مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

تخمین و مقایسه انحراف معیار تجدیدپذیری استاندارد SIR (عدم قطعیت) در آزمون های کمی میکروبی آیتم های مواد غذایی مختلف بر اساس استاندارد ایزو ۱۹۰۳٦ سال ۲۰۱۹

محمد خضری [۱] ، سعید خانزادی [۱*] ، محمد هاشمی [۲]

۱- گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- گروه تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۱۰/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۲/۱٦

کلمات کلیدی:

شاخص عملکردی،

تصدیق،

آنترو باکتریاسه،

انحراف معیار تجدید پذیری،

میکروارگانیسم های مزوفیل هوازی،

عدم قطعیت.

DOI: 10.22034/FSCT.20.134.201

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9

* مسئول مکاتبات:

khanzadi@um.ac.ir

چکیده

این مطالعه با هدف تخمین و مقایسه، انحراف معیار تجدید پذیری درون آزمایشگاهی (SIR) یا عدم قطعیت اندازه گیری (MU) بعنوان شاخص عملکردی در تصدیق انجام روش های آزمون کمی میکروب شناسی مواد غذایی، انجام شده است. آزمون های شمارش کلی میکروارگانیسم های هوازی مزوفیل ACC و شمارش آنتر و باکتریاسه ECC، بعنوان دو آزمون مهم در ارزیابی میکروبی مواد غذایی، انتخاب و محاسبات انحراف معیار تجدیدپذیری استاندارد درون آزمایشگاهی (عدم قطعیت) در آیتم های غذایی منتخب: گوشت چرخ کرده، همبرگر، پودر سویا، تخم مرغ مایع پاستوریزه، شیر پاستوریزه و فرادما، بستنی، آبمیوه، آرد، کیک و ادویه بر اساس استاندارد ایزو – ۱۹۰۳٦ سال ۲۰۱۹ انجام گردید. سایر مولفه های عدم قطعیت ماتریکس، توزیعی، مرکب وگسترده محاسبه و گزارش شدند. محاسبه عدم قطعیت فنی آزمون ECC در (شیر پاستوریزه و فرادما، بستنی، آب میوه و تخم مرغ مایع پاستوریزه) با ایجاد آلودگی مصنوعی در سه سطح توسط ارگانیسم هدف (Shigella felxseneri) و در سایر آیتم های غذایی آلودگی طبیعی بود، در آزمون ACC صرفا آلودگی طبیعی محاسبه و نتایج، مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج عدم قطعیت فنی آزمون ECC، از ۰،٤۸۷ تا ۰،۰۷و در آزمون ACC، از ۰/۳۹۰ تا ۰/۱۰۵ log10 cfu/g متغیر بود. بیشترین مقادیر عدم قطعیت فنی و ماتریکس در نمونه های گوشت، کیک، همبرگر و پنیر یعنی در مواد غذایی ناهمگن (جامد و نیمه جامد) و کمترین مقادیر در نمونه های مایع (همگن) مشاهده شد. ارزیابی تغییرپذیری و در نتیجه عدم قطعیت راهی برای استاندارد کردن بیان تنوع مرتبط با دادههای به دست آمده در روشهای میکروبیولوژیکی برای برجسته کردن علل و میزان چندین عامل متنوع موثر پیشنهاد می گردد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

۱- مقدمه

امروزه آلودگی و فساد مواد غذایی تبدیل به یک چالش بزرگ جهانی شده ا ست. این بدان معنا ست که تضمین سلامت غذا به اندازه تأمین غذا اهمیت دارد. تعداد و انواع میکروب های موجود در غذاها از شاخصهای مهم ایمنی و کیفیت هستند.تجزیه و تحلیل میکروبیولوژیکی مواد غذایی و محصولات غذایی یکی از مهمترین فاکتورها در تولید غذای سالم است، زیرامیکروارگانیسم های بیماری زا در محصولات غذایی اثرات خطرناکی بر سلامت انسان دارند [۱].

در آزمونهای کمی میکروبی وبطور کلی تمام آزمونهای موثر بر سلامت مواد غذایی رسیدن به مقدار واقعی نتایجضروری میباشد. در آزمون های میکروبی، کمّیت مورد آزمون (آنالیت/ آزمونه) یک موجود زنده است که از نظر فیزیولوژیکی شدیداً متغیّر است، زیرا دارای جنس، گونهها و سویههای مختلف است. همچنین برخی کمیّتهای ورودی را اگرچه غیرممکن نیست ولی بسختی میتوان توصیف کرد (مانند وضعیّت فیزیولوژیکی). اثرات بسیاری از کمیّتهای ورودی (مانند دما ، فعالیت آبی) روی نتایج بصورت کمّی و با دقّت لازم قابل توصیف نیست[۲].

عدم قطعیت اندازهگیری (MU) برای نشان دادن عدم درستی(صحت و دقت) به کاربرده میشود که با نتایج تجزیه و تحلیل مرتبط است. در زمینه میکروبیولوژی کمی، عدم قطعیت اندازه گیری بیانگر درجه اطمینانی است که میتوان در آزمایشگاه برای محاسبه تعداد میکروارگانیسمهای موجود در غذا و/یا سایر مواد، مورد استفاده قرارگیرد[۳]. در انجام آزمایشات میکروب شناسی میتوان بسیاری از علل تغییرپذیری را شناسایی کرد، به عنوان مثال: توانایی یک ایزوله برای ایجاد واکنشهای معمولی بر روییک محیط تشخیصی، تجهیزات و خطاهای انسانی در توزین، توزیع، رقیق سازی و سایرمراحل آزمایشگاهی و سطوح مهارت نسبی تکنسین ها [٤]. رویکرد اصلیدر تعیین عدم قطعیت اندازه گیری ، طراحییک مدل اندازهگیری ریاضی است که میتواند به طور کمی همه کمیتهای ورودی فردی را که کمیت نتایج آزمون به آن بستگی دارد، تعریف کند، به طوری که عدم قطعیت اندازه گیری را بتوان از روی تمام عدم قطعیتهای کمیتهای ورودی محاسبه کرد[۵].

در سالهای اخیر، آزمایشگاههایی که در میکروبیولوژی مواد غذایی فعالیت میکنند، به شدت درصدد برآورده کردن الزامات استاندارد جهانیEN ISO/IEC 17025 [۵] به ویژه در مورد پذیرش و اعتبارسنجی روشها بوده اند. آزمایشگاهها، در واقع، باید روشها و رویه هایی متناسب برای استفاده خود را توسط قوانین سازمانهای ملی، اروپایی و/یا بین المللی صادر شده، اتخاذ کنند. علاوه بر این، زمانی که آزمایشگاهها موافقت میکنند که از روشهای توسعه یافته داخلییا روشهای استاندارد بدون داده های اعتبارسنج ییا خارج از محدوده خود استفاده کند، باید همه آنها را بر اساسالزامات سری استاندارد های ایزو۱۹۰۳٦ [٦]، ارزیابی و تعیین انحراف معیار تجدید پذیری استاندراد درون آزمایشگاه (SIR) یا عدم قطعیت (MU) اندازه گیری برای تصدیق پیاده سازی روش های آزمون میکروبی کمی، را انجام دهد. استفاده از روش های مرجع معتبر(اعتبار بخشی شده) بخش اساسی هر برنامه تضمین کیفیت آزمایشگاهی میباشد و توسط تمام مراکز زیر ربط پذیرفته شده است. علاوه بر این، اعتبار سنجی و تصدیق روش های آزمون، توسط ISO/IEC 17025 [۵] اجباری است. در نهایت، آزمایشگاه ها بایدطی یک روند مستمراز کیفیت داده های تحلیلی، اطمینان حاصل نمایند ویک راه مفید برای برآوردن این نیاز، مشارکت منظم در طرحهای تست مهارت به منظور نظارت بر عملکرد روشها و آزمون گرها و برآورد دقت آنها می باشد [٦].

Jarvis و همکاران [۷] تخمینهای تکرارپذیری و تکرارپذیری برای یک کارآزمایی بین آزمایشگاهی توسط سه تحلیلگر در ۱۹ آزمایشگاه، از سه روش شمارش کلنی سازمان استاندارد بین المللی (ISO) برای موجودات هوازی (ACC)، انتروباکتریاسه (ECC) و اشریشیا کلی (EcCC) را بررسی و برای محاسبه پارامترهای عدم قطعیت اندازهگیری استفاده شد. مقادیر تخمینی عدم قطعیت تکرارپذیری و تکرارپذیری برای ACC به ترتیب از ۹,۳ تا ۱۲,۱ درصد و ۲,۰ تا ۳,۹ درصد از میانگین تعداد کلنی log10 بسته به محیط کشت خاص، روش استخراج میانگین تعداد و آماری متغیر بود. برآورد عدم قطعیت تکرارپذیری و تکرارپذیری برای ECC به ترتیب از ۱٤,۰ تا ۱۷,٤ درصد و ٤,۱ تا ٦,۷ درصد متغیر بود.

Režić Dereanиو همکاران [۸] روشهای کنترل کیفیت، روشهای اعتبارسنجی و تعیین عدم قطعیت اندازهگیری (MU) به عنوان یک عنصرمهم در تضمین کیفیت در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی برای نوع کیفی و کمی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

آنالیز را توصیف کردند. تفاوتهای بین طراحی آزمایشهای اعتبارسنجی برای تجزیه و تحلیل میکروبیولوژی مواد غذایی کمی و کیفی در این تحقیق مورد بحث قرار گرفته و بیان کردند که محاسبات MU بر اساس داده های تست مهارت خارجی و داده های اعتبارسنجی داخلی است.

باکتری های خانواده انتروباکتریاسه ها به عنوان شاخصی از شرایط بهداشتی فرآیندهای تولید استفاده می شوند، زیرا آنها به راحتی توسط عوامل ضدعفونی کننده غیرفعال می شوند و اگر در کارخانهای شرایط تمیز کردن و بهداشت به طور اصولی انجام نشود میزان آن در محصول افزایش مییابد.خانواده آنتروباکتریاسه ها بیشتر مزوفیل هستند و سویه های سایکروتروف آن شاملیرسینیا، سیتروباکتر،انتروباکتر، اشرشیا، کلبسیلا، سراتیا و هافنیا میباشد[۹]. ویژگی های کمی میکروبی شمارش کلی میکروب های هوازی مزوفیل و شمارش باکتری های آنتروباکتریاسه بعنوان متداولترین ویژگی های میکروبی برای انواع مختلف مواد غذایی در مراجع معتبر ویژگی های میکروبی بین المللی [۱۰] (ICMSF)، منطقه ای اتحادیه اروپا EU[11] ودر سطح ملی ,مانند ویژگی میکروبی در کدکس ترکیه [۱۲]، ویژگی های میکروبی کشور های حاشیه خلیج فارس GFSA [۱۳] و جدول ضابطه ویژگی های میکروبی آزمایشگاه مرجع کنترل غذا و داروی وزارت بهداشت ,M5 1400 [۱٤] و در استاندارد های سازمان ملی ایران ISIRI با عناوین استانداردهای ویژگی های میکروبی انواع فراورده های غذایی از جمله ویژگی های میکروبی فراورده های لبنی ۲٤۰٦، فرآورده های شیرینی و قنادی ۲۳۹۵،ویژگی های فرآورده آردی و غلات ۲۳۹۳ و۱۱٦۰۳،ویژگی های انواع فرآورده های گوشتی ۲۳۰۳،۲۳۰٤, ویژگی های انواع ادویه ٦۰۳۷ ، ویژگی های انواع فرآورده های قهوه ۱۵۵۰۷، انواع فرآورده های کاکائو ۳۳۰۷ [۱۵] ارایه شده استو مقادیرحدود مجاز این شاخص ها در این مراجع معتبر در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰mlیاCFU/gبرای آزمون شمارش باکتری هایآنتروباکتریاسه ECCو ۱۰۰ تا ٦ ۱۰ml یاCFU/gبرای آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم های هوازی مزوفیلACC، در انواع مختلف مواد غذای مذکور تبیین شده است.

هدف این مقاله، اندازه گیری انحراف معیار تجدید پذیری استاندارد درون آزمایشگاهی (عدم قطعیت) بر اساس رویکرداستاندارد بین المللی ایزو ۱۹۰۳٦ و بر اساس اصول و الزامات استاندارد ۱٦۱٤۰-۳ [۱٦] ودر راستای تصدیق پیاده سازی روش آزمون های کمی و برای اعتبار سنجی (تضمین کیفیت نتایج آزمون) در روش های آزمون میکروبیولوژی مواد غذاییو بمنظور انجامنظارت مداوم بر کیفیت خروجی داده های تحلیلی، نتایج آزمایشگاهی بوده است. برای این منظور مراحل محاسبه SIR یا عدم قطعیت بر اساس دستورالعملاستاندارد های مذکور بر اساس روش کاربردی و پروتوکل عملی، برای هر یک از روش آزمون کمی میکروبی شامل تعداد کلنیهای باکتری های آنتروباکتریاسه (ECC) و تعداد کلنی های هوازی (ACC) در آیتم های غذایی بستنی پاستوریزه، شیر پاستوریزه، شیر فرادما، آبمیوه، آرد، کیک، ادویه، گوشت چرخ کرده و همبرگر از ده برند مختلف تخمین و محاسبه و در نهایت مقادیر عدم قطعیت محاسبه شده در بین انواع آیتم های غذایی بر اساس نوع ماهیت مایع (همگن)، نیمه مایع و جامد (ناهمگن) و نوع آلودگی طبیعیو یا مصنوعیمورد مقایسه قرار گرفته است.

۲-مواد روش ها

تمام محیط های کشت و معرف ها از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. سوش میکروارگانیسم مرجع*شیگلا فلکسنری* (ATCC) بصورت کرایوبانک ازشرکت تاو زیست فن آوران (انستیتو پاستور ایران) تهیه گردید. تمام مراحل مورد بحث در این بخش در آزمایشگاه میکروبیولوژی FDCL مشهد، ایران انجام شد.

انتخاب انواع آیتم های غذاییبر اساس پیوست های A و Bبخش سوم سری استاندارد ایزوهای ایزو ۱٦۱٤۰ ۱٦۱٤۰[۱٦] با در نظر گرفتن عواملی مانند ویژگیهایانواع ماتریکس های (آیتم های غذایی) و ویژگی های مختلف مانند چالش برانگیز (به عنوان مثال، میکروبیوتای بالا)، pH، میکروارگانیسم‌های فساد پذیر، ترکیب و ترکیبات ضد میکروبینجام شده است. برای محاسبه عدم قطعیت میکروبیولوژیکی،از بین انواع مواد غذایی اقلام غذاییگوشت چرخ کرده تازه (گوشت تازه)، همبرگر، بستنی پاستوریزه، آرد گندم، پودر سویا و ادویه (فلفل) انتخاب شد زیرا این اقلام غذایی بطور طبیعی آلودگی میکروبی (به دلیل میکروبیوتای

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

آن) و سطح آلودگی های متفاوت، تنوع مورد نیاز برای این روش آزمایش را پوشش می دهند. اقلام غذایی شیر پاستوریزه و فرادما و آب میوه صنعتی با ماهیت مایع و همگن برای اندازه گیری عدم قطعیت با ایجاد آلودگی مصنوعی انتخاب شدند. موارد انتخاب شده دامنه روش تست و طیف وسیعی از دامنه کاربری آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی معاونت غذا و داروی مشهد را پوشش دادن برای این مطالعه انتخاب شدند.

Table 1 The selection chart of food items classification and suggested target combinations for verification studies

Food item	Food type	Food category
Minced meat	Fresh meats (unprocessed)	Raw meat and ready-to-cook meat products (except poultry)
Frozen burger patties (hamburgers)	Ready-to-cook (processed)	
Ultra-high temperature (UHT) milks	Sterilized or Ultra-high temperature dairy products	Heat-processed milk and dairy products
Pasteurized milks	Pasteurized milk-based products	
Soft cheeses		
ice creams	Pasteurized dairy products	
Spice(Black Pepper)	Seasoning	Dried cereals, fruits, nuts, seeds, and vegetables
Pasteurized whole liquid egg	Egg product (heat processed) without Additives	Eggs and egg products (derivatives)
Soybean powder	Plant origin ingredients	Pet food and animal feed
Cake	Dry and sugared low moisture(aw < 0,85)	Chocolate, bakery products and confectionary
Pasteurizedapple juice	Heat-processed fruit/vegetables juices	Processed fruits andvegetables
Wheat	Flours	Dried cereals, fruits, nuts, seeds and vegetables

۲-۱- تهیه و آماده سازی سوسپانسیون باکتری‌ها

کشت باکتری هدف با استفاده از سویه مرجع باکتری *شیگلا فلکسنری* (ATCC:۱۲۱۲۲) در آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی انجام شد. کشت در شرایط استریل و در کنار شعله با آنس استریل از سویه باکتری هدف برداشته و بر روی پلیت های حاوی محیط عمومی BHI Agar کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردیدند. جهت تهیه سوسپانسیون، تمام سویه‌های باکتری‌ها طی دو مرحله در محیط BHI Brothاستریل کشت و فعال شدند. پس از دو مرحله کشت بعد از ۱۸ ساعت از تلقیح باکتری‌ها، تعداد باکتری‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر از طریق کدورت سنجی مطابق با نیم مک فارلند مشخص گردید (میزان جذب نوری برابر با ۰/۱۳ تا ۰/۰۸ در طول موج ٦۰۰ نانومتر). در این کدورت تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در میلی لیتر موجود بود. برای انجام هر مرحله از آزمایش به میزان مورد نظر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده برداشت شد و سوسپانسیون باکتریایی جهت تلقیح با تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی لیتر تهیه گردید [۱۷].

۲-۲-نحوه ایجاد آلودگی مصنوعی (Spiking) بخش های آزمایشی توسط مایه تلقیح:

هر ماده غذایی ۱۰ میلی لیتری به طور مصنوعی با ۱ میلی لیتر از سه سطح آلودگی مثنوعی با سویه شیگلا فلکسنری در سه سطح غلظت باکتری تعیین شده با غلظت های ۱۰۰۰، ۱۰۰ و ۱۰باکتری مورد انتظار تلقیح شد،علاوه بر این، دو قسمت آزمایشی از هر یک از مواد غذاییکه بطور مصنوعی آلوده نبودند و به عنوان کنترل منفی استفاده شدند (بلانک).همه نمونه ها برای شمارش کلنی انتروباکتریاسه (ECC) بر اساس استاندارد [۱۸ و ٦] شمارش شدند.

۲-۳-آماده سازی نمونه

آب پپتونه نمکی و آب پپتونه بافری /MRD)SPW) به عنوان رقیق کننده ها (برای جلوگیری از شوک اسمزی) و مرحله تهیه رقت اولیه را به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۱۸ تا ۲۷ درجه سانتیگراد) قبل از همگن کردن انجام

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

شد.

۲-٤- نحوه شمارش کلنی باکتی های مزوفیل هوازی و انتروباکتریاسه

از رقت‌های مختلف باکتری های مزوفیل هوازی به روش کشت آمیخته برروی پلیت‌های حاوی محیط پلیت کانت آگار و برای شمارش کلنی انتروباکتریاسه به روش کشت آمیخته برروی پلیت‌های حاوی محیط ویولت رد بایل لاکتوز آگار کشت داده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شده و بعد از ٤۸ ساعت تعداد کلنی‌ها شمارش و ثبت گردید[۱۹].

۲-۵-روش محاسبه عدم قطعیت فنی

تخمین و محاسبه عدم قطعیت فنی، برای روش‌های آزمون کمی شمارش آنتروباکتریاسهECC و باکتری‌های مزوفیل هوازی ACCبر اساس استاندارد ISO 19036 [٦]، انجام شد.آزمون ها در تعداد ۱۰ نمونه از هر آیتم غذاییدر دو بخش آزمایشی(آزمایه TEST PORTION) موازی (۲×۱۰ گرم) از هر نمونه آزمایشگاهی در شرایط تکرارپذیریبا ایجاد شرایط تنوع متفاوت شامل تجهیزات آزمایشگاهی مختلف(روند آماده سازی ورقیق سازی متفاوت:گراویمیتریک دایلوترهمراه با بگ فیلتر استریل، ترازوی آزمایشگاهی و ارلن استریل، گرمخانه متفاوت، کلنی کانتراتوماتیک اسکن ۵۰۰ و کلنی کانتردستی و ...)، مواد متفاوت (MRD ,BPW رقیق کننده هایMRD,BPW و محیطهای کشت از برند و شماره متفاوت)، گروه آزمونگران و زمان آزمون متفاوت، در دو گروه آزمون با نام A و B بمنظور ایجاد حداکثر شرایط متنوع (VARAIABLITY) متفاوت آزمایشگاهی اعمال گردید تا بیشترین تنوع ممکن در تخمین لحاظ شود.در نمونه های فاقد آلودگی طبیعی متنوع و در حد کمتر از ۱۰ CF، مانند شیر فرادما، آب میوه صنعتی، آلودگی مصنوعی در دامنه مورد انتظار شمارش کمیت آزمون در سه سطح ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰CFU/TEST PORTIONبا استفاده از مایه تلقیح شمارش شده از باکتریهای هدف مورد نظر شامل باکتری شیگلا فلکسنری ایجاد شد. بدین منظور نمونه‌های آلوده به‌طور مصنوعی با کشت تازه انکوبه‌شده در براث TSB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد/۱۸ تا ۲۰ ساعت، که از آن ۱ سوسپانسیون مک‌فارلند ($cfu/mL10^8$) تهیه شد و به‌صورت اعشاری تا $cfu/mL10^5$ رقیق و تلقیح شد. نتایج آزمون (cfu/g) با log10تبدیل و انحراف استاندارد تکرارپذیری درون نمونه (sr)طبق رابطه (۲) محاسبه شد. این معادل انحراف استاندارد نتایج log10 بود. در محاسبات از نرم افزار Microsoft Excelاستفاده شد [۲۱].

معادله ۱:

$$s_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n}\sum_{i=1}^{n}(y_{iA} - y_{iB})^2}$$

تجزیه و تحلیل هر بخش آزمایشی مطابق با روش‌های خاص برای میکروارگانیسم‌های هدف، مانند آزمایش‌های معمول انجام شد. تعداد کلنی ها بین ۳۰ تا ۲۵۰-۳۰۰ cfu/plate به عنوان نتایج قابل قبول در نظر گرفته شد. در جایی که i شاخص نمونه است، $i = 1$ تا $n\ (n \geq 10)$ و yiA، yiB داده های تبدیل شده با log10 در log10 cfu/g هستند. به ترتیب از شرایط A و B که شرایط A روش گرویمتریک دایلوتر و بگ فیلتر استریل و شرایط B روش متداول آزمایشگاهی (ارلن مایر و ترازوی آزمایشگاهی) استفاده شد. انجام محاسبات تخمین عدم قطعیت با استفاده از نرم افزار MicrosoftExcel استاندارد ایزو ۱۹۰۳٦انجام شد [۲۱].

۲-٦-روش محاسبه عدم قطعیت ماتریکس

عدم قطعیت ماتریکس با آزمایش چندین بخش آزمایشی از یک نمونه (ماتریکس) در شرایط تکرارپذیری (آزمونگر و تجهیزات یکسان و بچ های محیط کشت و رقیق کننده مشابه در مدت زمان کوتاه) برآورد شد. برای این تخمین از نمونه های انتخاب شده (۱۱×۱۰ گرم) از یک نمونه آزمایشگاهی (ماتریکس) طبق استانداردهای خاص آنالیز شد. شمارش کلنی در پلیت های دارای کلنی بین ۳۰ و ۲۵۰-۳۰۰cfu/g به عنوان نتایج قابل قبول در نظر گرفته شد. قابلیت اطمینان نتایج بر اساس ISO 14461-1 [۲۰] مورد آزمایش قرار گرفت و شمارش های غیر قابل اعتماد حذف شدند. واحدهای تشکیل دهنده در هر گرم، cfu/g) سپس log10 به- تبدیل شدند. انحراف استاندارد تکرارپذیری درون آزمایشگاهی (sR) طبق رابطه ۱محاسبه شد [۲۱].

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

معادله ۲:

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

که در آن n = 11، yi نتیجه تغییر شکل log10 قسمت آزمایشی i است و $\bar{y}$ میانگین نتایج در log10 cfu/g است.

ج. عدم قطعیت توزیع

عدم قطعیت استاندارد پواسون (UPoisson) در log10 cfu/g طبق فرمول (۳) محاسبه می شود [۲۱].

معادله ۳:

$$u_{Poisson} = \frac{1/\ln(10)}{\sqrt{\Sigma C}} = \frac{0.4343}{\sqrt{\Sigma C}}$$

که در آن ΣC مجموع کلنی های شمارش شده است. اگر ۱ =ΣC۰ (بدون شمارش کلنی) = UPoisson۰,٤٣٤٣.

د. عدم قطعیت مرکب و گسترش یافته(تعمیم یافته یا عدم قطعیت گسترده)

عدم قطعیت مرکب (Uc) ترکیبی از عدم قطعیت استاندارد فنی برآورد شده جداگانه، عدم قطعیت استاندارد ماتریسی و عدم قطعیت استاندارد توزیعی (معادله (٤)) است [۲۰].

معادله ٤:

$$u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{Poisson}^2}$$

در شرایطی که آزمایشگاه گزینه ۲ را برای تخمین عدم قطعیت خود انتخاب می کند، عدم قطعیت مرکب برابر با انحراف استاندارد تکرارپذیری درون آزمایشگاهی است (= UC SIR). از رابطه (۵) برای محاسبه عدم قطعیت گسترش یافته (۲، ضریب پوششk) استفاده می شود. که مربوط به سطح اطمینان ۹۵٪است [۲۱].

U =2(y)

معادله ۵:

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱-عدم قطعیت فنی

در محاسبه عدم قطعیت فنی در آزمون شمارش کلی در مواد غذایی مورد آزمون صرفا بر اساس آلودگی طبیعی محاسبه شده است زیرا در آزمون شمارش کل یطیف گسترده ارگانیسم‌ها شامل کلیه باکتری‌های هوازی مزوفیل همچنین انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و نیز انواع قارچ ها شامل مخمرها و کپک ها در محیط کشت عمومی امکان رشد دارند، در نتیجه امکان انجام آزمون و ایجاد آلودگی مصنوعی با توجه به طیف گسترده باکتری‌ها و قارچ‌ها امکان پذیر نمی‌باشد و ارگانیسم هدف قابل انتخاب و اعمال آلودگی مصنوعی ممکن نمی‌باشد، لذا در همه نمونه‌ها با آلودگی طبیعی محاسبات عدم قطعیت فنی انجام شد. در مورد نمونه های شیر پاستوریزه، فرادما و آب میوه از تنوع برند و حتی در مواردی نمونه‌های رد شده یا تاریخ انقضا رسیده بمنظور تنوع شدت آلودگی انتخاب گردید یا در مورد شیر پاستوریزه، انواع برند های مختلف و نیز انواع شیر پاستوریزه معمولی و بازمان ماندگاری طولانی تر (ESL) و در بازه زمانی روزهای متفاوت، استفاده شد تا تنوع شدت آلودگی در حد ممکن مقدور باشد.

عدم قطعیت فنی برحسب انحراف معیار تجدیدپذیری نتایج نهایی فرآیند اندازه‌گیری ، $U_{\hat{R}}$یا$S_{\hat{R}}$ در داخل یک آزمایشگاه، یا ارزیابی جداگانه عوامل منفرد موثر در عدم قطعیت عملیاتی یا فنی (داخل آزمایشگاهی) و ترکیب‌کردن آنها بدست می‌آید نتایج عدم قطعیت فنی تخمینی برای آزمایش‌های کمی برای تعداد کلنی‌های انتروباکتریاسه (ECC) و کلنی‌های هوازی قابل شمارش (ACC) در نمودار ۱فهرست شده‌اند. بیشترین میزان عدم قطعیت فنی برای (ECC) و (ACC) در آیتم های غذایی گوشت چرخ کرده خام، همبرگر، کیک، آرد گندم و فلفل مشاهده شد. در محاسبه عدم قطعیت فنی، داده ها به لگاریتم تبدیل می شوند تااثرات تغییر ناشی از سطوح متفاوت آلودگی در نمونه‌های مختلف کاهش یابد، همچنین انحراف معیار تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی به حالت نرمال برگردد. برای روش شمارش کلنی، نتایج شمارش مجموع پلیت‌های منتخب نباید کمتراز ۳۰، و بیشتر از ۳۰۰ یا هر عدد حداکثر تعیین‌شده در استاندارد خاص باشد. نتایج آزمون به لگاریتم تبدیل شد، برای ۱۰ نمونه آزمایشگاهی با استفاده از پروتکل تجربی و کسب نتایج (y_{iA}وy_{iB}) برای هر آزمونه، مقدار تخمینی انحراف معیار تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی محاسبه گردید. نتایج عدم قطعیت های فنی از ۰/۰٦ تا ۰/۸ متغیر است، می توان چنین نتیجه گرفت که مقادیر تکرارپذیری بهتر از مطالعات اعتبار سنجی بین آزمایشگاهی است یا با آنها مطابقت دارد. دقت خوب نتایج نشان می‌دهد که استفاده از این مقادیر قابل تکرارپذیری است و آنها را به عنوان معیارهای محدودیت در کنترل کیفیت داخلی قابل پذیرش است. نتایج ما همچنین با داده‌های آزمونISO مطابقت دارد که در آن تکرارپذیری درون آزمایشگاهی ۰,۱۰/logcfu/g (محدوده

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

۰/۰۷–۰/٦۰۱logcfu/g۰۱، میانگین (۰/۲۰۱) بدست آمد.

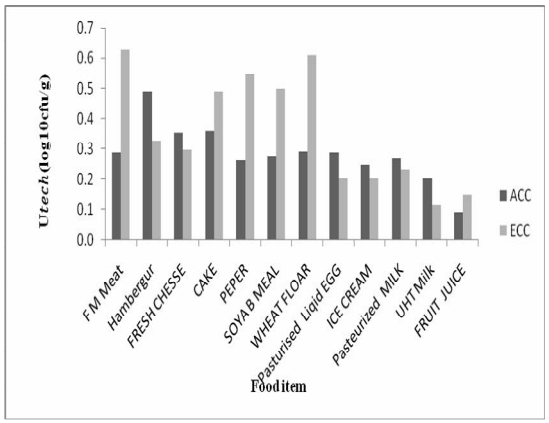

Fig 1 The technical uncertainty of microbiological test

By creating artificial pollution at triple levels in calculating the technical uncertainty of the ECC

ب:عدم قطعیت ماتریس

تخمین عدم قطعیت ماتریس در جدول ۳ آمده است. بیشترین عدم قطعیت ماتریس برای شمارش انتروباکتریاسه در گوشت چرخ کرده (logcfu/g۰,۵۲٤۱۰) و شمارش تعداد مزوفیل هوازی در پنیر تازه (logcfu/g۰,۵٤۱۱۰) بود. نتایجاین پژوهش بایافته‌های منتشر شده در گزارش کارآزمایی‌های ایزو ۲۰۰۵، درباره اندازه‌گیری عدم قطعیت[۲۲] مطابقت دارد، تفاوت ها نیز بعلت تفاوت در نوع ماتریسهای انتخابی بود.عدم قطعیت ماتریکس فقط به توزیع میکروبی در یک ماتریکس معیّن می‌پردازد یعنی تغییرات بین نتایج چند آزمونه از یک نمونه آزمایشگاهی را بررسی میکند و با عدم قطعیت نمونه برداری فرق دارد، مستقل از روش آزمون و اندازه‌ده است و با یکبار تخمین، همیشه برای همان نمونه صادق است و مقدار آن در فراورده های مایع بخوبی مخلوط شده، کوچک استولی در جامدات و غذاهای چند جزئی،مقداربزرگ تری دارد. عدم قطعیت برایباکتری های انتروباکتریاسه و مزوفیل در پنیر عمدتاً به دلیل سطح آلودگی بالای آن است، اگرچه وجود فلور رقابتی و عوامل ذاتی ماتریکس را نمی توان حذف کرد. عدم قطعیت ماتریکس در آزمون شمارش انتروباکتریاسه محاسبه شده است اما در آزمون میکروبی شمارش مزوفیل های هوازی APC در مورد ماتریکس های قابل همگن شدن مثل مایعات و پودر ها که قابلیت اختلاط و همگن و هموژن سازی را دارند بطور پیش فرض مقدار ثابت ۰/۱ در نظر گرفته میشود و در مواد غذایی ناهمگون مثل کیک، همبرگر، گوشت چرخ کردهو پنیر محاسبه شد و بیشترین تعداد باکتری در ماتریکس همبرگر و پنیر بدست آمد. با توجه به قوانین ذکر شده در استاندارد ISO 19036:2019، عدم قطعیت ترکیبی برابر با عدم قطعیت فنی است اگر با پروتکل های آزمایشگاهی و الزامات مشتری سازگار باشد.در این گزینه مقادیر تکرارپذیری درون آزمایشگاهی (SIR) به عنوان عدم قطعیت ترکیبی برای پارامتر، روش و ماتریس خاص استفاده می شود.استاندارد ISO 19036:2019 تاکید می کند تخمین عدم قطعیت فنی بر رویبک ماتریس منفرد نسبت به ماتریکس های متعدد قابل اعتماد تر و واقعی تر خواهد بود، لذا در این مطالعه از ماتریکس های متعدد در محاسبه عدم قطعیت استفاده شده است [٦].

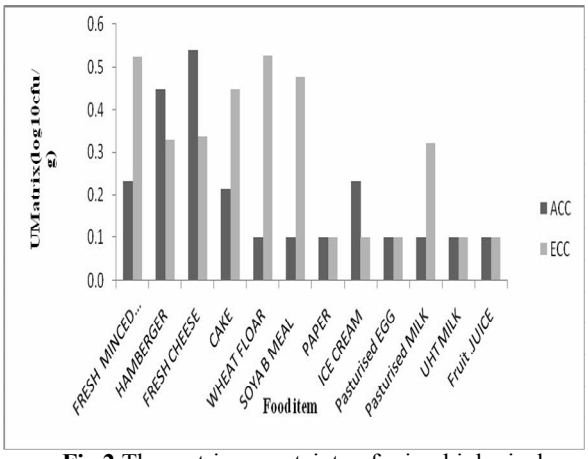

Fig 2 The matrix uncertainty of microbiological test

ج: عدم قطعیت مرکب و گسترش یافته:

جدول ۲عدم قطعیتمرکباز ترکیب عدم قطعیت فنی، عدم قطعیت ماتریس و عدم قطعیت توزیعی برای باکتری های آنتروباکتریاسه نشان دادهاست. بررسی نتایج عدم قطعیت مرکب برای شمارش آنتروباکتریاسه نشان داد که بیشترین مقدار بترتیب در فلفل، کیک، همبرگر و پنیر بدست آمد و کمترین مقدار در آرد گندم بود. این نتایج نشان می‌دهند که تکرارپذیری و تکرارپذیری بیشتر به یک روش تحلیلی ساده‌تر مرتبط است که نشان می‌دهد عدم قطعیت قطعاً به میزان کار دستی و تفسیر فردی نتایج مرتبط است.نتایج تأیید می‌کنند که کاهش این منابع خطا در کاهش کار و ساده‌سازی رویه‌ها و افزایش اتوماسیون مهم است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

Table 2 The Uncertinity copmonents of Enterobacteriaceae(ECC)counttest

Parameter/Food	Utech (log10 cfu/g)	Umatrix (log10 cfu/g)	U_{conf} (log10 cfu/g)	Upoisson (log10 cfu/g)	Uc(y) (log10 cfu/g)	UExpanded (log10 cfu/g)
FRESH MINCED MEAT	0.628	0.524	0. 108	0.062	0.827	1.626
HAMBERGER	0.325	0.329	0.0686	0.120	0.477	0.954
FRESH CHEESE	0.297	0.336	0.052	0.082	0.468	0.937
CAKE	0.490	0.449	0.0526	0.064	0.676	1.353
FLOAR WHEAT	0.547	0.528	0.088	0.0.64	0.768	1.536
SOYA B MEAL	0.498	0.476	0.076	0.52	0.689	1.432
PAPER	0.610	0.1	0.0399	0.064	0.709	1.419
CREAM ICE	0.202	0.1	0.0642	0.194	0.343	0.686
Pasturised EGG	0.201	0.1	0.0453	0.099	0.307	0.614
Pasturised MILK	0.232	0.322	0.0584	0.386	0.406	0.813
UHT MILK	0.115	0.1	0.0526	0.058	0.245	0.490
Fruit .JUICE	0.147	0.1	0.0478	0.647	0.289	0.579

در آزمونACC بدلیل وجود فلور میکروبی بالا و نداشتن میکروارگانیسم هدف مشخص آزمون تایید انجام نمیدهیم بنابرین تایید (UConfirmation) نداریم. نتایج بررسی نتایج عدم قطعیت مرکب برای شمارش باکتری های مزوفیل هوازی نشان داد که بیشترین مقدار بترتیب در فلفل، کیک و پنیر و کمترین مقدار در آبمیوه بود. نتایج عدم قطعیت Poisson برای باکتری های مزوفیل هوازی در تمام آیتم های غذایی ۰/۰۷۹ بدست آمد زیرا عدم قطعیت توزیع وابسته به تعداد کلنی های شمارش شده است، در تمام آیتم ها چون تعداد کلنی شمارش شده ۳۰ کلنی، ثابت ($\log^{۳}$ ۱۰) بوده است، بنابراین عدد ثابتی شده است.

Table 3 The Uncertinitycomponents ofACC test(for ∑C = 3log, 30000 cfu counts)

Parameter/Food	Utech (log10 cfu/g)	Umatrix (log10 cfu/g)	Upoisson (log10 cfu/g)	U*Combined*	
				$u_c(y)$	UExpanded (log10cfu/g)
F M Meat	0.286	0.233	0.079	0.377	0.755
Hambergur	0.490	0.449	0.079	1.341	0.670
FRESH CHESSE	0.354	0.541	0.079	1.302	0.651
CAKE	0.358	0.215	0.079	0.851	0.425
PEPER	0.264	0.1	0.079	0.586	0.293
SOYA B MEAL	0.276	0.1	0.079	0.608	0.304
WHEAT FLOAR	0.289	0.1	0.079	0.317	0.635
Pasturised Liqid EGG	0.286	0.233	0.079	0.755	0.377
ICE CREAM	0.247	0.1	0.079	0.238	0.476
Pasteurized MILK	0.268	0.1	0.079	0.317	0.634
UHT Milk	0.201	0.1	0.079	0.278	0.556
FRUIT JUICE	0.090	0.1	0.079	0.357	0.715

در این مطالعه آزمون های کمی میکروب شناسی پر کاربرد مذکور، برای مطالعه تعیین شاخص عملکردی انحراف معیار تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی یا عدم قطعیت اندازه گیری در راستای تعیین شاخص های عملکردی در تصدیق پیاده سازی روش های آزمون کمی و نیز معیار تضمین کیفیت نتایج آزمون های میکروبی و گزارش مقادیر محاسبه شده این مولفه ها و اعتبار بخشی به نتایج آزمون های میکروبی برای اولین بار در آیتم های غذایی منتخب پرکاربرد بر اساس دامنه کاربرد روش های آزمون و دامنه کاری آزمایشگاه مواد غذایی بر اساس روش های ارایه شده در استاندارد های ایزو ۱۹۰۳۶:۲۰۲۰[٦] برای اولین بار در ایران انجام گردید. در اینمطالعه مؤلفه عدم قطعیت اندازهگیریMU مرتبط در آزمون کمی میکروبی برای میکروارگانیسمهای مزوفیل هوازی و انتروباکتریاسه در بخش آزمایش و تهیه سوسپانسیون اولیه از نمونه آزمایشگاهی (تست) انواع مختلف ماتریس (بستنی پاستوریزه، شیر پاستوریزه، شیر فرادما، آبمیوه، آرد، کیک،

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

ادویه، گوشت چرخ کرده و همبرگر) بود، برشمرده شد.
نتایج این پژوهش نشان داد که توزیع ناهمگون میکروارگانیسم ها در ماتریس های غذایی یک واقعیت شناخته شده است. Rohde و همکاران [۲۳] اشاره کرد همگن سازی می تواند مسئول تفاوت های بین آزمایشگاهی قابل توجهی در تشخیص پاتوژن در گوشت باشد. توزیع فضایی آنها در غذا ممکن است تصادفی،یکنواخت (منظم، یکنواخت) و/یا مدل پخش یا توزیع گسترشی (تجمیعیا توده ای) باشد. توزیعیکنواخت و توزیع تصادفی به ندرت در غذا اتفاق می‌افتد، اما توزیع گسترشی میکروارگانیسم ها در غذا اغلب وجود دارد[۲٤]. این بدان معنی است که توزیع میکروارگانیسم ها به خوبی با توزیع نرمال مطابقت ندارد. در سوسپانسیون های ساده، توزیع میکروارگانیسم ها به خوبی با توزیع تصادفی پواسون مطابقت دارد، اما همیشه اینطور نیست. در مواد غذایی جامد و مرکب به دلیل وجود کلوخه و زنجیره توزیع پیچیده است. غذای جامد مانند همبرگر حاوی سلول‌ها و خوشه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها است که درون و بین ذرات اصلی غذا توزیع شده‌اند، که عموماً به‌طور تصادفی توزیع نمی‌شوند، بلکه به صورت توده‌های مسری توزیع می‌شوند[۲۵]. حتی نمونه‌های همگن شده به اندازه کافی، تغییراتی را در سطوح آلودگی بین بخش‌های مختلف آزمایش، به‌ویژه ماتریس‌های مواد غذایی جامد نشان می‌دهند. این تغییرات «عدم قطعیت ماتریس» هستند.

این مثال ها نشان می دهد که در غذاهای ناهمگن، تنوع بین نمونه ها به مقدار زیادی افزایش مییابد، در نتیجه میانگین میکروبی برای ترکیبات تشکیل دهنده غذاهای ناهمگن باید به سطح پایین تری منتقل شود، تا میزان آلودگی به همان مقدار برای یک غذای ناهمگن، به حداقل میزان ممکن برسد و قوانین مربوط به FSO برآورده شود. تنوع بین نمونه ها در غذاهای غیر همگنممکن است با گرفتن نمونه های بزرگتر یا ترکیب/همگن سازی مجموعه ای از نمونه های فرعی کاهش یابد. اگر این کار انجام شد، تعداد توزیع نمونه ها در مرحله ۱ تغییر خواهد کرد و روند تعیین عدم قطعیت باید تکرار شود.
سری استاندارد های ایزو ۱٦۱٤۰ [۱٦] آزمایشگاه های کاربر را بر اساس اصول و الزامات ایزو ۱۷۰۲۵ [۵] توانمندی و ظرفیت اجرا و پیاده سازی درست روش آهای آزمون مرجع یاری می کند. این امر با اجرای تصدیق روش آزمون بر اساس استاندارد ایزو ۱٦۱٤۰-۳ [۱٦] میسر می شود. در تصدیق پیاده سازی روش های ازمون کمی، شاخص عملکردی انحراف معیار استاندارد تجدید پذیری درون آزمایشگاهی (SIR) معادل عدم قطعیت بر اساس استاندارد ایزو ۱۹۰۳٦ [٦] محاسبه می شود این شاخص در آیتم های غذایی که در مطالعه اعتبار بخشی روش آزمون کمی تعیین شده اند محاسبه و در مقایسه با حد پذیرشاعلام می شوند. مطالعات دیگری نیز در زمینه پیاده سازی استاندارد های ایزو ۱٦۱٤۰ انجام شده است [۱٦].
Arienzo[۲٦]روی سه روش مختلف آنالیز میکروبیولوژیکی برای تشخیص و تعیین کمیت کلی فرم‌های کل بررسی کرد. روش شمارش بشقاب، روش شمارش صفحات MPetrifilmTM۳و روش.MBS ،برای هر سه روش سهم Rکلو R کمتر از ۱۰ درصد است که نشان دهنده توانایی ارزیابی دقیق غلظت کل کلیفرم‌ها در نمونه‌های غذایی است. نتایج بررسیSIR در هر سه روش اندازه گیری کلی فرم ها نشان داد که که یک تغییر قابل‌توجه به دلیل تعامل بین اپراتورها و نمونه‌های آنالیز شده برای روش‌های شمارش صفحه و تعداد صفحاتPetrifilmTM3M است، در حالی که برای روشMBS تأثیر قابل‌توجهی بر اندازه‌گیری ندارد.
Savianoو همکاران [۲۷] تاثیر همبستگی داده ها در عدم قطعیت اندازه گیری و در نتیجه در خطر تصمیمات انطباق را بررسی نمودند. روش های سریع میکروبیولوژیکی (RMM) برای تعیین قدرت آنتی بیوتیک های سفالوسپورین در محصولات دارویی با استفاده از روش انتشار آگار انجام شد. اثرات تحلیلی مشترک روی بازداری منجر به همبستگی داده‌ها شد که به طور قابل‌توجهی عدم قطعیت‌های اندازه‌گیری ترکیبی و در نتیجه خطر تصمیم‌گیری انطباق نادرست را کاهش داد. با توجه به توزیع لگاریتم نرمال مقادیر توان، عدم قطعیت های اندازه گیری به عنوان یک عامل عدم قطعیت گزارش شد.
بسیاری از مطالعات اندازه گیری عدم قطعیت در میکروبیولوژی سطح بالایی از عدم قطعیت را گزارش کردند. در مطالعه Jarvis و همکاران [۷] کارآزمایی‌های بین آزمایشگاهی برای بررسی عدم قطعیت داده‌های به‌دست‌آمده با روش‌های میکروبیولوژیکی استاندارد برای میکروارگانیسم‌های هوازی، انتروباکتریاسه و *E. coli* در یک ماتریکس ساده انجام شد. این مطالعه نشان داد که مقادیر تکرارپذیری از ۹,۳ تا

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

۱۲٫۱٪ (مطابق با ۰٫۵۸ – ۰٫۷۷ cfu/g ۱۰log) برای میکروارگانیسم های هوازی، از ۱٤٫۰ تا ۱۷٫٤٪ (مطابق با ۰٫۷۲ – ۰٫۸۸ logcfu/g۱۰) است و برای *E. coli* (۱٫۰۰ – ۱٫۳۸ logcfu/g۱۰) بود. نتایج این مطالعه سطح بالایی از عدم قطعیترا نشان داد که بسیار گسترده تر از آن چیزی است که از قانون میکروبیولوژیکی رایج مورد استفاده در کلنی انتظار می رود.

Rezic Dereani و Matek Sarić[۸] روش‌های کنترل کیفیت، روش‌های اعتبارسنجی و تعیین عدم قطعیت اندازه‌گیری (MU) به عنوان یک عنصر مهم تضمین کیفیت در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی برای نوع کمی و کیفی آنالیزرا بررسی کردند. تفاوت‌های بین طراحی آزمایش‌های اعتبارسنجی برای تجزیه و تحلیل میکروبیولوژی کمی و کیفی مواد غذایی در این تحقیق مورد بحث قرار گرفته و نشان داد که محاسبات MU بر اساس داده های تست مهارت خارجی و داده های اعتبارسنجی داخلی است.

روش های استاندارد شده بر اساس روش های استاندارد کشت میکروبیولوژیکی سنتی که به طور گسترده در آزمایشگاه های آنالیز مواد غذایی استفاده می شود، می باشند که اینروش‌ها مشکلات متعددی مانند ذهنی بودن در تفسیر برخی آزمایش‌های بیوشیمیایی یا مورفولوژیکی و تداخل احتمالی ماتریس‌ها، به‌ویژه زمانی که سطوح بالایی از آلودگی را ارائه می‌دهند، ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، هزینه بالای آزمون‌ها هم از نظر نیروی کار و منابع و مهمتر از همه، با زمان طولانی مورد نیاز برای به دست آوردن نتایج قطعی (از ۳ تا ۷ روز) مشخص می شوند. ارزیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری بخشی جدایی ناپذیر از آزمون‌های میکروبی است بطوریکه نتایج اندازه‌گیری شده را نمی‌توان بدون حداقل آگاهی از عدم قطعیت مرتبط به درستی تفسیر کرد.برای اطمینان بخشی به مقدار اندازه گیری شده در واقع باید خطاهای اندازه گیری شناسایی و اثر احتمالی آنها بر نتیجه تخمین زده شود.ارزیابی عدم قطعیت ها برای کمی سازی بهتر و بهبود کیفیت اندازه گیری های میکروبی ضروری است. به ویژه شناسایی و شمارش مطمئن میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی را می‌توان به عنوان یکآزمون نسبتاً پیچیده از نظر شرایط متفاوت آزمون ماتریس و تفسیر انسان در نظر گرفت[۲۸]. نتایج نشان می‌دهد که عدم قطعیت مطمئناً به میزان کار دستی و تفسیر فردی نتایج مربوط می‌شود، و نشان می‌دهد که کاهش این منابع خطا برای به دست آوردن نتایج قابل اعتمادتر مهم است.

٤-نتیجه گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که عدم قطعیت فنیبر مقدار عدم قطعت اندازه گیری تاثیر دارد، و این تاثیر می تواند بسیار زیاد باشد. عدم قطعیت های فنی روش های کمی انجام شدهدر آزمایشگاه کم و ناچیز بودند. عدم قطعیت ماتریس در آیتم های غذایی ناهمگون بیشترین تاثیر را دارد و عامل عدم قطعیت ترکیبی در ماتریس های مواد غذایی مرکب بود. حتی عدم قطعیت اختصاص داده شده ۰٫۱ cfu/g ۱۰log برای ماتریس های همگن از بسیاری از عدم قطعیت های فنی محاسبه شده، بیشتراست. عدم قطعیت ماتریس را می توان با همگن سازی خوب نمونه قبل از گرفتن بخش های آزمایش به حداقل رساند، اما این عامل کاملاً تحت کنترل آزمایشگاهی نیست. با این حال، عدم قطعیت فنی ناشی از تغییر در عملیات آزمایشگاهی در طول تجزیه و تحلیل است، بنابراین اگر به درستی کنترل شود، سهم عدم قطعیت فنی بسیار ناچیز خواهد بود. نتایج این آزمون می تواند به آزمایشگاه های مرجع برای جلوگیری از استفاده از روش های متعدد برای یک آزمون هدف، نهادهای نظارتی و سیستم های تایید صلاحیت استاندارد های تخصصی تضمین کیفیت نتایج آزمایشگاه، اعتبار بخشی و تصدیق در مرحله پیاده سازی روش های استاندارد مرجع میکروب شناسی مواد غذایی، هماهنگی و تسهیل ایجاد کند.بر اساس اصول مدیریت تضمین کیفیت نتایج آزمون و اعتباربخشی نتایج آزمایشگاه‌های آزمون، صرفا استفاده از روش های اعتبار بخشی و تصدیق شده، برای دستیابی به نتایج آزمون دقیق و قابل اعتماد و رفع نیاز مشتریان به طور گسترده پذیرفته شده است تا نتایج قابل اعتماد تولید و ارایه شود. این نتایج به مدیران برای پایش کارایی و عملکرد سیستم های کیفیت و ارزیابی و کنترل‌های رسمی سیستم های نظارتی، برای کارشناسان آزمون کننده، می توانند راهگشا باشد و در انتخاب روش‌هایی که آزمایشگاه‌های آزمون میکروب شناسی نمونه های مواد غذایی استفاده می‌کنند و برای هدفشان مناسب هستند، تسهیل نمایند این آزمایشگاه‌ها، برای تأیید انطباق نتایج بدست آمده با ویژگی‌های عملکردی تعریف شده در چارچوب

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

دستورالعمل های استاندارد های ایزو (EN ISO 17025) و سری استاندارد های ۱٦۱٤۰-۳ و ۱۹۰۳٦ ، برای اعتبار سنجی پیاده سازی روش های آزمون استاندارد مرجع میتوانند آمادگی کسب نمایند تا در مراحل ارزیابی و پایش موفق به کسب تاییدیه های ملی و بینالمللی معتبر شوند این مطالعه روند عینی گرد اوری و تخمین مولفه های عدم قطعیت در ازمون های کمی میکروب شناسی مواد غذایی را ارایه میدهد که در سطح آزمایشگاه های میکروب شناسی مواد غذایی قابلیت بهره بردای خواهد داشت. مشاهده این نتایج نشان می‌دهند که تجدیدپذیری و تکرار پذیری بیشتر به یک روش تحلیلی ساده‌تر مرتبط است که نشان می‌دهد عدم قطعیت قطعاً به میزان کار دستی و تفسیر فردی نتایج مرتبط است.

۵- منابع

[1] Jarvis, B. (2016). The distribution of microorganisms in foods in relation to sampling. Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods, 45-69.

[2] Do Prado-Silva, L.; Brancini, G.T.P.; Braga, G.Ú.L.; Liao, X.; Ding, T.; Sant'Ana, A.S. (2022). Antimicrobial photodynamic treatment (aPDT) as an innovative technology to control spoilage and pathogenicmicroorganisms in agri-food products: An updated review. Food Control, 132: 108527.

[3] Saviano, A. M., da Silva, R. J. B., & Lourenço, F. R. (2019). Measurement uncertainty for the potency estimation by rapid microbiological methods (RMMs) with correlated data. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 102: 117-124.

[4] Corry, J. E., Jarvis, B., Passmore, S., & Hedges, A. (2007). A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms. Food microbiology, 24(3), 230-253

[5] Anonymous, EN ISO /IEC 17025, 2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, is the international reference for testing and calibration laboratories wanting to demonstrate their capacity to deliver reliable results.

[6] ISO 19036:2019: Microbiology of the food chain – Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.

[7] Jarvis, B., Hedges, A. J., & Corry, J. E. (2007). Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. International journal of food microbiology, 116(1): 44-51.

[8] Rezic Dereani, V., & Matek Sarić, M. (2010). Validation and measurement uncertainty estimation in food microbiology: differences between quantitative and qualitative methods, Mljekarstvo, 60 (3): 207-213

[9] Kornacki, J. L. and Johnson, J. L. "2001. Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators," Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods,4: 69-82.

[10] ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1978). Microorganisms in Foods. 1. Their significance and methods of enumeration. Toronto: University of Toronto Press.

[11] EC Regulation 2073/2005 (2005). Commission regulation (EC) no. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Off J Eur Union L338:1–25

[12] Regulation On Turkish Food Codex, Regulation On Turkish Food Codex (5) Microbiological Criteria , Law of Authorization: 5996 , Official Gazette of Publication: 29. 12. 2011 -28157, Microbiological Criteria, www.tarimorman.gov.tr.

[13] El-Ziney, M. G. (2018). Evaluation of microbiological quality and safety of milk and dairy products with reference to European and Gulf Standards. Food and Public Health, 8(2):47-56.

[14] M5 1400 , Zabeteh Microbiological Spesification , M5-1400 ,2021, IRAN FDO: https://fdlabnet2.fda.gov.ir//Help/PDF/20762_PZ.pdf

[15] ISIRI : 2395, 2406, 2304, 11063, 2304,2303, Iranian National Standardization Organization (INSO) No. 2592 . Website: http://www.isiri.gov.ir

[16] Anonymous, EN ISO 16140-3: (2020). Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3, Protocol for the verification of reference methods and

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

[23] Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., & Al Dahouk, S. (2015). Sampling and homogenization strategies significantly influence the detection of foodborne pathogens in meat. BioMed Research International, (5):1-8

[24] Augustin, J.-C., Carlier, V. (2006). Lessonsfromtheorganisation of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts, Food Microbiology, 26:1–38.

[25] Pendrill, L.(2014) Using measurement uncertainty in decision-making and conformity assessment. Metrologia, 206–18.

[26] Arienzo, A., Losito, F., Stalio, O., & Antonini, G. (2016). Comparison of uncertainty between traditional and alternative methods for food microbiological analysis. Am J Food Technol, 11(1-2), 29-36.

[27] Saviano, A. M., da Silva, R. J. B., & Lourenço, F. R. (2019). Measurement uncertainty for the potency estimation by rapid microbiological methods (RMMs) with correlated data. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 102: 117-124.

[28] Uhlig, S., & Gowik, P. (2018). Efficient estimation of interlaboratory and in-house reproducibility standard deviation in factorial validation studies. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 13(3): 315-322

validated alternative methods in a single laboratory.

[17] Keykhosravy, K., Khanzadi, S., Hashemi, M., Azizzadeh, M. (2020). Chitosan-loaded nanoemulsion containing Zataria Multiflora Boiss and Bunium persicum Boiss essential oils as edible coatings: Its impact on microbial quality of turkey meat and fate of inoculated pathogens. International journal of biological macromolecules. 150:904-13.

[18] Anonymous (2004). ISO 21528-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count method. International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland.

[19] Nyamakwere, F., Muchenje, V., Mushonga, B., Makepe, M., Mutero, G. (2016). Assessment of Salmonella, Escherichia Coli, Enterobacteriaceae and Aerobic Colony Counts Contamination Levels During the Beef Slaughter Process. Journal of Food Safety. 36(4):548-56.

[20] ISO 14461-1: (2005). Milk and milk products – Quality control in microbiological laboratories – Part 1: Analyst performance assessment for colony counts

[21]https://committee.iso.org/sites/tc34sc9/home/general-standards/content-left-area/culture-media/iso-19036-estimation-of-measurem.html

[22] Anonymous, (2005). Statistical methods for use in proficiency testing by 116 interlaboratory comparison. International Sandardization Organization, vol.13528.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-02-08]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.133.201]

Estimation and comparison of interalaboratoarystandarad deviation (SIR) measurement uncertainty in Quantitative microbiological tests in different food items based on EN ISO:19036-2019

Khezri, M. [1] , Khanzadi, S. [1]* , Hashemi, M. [2]

1. Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Food Hygiene and Aquaculture, Faculty ofVeterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2023/ 01/ 13
Accepted 2023/ 03/ 07

Keywords:

Aerobic mesophilic microorganisms, Enterobacteriaceae, Impementation verification, Measurement uncertainty, Performance characterisrics, reproducibility standard deviationand verification.

DOI: 10.22034/FSCT.20.134.201
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.134.15.9

*Corresponding Author E-Mail: khanzadi@um.ac.ir

ABSTRACT

The aim of study was estimated and compared intra-laboratory quantification deviation (SIR) or measurement uncertainty (MU) as a performance Charateristics in verification of the implementation step of quantitative test methods in food microbiology laboratories.The *aerobic mesophilic* colony counts of microorganisms (ACC) and *Enterobacteriaceae* colony count (ECC), as two important and common tests in the microbial evaluation of all type of food was selected and interlaboratoary standard deviation estimation of selected food items: minced meat, hamburger, soy powder, pasteurized liquid eggs, pasteurized and UHT milk, ice cream, Fruit juice, flour, cake and spice (PEPER) were calculated based on ISO-19036 standard method (2019).In this comparison, technical, matrix, distribution, confirmation and combined Uncertinity were calculated and reported.Calculation of the technical uncertainty of the ECC test in (pasteurized and ultra-heated milk, ice cream, fruit juice and pasteurized liquid eggs) by created the artificial contamination on three levels with the target organism (*Shigella felxseneri*) and in other food items it was natural contamination, in the ACC test was only natural contamination was calculated. The technical uncertainty results of the ECC test ranged from 0.487 to 0.07 and in the ACC test, from 0.390 to 0.105 log10 cfu/g. The highest values of technical and matrix uncertainty were observed in meat, cake, hamburger and cheese samples, which showed the heterogeneous foods (solid and semi-solid) and the lowest values were observed in liquid (homogeneous) samples. Evaluation of variability and followed the uncertainty is proposed as a way to standardize the expression of variability associated with data obtained in microbiological methods to highlight the causes and extent of several influencing factors.