**Prilog 2. VERIFIKACIJA MIKROBIOLOŠKIH METODA S IZVEDBENIM KARAKTERISTIKAMA**

1. **CERTIFICIRANI REFERENTNI SOJEVI I IZVEDBENI KRITERIJI VERIFIKACIJE**
   1. **Certificirani referentni sojevi i referentni sojevi**

Referentni sojevi su mikroorganizmi koji se koriste za ispitivanje unutar pojedine metode odnosno postupka ispitivanja. Referentne sojeve je važno održati stabilnima stoga je od iznimne važnosti odrediti uvjete za skladištenje tih mikroorganizama. Soj se kultivira i sprema u duboko zamrzavanje (24 satna kultura u TSB s 20% glicerolom) ili koristeći epruvete (Cryovial) koje sadrže perle čija porozna priroda omogućava prianjanje bakterija na površinu perla.. Iz dubokog zamrzavanja pripremaju se radne kulture. Kada se koriste certificirani referentni sojevi s poznatim brojem mikroorganizama potrebno ih je čuvati prema uputi proizvođača i svaki puta koristiti novu epruvetu s mikroorganizmima.

Referentni sojevi se koriste za:

- Validaciju/verifikaciju metoda

- Ispitivanje kvalitete mikrobioloških podloga

- Kalibriranje opreme

- Praćenje rada laboratorija

- Provjeru metoda

Preporuča se nabavljati referentne sojeve od proizvođača koji su akreditirani prema

ISO 17034.

Za svaki testni organizam potrebno je evidentirati sljedeće informacije:

- Naziv kolekcije kultura iz kojih su izdvojeni organizmi

- Naziv, referentni broj i rok trajanja

- Datum primitka

- Datum subkultivacije mikroorganizama

- Broj epruveta (cryobank epruveta) podrijetlom iz serije

* 1. **Izvještaj o verifikaciji mikrobiološke metode**

Izvještaj o verifikaciji mikrobioloških metoda bi trebao sadržavati općenite informacije (mjerni postupak, metoda i mjerna veličina), svrhu tj. matriks na koji je verifikacija primjenjiva, te izvedbene kriterije analitičke metode. U izvedbenim kriterijima analitičkih metoda je potrebno navesti svrhu uporabe rezultata, parametre verifikacije koji su određivani s granicama (ukoliko ih ima), te izjavu da verifikacija odgovara namjeni.

**Primjer dostupan u Prilogu 2a. Predložak za verifikaciju mikrobiološke metode**

**Napomena: Vrijednosti prikazane u Excel dokumentu nisu rezultat stvarnih mjerenja nego samo prikaz za bolje razumijevanje izvedbenih karakteristika verifikacije metode.**

**Primjer izgleda tablice s definiranim kriterijima prihvatljivosti i zaključna tablica s rezultatima verifikacije kojom se dokazuje da metoda odgovara svrsi nalaze se u Excel dokumentu.**

1. **PARAMETRI VERIFIKACIJE MIKROBIOLOŠKIH METODA**
   1. **Ponovljivost**

Ponovljivost mikrobioloških metoda se određuje tako da se radi 10 ponavljanja istog uzorka u istim uvjetima (isti analitičar, isti dan, isto vrijeme i inkubacija u istom inkubatoru). Poželjno je da svako ponavljanje sadrži 20 – 80 ciljanih mikroorganizama.

Minimalno se radi 3 seta ponavljanja (3 uzorka po analitičaru), koristeći različite izvore ciljanih mikroorganizama. Za određivanje ponovljivosti se mogu koristiti prirodno kontaminirani uzorci s ciljanim mikroorganizmima (npr. sirova voda) ili uzorci s dodanim ciljanim mikroorganizmima (npr. obrađena voda s dodanim certificiranim referentnim sojem).

Za dobivene vrijednosti ciljanih mikroorganizama setova ponavljanja određujemo prekomjernu disperziju koristeći indeks disperzije po Poissonu.

Poissonov indeks disperzije se računa prema formuli:



**x2n-1**-prekomjerna disperzija koristeći indeks disperzije po Poissonu

Dobivenu vrijednost disperzije uspoređujemo sa teoretskim limitom χ2(hi-kvadrat) –testa. S obzirom da se radi o 10 ponavljanja, teoretski limit s 0,05 vjerojatnosti za 9 stupnjeva slobode iznosi 16,92.

Ukoliko je dobivena vrijednost disperzije veća od teoretskog limita χ2 testa, tada varijabilnost između paralelnih brojanja nije usklađena sa Poissonovom distribucijom, te se očitane vrijednosti ne mogu koristit za daljnje računanje ponovljivosti. U navedenom slučaju je potrebno ponoviti cijeli postupak određivanja ponovljivosti.

Ukoliko je dobivena vrijednost disperzije manja od teoretskog limita χ2 testa, tada je varijabilnost između paralelnih brojanja usklađena sa Poissonovom distribucijom, te se očitane vrijednosti mogu koristit za daljnje računanje ponovljivosti.

Iz dobivenih vrijednosti ciljanih mikroorganizama izračunamo relativnu operacijsku varijancu (**u02**) svakog seta ponavljanja prema formuli:

**u02**-relativna operacijska varijanca =(**varijanca-srednja vrijednost)/(srednja vrijednost)2**

Korijen prosjeka relativnih operacijskih varijanca je relativna standardna devijacija ponovljivosti (**urel**), te se izražava u postotcima.

**urel** -relativna standardna devijacija ponovljivosti = **√u02** (%)

Relativna standardna devijacija ponovljivosti (**urel**) odgovara izvedbi ispitivane metode na ispitivanom materijalu u ponovljivim uvjetima, te nema zadane granice.

**Primjer dostupan u Prilogu 2a. Predložak za verifikaciju mikrobiološke metode**

* 1. **Nesigurnost brojenja**

Nesigurnost brojenja se određuje ponovljenim brojanjem kolonija istih ploča ili ponovljenim brojanjem jažica testa MPN metode kroz kratko vrijeme (maksimalno 1 sat). Za nesigurnost brojenja se mogu koristiti ploče ili testovi koji su korišteni za određivanje ponovljivosti.

**1.2.1. Individualna nesigurnost brojenja**

Individualna nesigurnost brojenja se određuje na način da isti analitičar 2 puta očitava broj kolonija istih ploča ili jažica testa MPN metode, unutar 1 sata (minimalno 10 ploča ili testova).

Iz razlika očitavanja se izračuna relativna varijanca brojenja (**u2rel,L**) prema sljedećim formulama:

**u2rel,L =2\*(1očitanje-2 očitanje/1očitanje +2 očitanje)2**

za brojenje kolonija istih ploča ili:

**u2rel,L= (SD/**x̄**)2**

za brojenje jažica istih testova MPN metode gdje je:

SD - standardna devijacija očitavanja

x̄- srednja vrijednost očitavanja

Individualna relativna standardna nesigurnost ponovljivosti brojenja se izračunava iz relativne varijance brojenja (**u2rel,L**) prema sljedećoj formuli:

**Individualna relativna standardna nesigurnost ponovljivosti brojanja= √(prosjek u2rel,L)\*100**

Izražava se u postotcima.

**1.2.2. Laboratorijska nesigurnost brojenja**

Laboratorijska nesigurnost brojenja se određuje na način da različiti analitičari očitavaju broj kolonija istih ploča (minimalno 15 ploča) ili jažica testa MPN metode (minimalno 20 testova).

Iz razlike očitavanja se izračunava relativna varijanca brojenja (**u2rel,L**) prema sljedećoj formuli:

**u2rel,L =(SD/**x̄**)2**

gdje je:

SD - standardna devijacija očitavanja

x̄- srednja vrijednost očitavanja

Laboratorijska nesigurnost brojenja se izračunava iz relativne varijance brojenja (**u2rel,L**) prema sljedećoj formuli:

**Prosječna relativna laboratorijska nesigurnost brojanja kolektiva (laboratorijska nesigurnost brojenja)= √(prosjek u2rel,L)\*100**

Izražava se u postotcima.

Individualna nesigurnost brojanja bi trebala biti <3%, a laboratorijska nesigurnost brojanja <5%.

**Primjer dostupan u** **Prilogu 2a. Predložak za verifikaciju mikrobiološke metode**

**Napomena: U Predlošku za verifikaciju mikrobiološke metode.xlsx dan je primjer izračuna nesigurnosti brojenja metodom brojanja kolonija i nesigurnosti brojenja MPN metoda.**