

DOI: 10.7251/VJRS1302229DJ

UDK 543.068.08:616-008.87

Драгица Ђурђевић-Милошевић,<sup>1</sup> Весна Калаба,<sup>2</sup> Милка Стијепић<sup>3</sup>

## ПРОЦЕНА МЕРНЕ НЕСИГУРНОСТИ ПРИ ОДРЕЂИВАЊУ БРОЈА БАКТЕРИЈА *ENTEROBACTERIACEAE*

### Кратак садржај

Микробиолошке анализе имају значајну улогу у мониторингу квалитета хране, а висока мерна несигурност може потенцијално имати утицај на валидност добијених резултата с обзиром на постојеће микробиолошке критеријуме.

Циљ овог рада је био да се одреди ниво мерне несигурности у оквиру унутар-лабораторијске студије. Контаминирани су узорци стерилизованог млека бактеријом *Escherichia coli* ATCC 25922, а за бројање бактерија *Enterobacteriaceae* коришћена је метода ISO 21528-2. Добијени резултати су коришћени за прорачун стандардне девијације репродукцибилности, и из ње изведене проширене мерне несигурности. Добијени резултати су показали да је стандардна девијација репродукцибилности била 0,11, а проширена мерна несигурност 0,22, изражено преко логаритамске вредности броја колонија.

**Кључне речи:** *Enterobacteriaceae*, бројање колонија, мерна несигурност.

---

Dragica Đurđević-Milošević,<sup>1</sup> Vesna Kalaba,<sup>2</sup> Milka Stijepić<sup>3</sup>

## ESTIMATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY OF *ENTEROBACTERIACEAE* COLONY COUNT

### Abstract

Microbiological analysis play important role in the monitoring of food quality and high levels of microbiological uncertainty must have a potential impact on the compliance of test results with microbiological criteria.

The aim of this paper was to determine the levels of measurement uncertainty obtained in interlaboratory study. Samples of sterilized milk were spiked with

---

<sup>1</sup> Анахем лабораторија Београд, Моцартова 10.

<sup>2</sup> Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука.

<sup>3</sup> Висока медицинска школа Приједор, Николе Пашића.

*Escherichia coli* ATCC 25922 and applied method for counting of *Enterobacteriaceae* was ISO 21528-2. The data sets were analysed to determine the standard deviations of reproducibility, based on log<sub>10</sub> colony count values, and thence the relative measures of expanded uncertainty. Obtained results showed standard deviations of reproducibility  $S_R=0.11$ , and expanded uncertainty 0.22, based on log<sub>10</sub>.

**Key words:** *Enterobacteriaceae*, colony count, measurement uncertainty.

## УВОД

*Enterobacteriaceae* је велика породица грам-негативних бактерија које су нормални становници гастроинтестиналног тракта људи и животиња (Donnenberg, 2010). Будући да породици припада више од 70 родова, неки припадници имају посебан значај када је у питању микробиолошка исправност намирница и уопште здравље људи и животиња, нпр. *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Enterobacter*... Нажалост, у новије време је све више информација о израженој резистентности ентеробактеријацеа према антибиотцима и, следствено томе, проблемима везаним за лечење људи и животиња (Peterson, 2006).

Једна од метода за изолацију и бројање бактерија породице *Enterobacteriaceae* је међународна метода ISO 21528-2:2004 (Анон., 2004), која дефинише ове бактерије као микроорганизме које формирају карактеристичне колоније на ружичасто-црвеном жучном глукоза агару (violet red bile glucose agar – VRBGA), ферментишу глукозу и показују негативну оксидаза реакцију када се проводи тест у скла-

ду са овим делом ISO 21528. Будући да су аналитичке методе извор различитих систематских и рандомских грешака које могу утицати на тачност резултата, пожељно је уз верификацију методе извршити и процену мерне несигурности методе (estimation of measurement uncertainty – MU). Према ISO/TS 19036:2006 (Анон., 2006), мерна несигурност представља величину која карактерише дисперзију резултата која се може повезати са процесом мерења и израчунава се из стандардне девијације репродукцибилности. Репродуцибилност представља блискост слагања између појединачних резултата испитивања на идентичном узорку, користећи исту методу од стране различитих аналитичара у различитим лабораторијама користећи различиту опрему – међулабораторијска репродукцибилност, или различитих аналитичара у истој лабораторији – унутарлабораторијска репродукцибилност. Односно, процена мерне несигурности омогућава одређивање средње вредности која се може користити за поређење укупне варијабилности аналитичке процедуре која се проводи у само једној лабораторији

или између различитих лабораторија (Corry et al., 2007).

Према ISO/TS 19036:2006 (Анон., 2006), постоје различити начини за добијање експерименталних резултата из којих се израчунава стандардна девијација репродукцибилности ( $S_R$ ), и то:

1. стандардна девијација репродукцибилности добијена на основу резултата унутар лабораторије,
2. стандардна девијација репродукцибилности изведена из међулабораторијске студије, и
3. стандардна девијација репродукцибилности изведена из међулабораторијског тестирања оспособљености (proficiency testing). Приоритет би требало да буде на првој опцији, па је и у овом раду мерна несигурност изведена из унутарлабораторијских експеримената, а тиме и на основу унутарлабораторијске репродукцибилности.

Процена мерне несигурности према Анон. (2006) примењује се за квантитативне методе микробиолошких анализа производа намењених за исхрану људи и животиња, као и узорак из животне средине у поручју производње и руковања храном. Стандард ISO/TS 19036:2006 се не примењује на методе бројања микроорганизама метом MPN (most probable number) техником, или анализе узорака са ниским бројем микроорганизама.

Препорука је да се приликом дијагна експеримената користе природно контаминирани узорци, будући

да се на такав начин добија реалистичнија вредност мерне несигурности. Ако се изводи претходно контаминација узорка, тј. спајковање, захтевају се изузетно контролисани услови да не би дошло до варирања резултата. Спајковање треба извести тако да покрије присуство позадинске микрофлоре, ако је присутна. Уз то, треба водити рачуна да физиолошко стање микроорганизама (нпр. стресно стање) може да утиче на варијације резултата, и требало би да буду што сличнији стањима током рутинског тестирања (Анон., 2006).

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Направљена је суспензија бактерија *Escherichia coli* ATCC 25922 у физиолошком раствору до постизања вредности 4 McF скале на дензиметру. Разређења су припремљена према Анон. (1999), а као разређивач је коришћен физиолошки раствор (Торлак, Београд). Узорак од 10 мл комерцијалног стерилизованог млека је контаминиран (спајкован) са 1 мл разређења  $10^{-4}$  припремљене суспензије бактерија *Escherichia coli* ATCC 25922 и разређен са 90 мл пуферисане пептонске воде (Торлак, Београд). Сукцесивно, десет дана су два аналитичара контаминирали узорак стерилизованог млека према горњој процедури и даље примењивали методу ISO 21528-2 (Анон., 2004). Паралелно са контаминираним узорцима, засејаван је и иницијални узорак ради провере присуства позадинске микрофлоре.

Одређивање и бројање бактерија *Enterobacteriaceae*, у нашем случају бројање бактерија *Escherichia coli* ATCC 25922, урађено је у складу са ISO 21528-2 (Анон., 2004). Други део ISO 21528 прописује методу, без предбогаћења, за детекцију и бројање бактерија *Enterobacteriaceae*. Примењив је на производе намењене за исхрану људи и исхрану животиња, те узорке из животне средине у подручју производње хране и руковања храном.

Укратко, припремљено децимално разређење суспензије културе инокулира се наливном техником у по две петри плоче за свако разређење. Љубичасто-црвени жуч глукозни агар (Торлак, Београд), претходно припремљен и охлађен на 44–47°C, налива се у два слоја. Прво се налије 10 мл и хомогинизује са већ претходно наливеним инокулумом, а након солидификације подлоге, налије се додатних 15 мл подлоге. Други слој подлоге треба да онемогући сливени раст колонија и да обезбеди полуанаеробне услове. Плоче се инкубирају на 37°C током 24 h ± 2 h. Колоније карактеристичног израста за *Enterobacteriaceae* треба сукултивисати на храњиви агар (Торлак, Београд) као неселективну подлогу, а потом потврдити на тест ферментације глукозе и присуство енизма оксидазе. За ферментацију глукозе коришћен је глукозни агар (Торлак, Београд), а за доказ присуства оксидазе коришћене су траке са реагентом произвођача Merck (Немачка). Број бактерија *Enterobacteriaceae* се рачуна

на основу броја потврђених типичних колонија.

Прорачун мерне несигурности је извршен према ISO 19036 (Анон., 2006):

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

где су:

$y_{ij}$  – резултати трансформисани у логаритме, тј.  $Y$  резултати трансформисани у логаритме, тј.  $\log_{10}$  (cfu/g) или  $\log_{10}$  (cfu/ml),

$i$  – индекс узорка,  $i = 1$  до  $n$ , при чему је  $n \geq 10$ ,

$j$  – индекс услова репродукцибилности  $j = A$  или  $B$ ,

$A$  и  $B$  – ознаке за аналитичаре.

Мерна несигурност, одређена према горњим упутствима, може се навести у извештају заједно са резултатима теста као интервал у  $\log_{10}$  или као број колонија cfu по граму или милилитру матрикса, или као проценат.

Ако се резултати изразе као  $y = \log_{10}x$ , а мерна несигурност као стандардна девијација репродукцибилности  $S_R$ , онда се проширена мерна несигурност за интервал поврећа 95% и фактор 2 може изразити као  $2S_R$ , а резултати на један од следећих начина:

- $y \pm 2S_R$  (log),
- $y \log [y - 2S_R, y + 2S_R]$ ,
- $x$  cfu/g или  $x$  cfu/ml  $[10^{y-2S_R}, 10^{y+2S_R}]$ ,

–  $x$  cfu/g или  $x$  cfu/ml  $[10^y - (10^{y-2SR}/10^y) \%, 10^y + (10^{y+2SR}/10^y) \%]$ .

## РЕЗУЛТАТИ

Након експерименталне процедуре наведене у методама рада, пребројане су колоније са инкубираних петри плоча које су имале карактеристичан

израст љубичастих колонија са израженом зоном преципитације. Тестиране колоније су показале глукоза позитивну реакцију и оксидаза негативну реакцију. Број израслих колонија је наведен у табели 1. и трансформисан у логаритамске вредности. Узорци слепе пробе, тј. неконтаминирани узорци нису показали пораст на петри плочама са VRBGA.

**Табела 1.** Прорачун стандардне девијације репродукцибилности

| i  | $X_{iA}$ | $X_{iB}$ | $Y_{iA} = \log_{10}(X_{iA})$ | $Y_{iB} = \log_{10}(X_{iB})$ | $(Y_{iA} - Y_{iB})^2 / 2$ |
|----|----------|----------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1  | 2450     | 1470     | 3,389                        | 3,167                        | 0,0246                    |
| 2  | 2730     | 2800     | 3,436                        | 3,447                        | 0,0001                    |
| 3  | 2220     | 1520     | 3,346                        | 3,182                        | 0,0135                    |
| 4  | 1920     | 2420     | 3,283                        | 3,384                        | 0,0051                    |
| 5  | 2180     | 2000     | 3,338                        | 3,301                        | 0,0007                    |
| 6  | 2100     | 2650     | 3,322                        | 3,423                        | 0,0051                    |
| 7  | 1900     | 2820     | 3,279                        | 3,450                        | 0,0147                    |
| 8  | 2450     | 1740     | 3,389                        | 3,241                        | 0,0110                    |
| 9  | 1830     | 3300     | 3,262                        | 3,519                        | 0,0328                    |
| 10 | 1780     | 2600     | 3,250                        | 3,415                        | 0,0135                    |

i – редни број експеримента,

$x_{iA}$  – број колонија, аналитичар А,

$x_{iB}$  – број колонија, аналитичар В,

$y_{iA}$  – логаритамска вредност броја колонија, аналитичар А,

$y_{iB}$  – логаритамска вредност броја колонија, аналитичар В.

Користећи резултате из табеле 1, израчуната је мерна несигурност према формули из метода рада и износи  $S_R=0,11$ , а проширена мерна несигурност 0,22.

За добијене резултате у  $\log_{10}$  cfu/g или cfu/ml при примени методе ISO 21528-2, може се извести у  $\log \pm 0,22$ .

Нпр. за резултат  $10^3$ , вредност би требало, с обзиром на проширену мерну несигурност, изразити као:

–  $3,0 \log \pm 0,22$ ,

–  $3,0 \log [3,22; 2,78]$ ,

–  $10^3$  cfu/ml [ $1,7 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^2$ ],

–  $10^3$  cfu/ml [ $10^3 + 70\%$ ;  $10^3 - 40\%$ ].

## ДИСКУСИЈА

Мерна несигурност добијених резултата при провођењу микробиолошких испитивања хране је карактеристика која се може придружити резултатима квантитативних анализа. Уједначеност резултата при испитивању делова истог узорка у различитим лабораторијама представља императив у

развоју микробиолошке аналитке, а тиме и процена мерене несигурности добија све више на значају и постаје предмет интереса не само стручне, већ и научне јавности, пре свега због још увек нерасветљених параметара који утичу на варијације добијених резултата. Тако су Jarvis et al. (2007a) обрадили резултате добијене при одређивању мерне несигурности добијене током провере оспособљености (proficiency testing) добијене из Central Science Laboratory (York) и резултате добијене из интерлабораторијске студије метода проведених у лабораторијама које улазе у састав Health Protection Agency (HPA). Добијени резултати су обрађени у циљу добијања стандардне девијације репродукцибилности (relative standard deviations of reproducibility – RSDR), базиране на декадној логаритмској вредности из бројаних колонија, а затим и проширеној мерној несигурности. Резултати тестирања оспособљености су показали екстремне вредности RSDR чак и до +/-30%, зависно од тестираног микроорганизама, лабораторије учесника и примењене методе. Код уобичајених узорака RSDR је била око +/-12%, али у неким случајевима и до +/-41%. С друге стране, интерне провере су показале RSDR око +/-27%, зависно од примењене процедуре и испитиваног микроорганизама. Резултати су показали мале разлике у мерној несигурности зависно од типа инокулације (наливна техника, техника размаза или спирални плејтинг). Није уочен утицај различитих матрикса на мерну несигурност. Након

поређења добијених резултата, закључено је да добијене вредности за мерну несигурност у оквиру тестирања оспособљености (proficiency testing) нису битно горе од оних добијених у интра-лабораторијском испитивању.

Резултати међулабораторијског тријала у коме су учествовала по три аналитичара из 19 лабораторија у процени укупног броја бактерија *Enterobacteriaceae* ISO методом показали су да је мерна несигурност репродукцибилности била од 14,0% до 17,4%, а мерна несигурност поновљивости од 4,1% до 6,7%, рачунато преко укупног броја израженог у log<sub>10</sub> (Jarvis et al., 2007b).

Augustin et Carlier (2006) истраживали су резултате тестирања оспособљености добијене у French microbiology proficiency scheme (RAEMA) у периоду 1999–2003. Резултати су показали да је релативна стандардна девијација репродукцибилности била 15±5% за укупан број аероба, 20±8% за *Enterobacteriaceae*, и 20±9% за *Escherichia coli*. Сличне вредности су нађене и за многе друге групе микроорганизама, са изузетком сулфито-редукујућих клостридија за које је релативна стандардна девијација репродукцибилности била и до 94%.

С обзиром на горе изложене литературне наводе, наши резултати представљају допринос овој проблематици и представљају иницијално испитивање које треба да се развије у тестирање различитих матрикса и употребу различитих појединачних и

мешаних култура које припадају породици *Enterobacteriaceae*.

## ЗАКЉУЧЦИ

Увођење методе у једну лабораторију захтева претходну верификацију, односно прикупљање доказа да је лабораторија у могућности да проводи методу. Мерна несигурност представља величину која карактерише дисперзију резултата, што се може повезати са процесом мерења, а израчунава се из стандардне девијације репродукцибилности. Репродуцибилност представља блискост слагања између појединачних резултата испитивања на идентичном узорку, кориштењем исте методе од стране различитих аналитичара у различитим лабораторијама, уз различиту опрему – међулабораторијска репродукцибилност, или различите аналитичаре у истој лабораторији – унутарлабораторијска репродукцибилност.

Применом смерница из ISO 19036 (Анон., 2006) израчуната је мерна несигурност за бројање ентеробактеријацеа методом ISO 21528-2 (Анон., 2004) и износи  $S_R=0,11$ , а проширена мерна несигурност 0,22.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анон. (1999): *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination — Part 1: General Rules for the Preparation of the Initial Suspension and Decimal Dilutions*. ISO 6887-1.
2. Анон. (2003): *Microbiology of Food and Animal Feedingstuffs — Protocol for the Validation of Alternative Methods*. ISO 16140.
3. Анон. (2004): *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count method*. ISO 21528-2.
4. Анон. (2006): *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*. ISO/TS 19036.
5. Augustin J. C., Carlier V. (2006): *Lessons from the organization 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 Microbiol 23: 1–38.
6. Corry J. E. L., Jarvis B., Passmore S. M., Hedges A. J. (2007): *A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms*. Food Microbiol 24: 230–253.
7. Donnenberg M. S. (2010): *Enterobacteriaceae [Chapter 218]*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier 2815–34.
8. Jarvis B., Corry J. E., Hedges A. J. (2007a): *Estimates of measurement uncertainty from proficiency testing schemes, internal laboratory quality*

- monitoring and during routine enforcement examination of foods. J Appl Microbiol* 103: 462–7.
9. Jarvis B., Hedges A. J., Corry J. E. (2007b): *Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. Int J Food Microbiol* 116: 44–51.
10. Peterson D. L. (2006): *Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. Am J Med* 119 (6Suppl1): S20-8; discussion S62–70.

