključuje i neke druge parametre. Proširena nesigurnost definira interval oko rezultata mjerenja, unutar kojega se očekuje najveći dio distribucije vrijednosti dodijeljene mjerenoj komponenti. Ovisno o metodi za koju izražavamo mjernu nesigurnost, razlikujemo tri tipa distribucije: pravokutna, trokutna i normalna distribucija. Rezultati dobiveni metodom protočne citometrije nalaze se u normalnoj distribuciji (De Bièvre, 2004.). Procjena nesigurnosti može biti u obliku standardne devijacije, relativne standardne devijacije ili koeficijenta varijacije bez navođenja distribucije. Za mjernu nesigurnost instrumenta Bactoscan FC potrebno je izmjeriti za svaki razred po deset uzoraka, najmanje dvadeset puta, te izračunati standardnu devijaciju ponovljivosti (Izračun mjerne nesigurnosti vrste A). Distribucija rezultata je normalna ili Gaussova.

Zbog toga što se radi o mikrobiološkoj metodi gdje su varijacije rezultata uvijek puno veće nego u kemijskim, a na temelju uputa proizvođača instrumenta Bactoscan FC i višegodišnjeg radnog iskustva u radu s instrumentom, smatramo da su naše mjerne nesigurnosti zadovoljavajuće. Mjerna nesigurnost može sadržavati i subjektivne procjene samog analitičara pa se zbog toga govori o procjeni a ne o izračunu mjerne nesigurnosti.

U tablici 8. prikazana je mjerna nesigurnost za instrument Bactoscan FC.

Tablica 8: Mjerna nesigurnost instrumenta Bactoscan FC

Table 8: Measuring uncertainty for Bactoscan FC

Izvor nesigurnosti Source of uncertainty	Distribucija Distribution	Proširena nesigurnost Expanded uncertainty
Ponovljivost (10 000-50 000 IBC/mL) Repeatability	Normalna Normal	4 500
Ponovljivost (51 000-200 000 IBC/mL) Repeatability	Normalna Normal	11 000
Ponovljivost (>200 000 IBC/mL) Repeatability	Normalna Normal	27 000

Za mjernu nesigurnost instrumenta Bactoscan FC potrebno je mjeriti za svaki razred deset uzoraka, najmanje dvadeset puta te izračunati standardnu

devijaciju ponovljivosti (Izračun mjerne nesigurnosti vrste A). Distribucija rezultata je normalna ili Gaussova. Zbog toga što se radi o mikrobiološkoj metodi gdje su varijacije u rezultatima uvijek puno veće nego u kemijskim i na temelju uputa proizvođača instrumenta Bactoscan FC i višegodišnjeg radnog iskustva na tom instrumentu, smatramo da su naše mjerne nesigurnosti zadovoljavajuće. Mjerna nesigurnost može sadržavati i subjektivne procjene samog analitičara, pa se zbog toga govori o procjeni a ne o izračunu mjerne nesigurnosti.

### **Zaključak**

Instrumentalna metoda protočne citometrije za određivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku mora biti validirana i verificirana prema zadanim parametrima. U Referentnom laboratoriju Zavoda za mljekarstvo, provedena je validacija metode protočne citometrije a parametri validacije nalaze se u granicama kriterija prihvatljivosti (Tablica 1).

## **VALIDATION PARAMETERS OF INSTRUMENTAL METHOD FOR DETERMINATION OF TOTAL BACTERIAL COUNT IN MILK**

### **Summary**

*The method of flow citometry as rapid, instrumental and routine microbiological method is used for determination of total bacterial count in milk. The results of flow citometry are expressed as individual bacterial cells count. Problems regarding the interpretation of the results of total bacterial count can be avoided by transformation of the results of flow citometry method onto the scale of reference method (HRN ISO 6610:2001.).*

*The method of flow citometry, like any analytical method, according to the HRN EN ISO/IEC 17025:2000 standard, requires validation and verification. This paper describes parameters of validation: accuracy, precision, specificity, range, robustness and measuring uncertainty for the method of flow citometry.*

*Key words: flow citometry, parameters of validation, total bacterial count*

### ***Literatura***

DE BIÈVRE, P., (2004.): Kemijsko mjeriteljstvo. Seminar i raspravljaonica Hrvatskog mjeriteljskog društva. Materijali.

FOSS ELECTRIC (2001.): Tehnička dokumentacija proizvođača instrumenta Bactoscan FC.

HRN ISO 17025 (2000.): Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i mjeriteljskih laboratorija (ISO/IEC 17025:1999; EN ISO/IEC 17025:2000)

HRN ISO 6610 (2001.): Mlijeko i mliječni proizvodi – Brojenje kolonija mikroorganizama – Brojenje kolonija pri 30°C (ISO 6610:1992).

FIL-IDF 128 (1985.): Milk – Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – Application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory.

GAŠLJEVIĆ, V., (2004.): Validacija mikrobioloških metoda. Seminar Hrvatskog mjeriteljskog društva. Materijali, 1. izdanje 05/2004.

ISO 21187 (2004.): Milk – Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results.

SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N. POGAČIĆ, T., SIKORA S., (2004.): Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protočne citometrije. *Mljekarstvo*, 54 (1), 39 – 51.

**Adrese autora - Author's addresses:**

Nataša Mikulec, dipl. ing.  
prof. dr. sc. Dubravka Samaržija  
prof. dr. sc. Neven Antunac  
Šimun Zamberlin, dipl. ing.  
Zrinka Kuliš, dipl. ing.  
Iva Horvat, dipl. ing.

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za mljekarstvo, Zagreb,  
Svetošimunska 25

**Prispjelo – Received:** 05. 01. 2005.

**Prihvaćeno – Accepted:** 02. 02. 2005.