T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

MİKROBİYOLOJİK ANALİZLERDE METOT DOĞRULAMA ve ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ REHBERİ

Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

2022

ÖNSÖZ

Gıdanın üretim, depolama, dağıtım, satış gibi tüm aşamalarında gıda güvenliğinin kontrol edilebilmesi ve mevzuata uygunluğunun doğrulanması için laboratuvar analizleri önemli bir yere sahip olup, muayene ve analiz raporları sonuçlarına göre idari ve adli işlemler gerçekleştirilebilmektedir.

Gıda kontrol laboratuvarlarında uluslararası kabul edilmiş standart metotlar, laboratuvar tarafından verifikasyon (doğrulama) çalışması yapılarak uygulanmaktadır. Standart metot olmadığında ise ilgili metodun uluslararası bir protokole göre validasyon (geçerli kılma) çalışmaları yapılmaktadır. Laboratuvarlarda kullanılan ve sürekli revize edilen ulusal ve uluslararası standartların (TSE, ISO, AOAC,...vb.) güncelliğinin, metodu kullanan laboratuvar tarafından takip edilmesi gerekmektedir.

Analiz sonuçlarının güvenilirliğinin sağlanması için metotların validasyonu / verifikasyonu büyük önem arz etmektedir. Bu kapsamda laboratuvarlarımızda mikrobiyolojik analizlerle ilgili metot birliğinin sağlanması ve mikrobiyolojik analizlerde uygulanacak verifikasyon parametrelerinin belirlenmesi amacı ile Bakanlığımıza bağlı Gıda Kontrol Laboratuvarlarından ve Bakanlığımız tarafından yetkilendirilen Özel Gıda Kontrol Laboratuvarlarından konu uzmanlarının katılımıyla toplantı düzenlenmiş ve uzmanlarımızın özverili çalışmaları neticesinde "Mikrobiyolojik Analizlerde Metot Doğrulama ve Ölçüm Belirsizliği Rehberi" oluşturulmuştur. Mikrobiyolojik analizleri yapan Kamu ve Özel Gıda Kontrol Laboratuvarlarının çalışmalarında söz konusu Rehber'de yer verilen kriterlere uyulması uygulama birliği sağlayacaktır. Uzmanların katılımıyla belirli zamanlarda tekrar toplantılar yapılacak ve gerekli durumlarda revize edilecek Rehber tekrar yayımlanacaktır.

Rehberin mikrobiyolojik analizlerin güvenilirliğine, onay ve denetim süreçleri ile uygulama birliğine büyük katkı sağlayacağını düşünüyorum. "Mikrobiyolojik Analizlerde Metot Doğrulama ve Ölçüm Belirsizliği Rehberi"nin hazırlanmasında yoğun çaba sarf eden konu uzmanlarına, Genel Müdürlüğümüz personeline ve bu konuda emeği geçenlere teşekkür eder, hayırlı olmasını dilerim.

Dr. Durali KOÇAK

Gıda ve Kontrol Genel Müdürü

YÖNETİM KOMİTESİ

Dr. Durali KOÇAK	Genel Müdür
Selman AYAZ	Genel Müdür Yardımcısı
Erol BULUT	Gıda Kontrol ve Laboratuvarlar Daire Başkanı
Tevfik Boğaçhan ALTUNKAYNAK	GTH Uzmanı

GÖREV ALANLAR VE KATKIDA BULUNANLAR (*)

Anıl Burak AKAR
Ömer Hamza AKKAYA
Dr. Mihriban AKSOY
Ayşegül AKTÜRE
Gönül AKYILDIZ
GTH Uzm. Tevfik Boğaçhan ALTUNKAYNAK
Özlem ASLAN
Sebile AYDIN
Seden Arzu BİRİNCİ
Linda ÇAĞLI
Dr. Burcu ÇAKMAK SANCAR
Dr. Hilal Duygu ÇALIM
Ali Bahadır ÇELİK
Metin ÇİFTÇİ
Erdem DANYER
İsmihan DEMİRAY
Murat DOĞAN
Meriç Pelin GÖKALP
Mehmet Ali GÜL
Bülent GÜNEŞ
Hülya IŞIK
Dr. Sibel KIZIL
Dr. Sümeyye KABAKCI
İmran KAYA
Emine MERAL
Kader ÖZBAŞ
Dr. Aslı ÖZDEM TÜRKOĞLU
Ali ÖZDEMİR
Serdar SERDAROĞLU
Halise SERİN
Hülya SÖKMEN
Demre SÖNMEZ
Prof. Dr. Emrah TORLAK
Dr. Emine Nazan UZUNBOY
Dr. Arzu ÜRŞEN AŞYEMEZ
Dr. Betül VAZGEÇER
Osman YAHYAOĞLU
Cumra YILDIRIM
Dr. Gülay YILDIRIM
Metin YILDIRIM
Prof. Dr. Aysun YILMAZ
Ramazan YILMAZ
Dr. Nuray Gamze YÖRÜK

**** Soyadına göre alfabetik dizin***

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **i**

ÇİZELGELER ..... **vi**

ŞEKİLLER ..... **viii**

MİKROBİYOLOJİK ANALİZLERDE METOT DOĞRULAMA VE ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ **1**

1. AMAÇ ve KAPSAM **1**

2. TANIMLAR ve KISALTMALAR **1**

3. GİRİŞ **3**

4. KALİTATİF VE KANTİTATİF METOTLARIN VERİFİKASYONU İÇİN GENEL PRENSİPLER **4**

4.1. Verifikasyon Çalışmaları için Performans Göstergeleri **4**

4.2. Alternatif Metotların Verifikasyon Çalışması **6**

4.3. Verifikasyon Çalışmaları için Matrikslerin Seçimi ve Sayısı **6**

5. KALİTATİF METOTLAR **8**

5.1. Tahmini Tespit Seviyesi-eLOD$_{50}$ **8**

5.2. Seçilen Protokole Göre eLOD50'nin Tespiti **11**

5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi **12**

5.4. Örnek Çalışma "ISO 6579-1'e göre *Salmonella* Spp. Tespiti için, Gıda Kapsamında, Protokol 1 Doğrultusunda Yapılacak Olan Verifikasyon Çalışması" **15**

5.4.1. Çalışma Kültürünün Hazırlanması **15**

6. KANTİTATİF METOTLAR **18**

6.1. Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapmasının (S_{IR}) Belirlenmesi 18

6.1.1. Protokolün Uygulanması 19

6.1.2. Sonuçların Değerlendirilmesi 21

6.1.3. Kabul Edilebilirlik Limitleri 21

6.1.4. Örnek Çalışma 22

6.2. Tahmini Sapma (eBias) Belirlenmesi 24
6.2.1. Protokolün Uygulanması 24
6.2.2. Örnek e-BİAS Çalışması 27
6.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi 35
6.2.4. Kabul Edilebilirlik Seviyeleri 35
7. EMS (EN MUHTEMEL SAYI) METOTLARI VE DEĞERLENDİRME 37
7.1. Kalitatif EMS Metotları 38
7.2. Kantitatif EMS Metotları 38
8. YÜZEY KONTROL/SWAB ANALİZLERİ 42
9. MİKROSKOBİK ANALİZLER 43
9.1. Mikroskobik Sayım Analizleri 43
9.2. Mikroskobik Saha (Alan) Analizleri 44
10. ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ 44
10.1. Teknik Belirsizlik - Laboratuvar İçi Deneylerden Elde Edilen Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması "S_{IR}" İle Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması 45
10.2. Matriks Belirsizliği 51
10.3. Dağılım (Poisson) Belirsizliği 52
10.3.1. Koloni Sayımı Tekniği - Poisson Belirsizliği 52
10.3.2. Koloni Sayım Tekniği- Doğrulama Belirsizliği 53
10.4. En Muhtemel Sayı (EMS) için Belirsizlik (Most Probable Number - MPN) 53
10.5. Raporlarda Ölçüm Belirsizliğinin Belirtilmesi 54
11. VALİDE EDİLMİŞ ALTERNATİF DOĞRULAMA VE TİPLENDİRME METOTLARI, VERİFİKASYONU İÇİN TEKNİK PROTOKOL 55
11.1. Uygulama Verifikasyon Çalışması (Implementation Verification) 56
11.2. Deney Dizaynı 56
11.2.1. Suş sayısı 56
11.2.2. Suş Seçimi 56
11.3. Sonuçların Değerlendirilmesi 57

11.4. Kabul Edilebilirlik Limiti 57
11.5. Alternatif Doğrulama Metodu Verifikasyonu İçin Örnek Çalışma 1 58
11.6. Alternatif Tiplendirme Metodu Verifikasyonu İçin Örnek Çalışma 2 59
12. PERSONEL YETKİLENDİRİLMESİ 60
12.1. Personel Yetkilendirmesi İçin Yapılması Gerekenler 60
12.2. Personelin Yetkinlik Kontrolü 60
13. KALİTE KONTROL 61
13.1. İç Kalite Kontrol 61
13.1.1.Genel Kalite Kontrol 61
13.1.2. Kantitatif Analizler için Kalite Kontrolü 62
13.1.2.1. R kart uygulaması 62
13.1.2.2. Okuma belirsizliği 65
13.1.3. Kalitatif Analizlerde Kalite Kontrolü 66
13.1.4. EMS Kullanılan Analizlerde Kalite Kontrolü 66
13.2. Dış Kalite Kontrol 66
13.3. Uygunsuzluk Durumları 67
14. FARKLI DURUMLARDA YAPILACAK İŞLEMLER İÇİN ÖNERİLER 67
14.1.Yeni Cihaz 67
14.2. Yeni Ortam (Alan Değişikliği) 67
14.3. Yeni Kit 68
15. REFERANSLAR 68

ÇİZELGELER

Çizelge 1. Valide Edilmiş Kalitatif ve Kantitatif metotların Verifikasyon Çalışması İçin Gerekli Performans Karekteristikleri 5
Çizelge 2. Valide Edilmemiş Referans Kalitatif ve Kantitatif metotların Verifikasyon Çalışması İçin Gerekli Performans Karekteristikleri 5
Çizelge 3. Verifikasyon Çalışmaları İçin Gerekli Olan, En Az Matriks ve Çalışma Sayısının Özeti 7
Çizelge 4. Protokollere Göre, eLOD50Tespiti İçin İnokülasyon Seviyesi Başına Gerekli Tekrarlı Çalışma Sayıları..... 9
Çizelge 5. Protokol Başına İnokülasyon Seviyeleri..... 10
Çizelge 6. Protokol 1'i Kullanarak, Kontaminasyon Düzeylerinin Pozitif Sonuç Sayısına Göre, eLOD50 nin Belirlenmesi 13
Çizelge 7. Protokol 2'yi Kullanarak Kontaminasyon Düzeylerinin Pozitif Sonuç Sayısına Göre, ... 14
Çizelge 8. Hazırlanan Dilüsyonlar ve Elde Edilen Sonuçlar 15
Çizelge 9. Gerekli Minimum Dilüsyon Sayısından Fazlasını Kullanan Protokol 1, 2 ve 3 için Dilüsyonlar ve Karşılık Gelen Tekrar Sayısı 16
Çizelge 10. Test Porsiyonlarının Çalışma Sonuçları 16
Çizelge 11. Protokol 1'e Göre Çiğ Kanatlı Eti İçin Test Porsiyonlarının Çalışma Sonuçları (Food/ItemVerification) 17
Çizelge 12. Temsili Analiz Sonuçları 22
Çizelge 13. Laboratuvariçi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapmasının (SIR) Hesaplanması..... 23
Çizelge 14. ISO 21528-2'nin Validasyon Çalışmasında Elde Edilen (SIR) Verilerin Özeti..... 23
Çizelge 15. Örnek Test Sonuçları 36
Çizelge 16. Valide Edilmiş Kalitatif ve Kantitatif EMS Metotlarının Verifikasyon Çalışması İçin Gerekli Performans Karekteristikleri 37
Çizelge 17. Valide Edilmemiş, Kalitatif ve Kantitatif EMS metotların Verifikasyon Çalışması İçin Gerekli Performans Karekteristikleri 37
Çizelge 18. Kantitatif EMS Metodu Uygulama Verifikasyonu / Tekrarüretilebilirlik Çalışması .. 40
Çizelge 19. Kantitatif EMS Metodu Matriks Verifikasyonu / E-Bias Çalışması 41
Çizelge 20. Örnek Test Sonuçları Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapmasının Hesaplanması..... 48
Çizelge 21. Örnek Test Sonuçları Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapmasının

Hesaplanması 49
Çizelge 22. Valide Edilmiş Alternatif Doğrulama ya da Tiplendirme Metotlarının, İmplementation Verification (Uygulama Verifikasyon Çalışması) İçin, Test Edilecek Suş Sayıları 56
Çizelge 23. Uygulama Verifikasyon Çalışması (Implementation Verification) Yapılan, Valide Edilmiş Alternatif Doğrulama Veya Tiplendirme Metoduna Ait Sonuç Değerlendirme Tablosu 57
Çizelge 24. Uygulama Verifikasyon Çalışması (Implementation Verification) Yapılan, Valide Edilmiş Alternatif Doğrulama veya Tiplendirme Metoduna Ait Sonuç Değerlendirme Tablosu 58
Çizelge 25. Uygulama Verifikasyon Çalışması (Implementation Verification) Yapılan, Valide Edilmiş Alternatif Tiplendirme Metoduna Ait Sonuç Değerlendirme Tablosu 59
Çizelge 26. R Kart hazırlanması 62
Çizelge 27. Örnek R kart R,WL ve CL değerlerinin hazırlanması 64
Çizelge 28. Çizelge 27' ye göre yapılan örnek çalışma 65
Çizelge 29. Örnek Okuma belirsizliği 66

ŞEKİLLER

Şekil 1. Laboratuvariçi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapmasının Belirlenmesi İçin Örneklerin Hazırlanması (*ISO 16140-3, Ek D) **20**

Şekil 2. Kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) için, bir matriksin yapay kirletilmesinde kullanılacak olan aşı süspansiyonunun seviyesinin ön belirlenmesi (ISO 16140-3, Ek:D) **25**

Şekil 3. Kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) için, bir matrikse ait test porsiyonlarının aşılanması (ISO 16140-3, Ek:D) **25**

Şekil 4. Bir matriks için, yapay kirletme kullanılarak yapılan kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) (*ISO 16140-3, Ek:D) **26**

Şekil 5. Bulaştırma Yapılacak Mikroorganizmanın, Ana Stoğunun Yükünün Belirlenmesi (1. Gün) **28**

Şekil 6. Bulaştırma Yapılacak Mikroorganizmanın, Ana Stoğunun Yükünün Belirlendikten Sonra ISO 16140-3 Doğrultusunda e-BİAS çalışması için "Yüksek (10^5), Orta(10^3) ve Düşük(10^1)" Bakteri Sayısına Sahip Dilüsyonlarından Ekim Yapılması (Matriks Olmadan) (2. Gün) **30**

Şekil 7. "Yüksek (10^5), Orta (10^3) ve Düşük (10^1)" olacağı varsayılarak İlgili Dilüsyonlardan, Mikroorganizmaların İlgili Matrikse Bulaştırılması (2.Gün) **32**

Şekil 8. Yüksek (10^5), Orta (10^3) ve Düşük (10^1)" olacağı varsayılarak İlgili Dilüsyonlardan, Mikroorganizmaların İlgili Matrikse Spayklanması (2.Gün) **34**

MİKROBİYOLOJİK ANALİZLERDE METOT DOĞRULAMA ve ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ REHBERİ' NE BAĞLI EKLER

Ek1- Mikrobiyoloji Laboratuvarında Uyulması Gereken Genel Kurallar Klavuzu

Ek2-Besiyeri Hazırlama Klavuzu

Ek3- Numune Hazırlama Klavuzu

Ek4- Referans Kültürden Stok Kültür ve Çalışma Kültürü Hazırlama Klavuzu

Ek5- Mikroorganizma ile Numunelerin Aşılanması Klavuzu

Ek6- Genel Doğrulama Testleri ve Boyama Yöntemlerinin Uygulanması Klavuzu

MİKROBİYOLOJİK ANALİZLERDE METOT DOĞRULAMA VE ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ

1. AMAÇ ve KAPSAM

Bu dokümanın amacı; Mikrobiyolojik analiz metotlarını kullanan laboratuvarın yeterliliğinin teyit edilmesine yönelik yapılacak çalışmalar için bir yöntem belirlenmesi, elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve bu verilerle ölçüm belirsizliği hesaplanarak raporlanması aşamalarında ortak sistematiğin tanımlanmasıdır. Bu şekilde sürekli iyileşmenin sağlanması amaçlanır. Dokümanda belirtilen parametreler, doğrulama / geçerli kılma için gerekli olan en az çalışmaları içermektedir.

Bu doküman kalitatif ve kantitatif mikrobiyolojik analiz metotlarının geçerli kılınması ve doğrulanması için yapılan çalışmaları ve hesaplamaları kapsamaktadır.

2. TANIMLAR ve KISALTMALAR

Standart Metot: Ulusal veya uluslararası kabul görmüş standart metotlardır (AOAC, ISO, TS vb).

Laboratuvar Tarafından Geliştirilmiş Metot (İşletme İçi Metot / Inhouse metot): Laboratuvarın mikrobiyolojik **analizler** için deneyim ve bilgisiyle standart dışı geliştirdiği metotlardır.

Geçerli Kılma (Validasyon): Uluslararası kabul görmüş standartlara göre bir metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunu ve performansını yazılı olarak ortaya koymak için yapılan test ve ölçme işlemleridir.

Doğrulama (Verifikasyon): Geçerli kılınmış bir metodun kullanıma alınmadan önce metodu kullanacak laboratuvarın kendi şartlarında çalışabilirliğinin uygun performans kriterleri ile ıspat edilmesi işlemidir.

Uygulama Verifikasyonu – (Implementation Verification): Laboratuvarın analizi yapabilme yeteneğini gösteren verifikasyon (doğrulama) çalışmasıdır. Laboratuvar metodun kapsamındanki herhangi bir örneği test eder. Çıkan sonuç metodun validasyon sonucu ile karşılaştırılır.

Matriks (Gıda örneği) Verifikasyonu – (Food Item Verification): Laboratuvarın analiz kapsamında çalışacağını beyan ettiği örneklerle yaptığı doğrulama çalışmasıdır. Ancak metot kapsamındaki tüm (gıda) öğeleri doğrulama çalışmasına dahil edilemediğinden, kullanıcı laboratuvar, metodun validasyon kapsamı ve laboratuvarın uygulama kapsamı

içinde yer alan gıda kategorilerinin her birinden (ISO 16140-3, Ek A, Tablo A1), bir adet zorlayıcı matriks seçer.

Kesinlik: İlgili standartların belirli koşullar altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki anlaşma derecesidir. Normalde belirtilen koşullar tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirliktir.

Ara Kesinlik: Laboratuvar içi tekrarüretilebilirliktir.

Tekrarlanabilirlik: Aynı ölçüm şartları altında, aynı analit üzerine gerçekleştirilen ardışık test sonuçları arasındaki yakınlık derecesidir.

Tekrarüretilebilirlik: Farklı ölçüm şartları altında, aynı analit üzerine gerçekleştirilen ardışık test sonuçları arasındaki yakınlık derecesidir.

Dahili seçicilik: Metodun hedef mikroorganizmayı tespit edebilmesi.

Dahililik Çalışması (İnclusivity) (dahili): alternatif yöntemle tespit edilecek veya numaralandırılacak hedef mikroorganizmayı tespit eden çalışma.

Harici seçicilik: Hedef olmayan mikroganizmaların tespit etmemesidir

Haricilik Çalışması (Exclusivity): Potansiyel olarak çapraz reaktif olabilen ancak alternatif yöntemle saptanması veya numaralandırılması beklenmeyen hedef olmayan mikroorganizmayı tespit eden çalışma.

LOD_{50}: Bir ölçüm prosedürü ile %50 olasılıkla tespit edilebilen en düşük mikroorganizma seviyesidir. Tekrarların %50 sinin pozitif veya negatif olduğu seviyedir.

$eLOD_{50}$ (tahmini LOD_{50}): Doğrulama çalışmalarında test edilen örnek sayısı az olduğu için LOD50'nin doğru bir şekilde belirlenmesi mümkün olmadığından "tahmini LOD50" ("eLOD50") terimi kullanılmaktadır.

Selectivity - Seçicilik: Numunedeki hedef koloni sayısının toplam koloni sayısına oranıdır.

Sensitivity - Hassasiyet: Metodun hedef mikroorganizmaları tespit etme yeteneğidir.

Specificity-Spesifiklik: Analitik bir metodun, hedef organizmaları hedef olmayan organizmalardan ayırma yeteneğidir.

Gerçeklik (Trueness): Gerçeklik, geniş bir sonuç serisinden elde edilen ortalama değer ile kabul edilen bir referans değer arasındaki yakınlık (referans bir nicel değer ile n sayıda tekrarla ölçülerek bulunan ortalama nicel değer arasındaki yakınlık derecesi)

Referans Malzeme (CRM): Geçerli bir kültür koleksiyonundan elde edilen, cins, tür ve bilinen miktarda içerik düzeyi, belirsizliği, izlenebilirliği ve uygulama prosedürleri belirli sertifikalı mikroorganizma.

Referans kültür (Suş): Geçerli bir kültür koleksiyonundan elde edilen, cins ve tür düzeyi belirli mikroorganizma.

Örnek: Laboratuvarda hazırlanan ve analiz yönteminde belirtilen ve test bölümlerinin alındığı prosedüre göre hazırlanan numune

Matriks: Gıda laboratuvarlarında analize alınabilecek gıda,yem,su,swab vb. maddeler.

Zorlayıcı Matriks - Challenging food or matrix: Laboratuvarın analiz kapsamında çalışacağını beyan ettiği örneklerle yaptığı matriks verifikasyonu – (Food Item Verification) çalışmasında, metot kapsamındaki gıda öğelerinin tamamı, matriks verifikasyonu çalışmasına dahil edilemediğinden, kullanıcı laboratuvar, metodun validasyon kapsamı ve laboratuvarın uygulama kapsamı içinde yer alan gıda kategorilerinin her birinden (ISO 16140-3 Ek A, Tablo A1, Ek B), bir adet zorlayıcı matriks seçmelidir. Matrikse özgü, pH, su aktivitesi, yağ içeriği, yüksek arka plan mikrobiyatası vb. karekteristik özellikler matriksin zorlayıcılık seviyesini belirleyen ve analize etkisi olan bileşenlerdir (ISO 16140-3 Ek B).

Kategori: Aynı orijinli (yiyecek) tip grubu. Örnek; Yiyecek kategorisi: ısıl işlem görmüş süt ve süt ürünleri; gıda türü: pastörize süt ürünleri; gıda maddesi: krem şanti.

3. GİRİŞ

Mikrobiyoloji laboratuvarında geçerli kılma ve doğrulama çalışmalarına başlanmadan önce;

- ✓ **Ek1** Mikrobiyoloji Laboratuvarı Genel Kurallar
- ✓ **Ek2** Besiyeri Hazırlama
- ✓ **Ek3** Numune Hazırlama
- ✓ **Ek4** Referans Kültürden Stok Kültür ve Çalışma Kültürü Hazırlama
- ✓ **Ek5** Mikroorganizma ile Numunelerin Aşılanması
- ✓ **Ek6** Genel Doğrulama Testleri ve Boyama Yöntemlerinin Uygulanması

Klavuzlarında anlatılan hususların yerine getirilmesi gereklidir.

Metot geçerli kılma parametrelerinin belirlenebilmesi için öncelikle analiz metodunun ve metot kapsamının belirlenmesi gerekmektedir.

Mikrobiyolojik analizler analiz sonucuna göre kalitatif (nitel/var-yok) ve kantitatif (nicel/sayılabilir) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Kalitatif ve Kantitatif metotlarda verifikasyon çalışmaları, ISO 16140-3, Ölçüm belirsizliği çalışmaları ise ISO 19036 doğrultusunda anlatılmıştır.

Kalitatif ve Kantitatif metotlarda verifikasyon çalışmaları için kullanılacak bakteri kültürünün hazırlanma yöntemleri **Ek-4** Referans Kültürden Stok Kültür ve Çalışma Kültürü Hazırlama Klavuzu ve **Ek-5** Mikroorganizma ile Numunelerin Aşılanması Klavuzu ile tanımlanmıştır.

4. KALİTATİF VE KANTİTATİF METOTLARIN VERİFİKASYONU İÇİN GENEL PRENSİPLER

Kalitatif ve kantitatif metotların verifikasyon çalışma şartları, söz konusu metotların valide edilip edilmediğine göre değişkenlik göstermektedir.

- ✓ **Eğer valide edilmiş kalitatif ve kantitatif metotların verifikasyonu yapılacak ise;** çalışma, iki aşamada yapılır. Laboratuvar önce, geçerli kılınmış metodu uygulama yeteneğini gösteren **uygulama verifikasyonu**'nu (Implementation Verification) daha sonra **matriks (örnek) verifikasyonu**'nu (Food-item Verification) yapmalıdır.

Eğer valide edilmemiş referans kalitatif ve kantitatif metotların verifikasyonu yapılacaksa ise; uygulama verifikasyonu (Implementation Verification) için metot validasyon verisi bulunmadığından dolayı, çalışma **sadece matriks verifikasyonu** yapılarak gerçekleştirilir (ISO 16140-3 Ek F).

4.1. Verifikasyon Çalışmaları için Performans Göstergeleri

"Valide edilmiş" ve "valide edilmemiş referans" kalitatif ve kantitatif metotların verifikasyon çalışması için, gerekli olan verifikasyon çalışma göstergeleri (performans karekteristikleri), sırasıyla **Çizelge 1** ve **Çizelge 2**'de gösterilmiştir. Buna göre, Kalitatif Metotlar için "Tahmini LOD_{50} ($eLOD_{50}$)", Kantitatif Metotlar için ise "Laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması (S_{IR})" ve "Tahmini Sapma (eBİAS)" performans kriterleri belirlenmiştir. Uygulama ve matriks verifikasyon çalışmaları, bu kriterlere göre Çizelge 1 ve 2 doğrultusunda yapılır.

Çizelge 1. Valide Edilmiş Kalitatif ve Kantitatif metotların Verifikasyon Çalışması İçin Gerekli Performans Karekteristikleri

METOT	PERFORMANS KRİTERLERİ	UYGULAMA VERİFİKASYONU (IMPLEMENTATION VERIFICATION)	MATRİKS VERİFİKASYONU ("FOOD" ITEM VERIFICATION)
Kalitatif Metotlar	Tahmini LOD50 ($eLOD_{50}$)	✓	✓
Kantitatif Metotlar	Laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması (S_{IR})	✓	Uygulanamaz
	Tahmini Sapma (eBİAS)	Uygulanamaz	✓

ISO 16140-3 / Tablo 2.

Çizelge 2. Valide Edilmemiş Referans Kalitatif ve Kantitatif metotların Verifikasyon Çalışması İçin Gerekli Performans Karekteristikleri

METOT	PERFORMANS KRİTERLERİ	UYGULAMA VERİFİKASYONU (IMPLEMENTATION VERIFICATION)	MATRİKS VERİFİKASYONU ("FOOD" ITEM VERIFICATION)
Kalitatif Metotlar	Tahmini LOD50 ($eLOD_{50}$)	Uygulanamaz	✓
Kantitatif Metotlar	Laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması (S_{IR})	**Uygulanamaz	Uygulanamaz
	Tahmini Sapma (eBİAS)	Uygulanamaz	✓

*****ISO 16140-3 / Ek F, Tablo F.2.

******ISO 16140-3'de, valide edilmemiş (S_{IR} değeri olmayan) kantitatif metotlar için, "uygulama verifikasyonu yapılamaz" ifadesi doğrultusunda, bir performans kriteri tanımlanmamış olsa da, ilgili referans metot, aynı zamanda analizin güvenilirliği açısından ölçüm belirsizliğini hesaplayabilmek adına S_{IR} çalışılabileceğini, bunun için de "kabul edilebilirlik kriterlerinin" başka bir resmi dökümandan alınabileceğini beyan etmiştir. Bu doğrultuda **"NMKL 32"** dökümanına göre "Eğer ortaklaşa çalışmadan bir değer elde edilmemişse (metodun validasyon verileri yoksa), laboratuvariçi tekrar üretilebilirlik (S_{IR}) standart sapması genel kural olarak **0,4 log10 kob/g** değerini geçmemelidir." ifadesi doğrultusunda S_{IR} çalışmaları yapılabilir.

4.2. Alternatif Metotların Verifikasyon Çalışması

Alternatif Metotlar (3M petri film, Tempo, Vidas.,vb) laboratuvarda çalışılmadan önce, söz konusu metodun uluslararası geçerliliği olan bir kurumdan (AOAC, AFNOR vs..) onaylı olup olmadığı ve ISO 16140-2 doğrultusunda metodun validasyon çalışmalarının yapılıp yapılmadığı kontrol edilir. Metot bu şartları taşıyor ise, söz konusu metot laboratuvarda kullanılabilir. İlgili analiz yöntemine göre (Kalitatif, Kantitatif) verifikasyonları yapılır. Analizlerde eğer alternatif bir doğrulama yöntemi kullanıldı ise verifikasyon çalışmaları (Dahililik ve Haricilik) ISO 16140-3 doğrultusunda gerçekleştirilir.

4.3. Verifikasyon Çalışmaları için Matrikslerin Seçimi ve Sayısı

"Uygulama verifikasyonu çalışması, **Kalitatif metotlarda;** metodun geçerli kılma çalışması sırasında kullanılan ve tercihen laboratuvarın uygulama kapsamında olan bir örnek çeşidi ile yürütülmelidir. Metot geçerli kılma çalışmalarında kullanılan örnekler laboratuvarın uygulama kapsamında yer almıyorsa da, $eLOD_{50}$ değeri değişebileceği için laboratuvar bu örneklerden birini sağlamalı ve onunla verifikasyon çalışmasını yürütmelidir. Örnek yapısı, büyüklüğü metodun verifikasyon çalışması sırasında kullanılan örnek yapısına benzer olmalıdır. **Kantitatif metotlarda ise;** böyle bir zorunluluk olmayıp, metodun validasyon kapsamı içerisinde yer alan herhangi bir gıda matriksi seçilebilir.

Matriks verifikasyonu için seçilecek matriksler, **ISO 16140-3**, **Ek A** da bulunan **Tablo A1** de yer alan gıda kategorilerinden seçilir. Burada metodun validasyon kapsamı ve laboratuvarın uygulama kapsamı içerisinde yer alan gıda kategorilerinin her birinden, bir adet zorlayıcı matriks (ISO 16140-3 Ek B) seçilmelidir. Diğer bir ifadeyle aynı kategoriden birden fazla matriks seçilmemelidir.

Ancak, verifikasyon kapsamı sadece bir kategori ile sınırlandırıldığında (laboratuvar söz konusu metodu yalnız bir matriksde çalışıyor ise örn., kanatlı etinde *Campylobacter* spp) söz konusu kategori içinden (örn., kanatlı eti) bir tane matriks "Uygulama Verifikasyonu (implementation verification)" için, bir tane matriks de "Matriks Verifikasyonu (food item verification)" için olmak üzere, en az 2 "matriks (food item)" seçilerek yapılmalıdır (ISO 16140-3 Şekil 5).

Uygulama verifikasyonu çalışması için, metodun validasyon çalışmasına ait bir matriks gereklidir. Matriks verifikasyonu çalışması için ise, laboratuvarın kapsamına göre matriks sayısı değişmektedir. Buna göre;

- Laboratuvar metodu sadece gıda kapsamında çalışacaksa (Geniş kapsamlı, ≥ 5 gıda kategorisi), en az 5 matrikste verifikasyon çalışması yapması gerekmektedir. Laboratuvar böylece bu kapsamda uygulama verifikasyonu da dahil olmak üzere, toplamda, en az 6 verifikasyon

çalışması yapmalıdır.

- Laboratuvarın metot kapsamına, gıda kapsamının yanında, yem ve swap analizleri gibi diğer kapsamlarda ilave edilecekse (Geniş Kapsamlı Gıda ve Diğer Kategoriler "$N_{Diğer}$") her kapsam için bir matriks verifikasyon çalışması daha gerekmektedir. Yani 6 verifikasyon çalışması üzerine, ilave edilen kapsam kadar bir çalışma daha eklenir.
- Eğer laboratuvar kısıtlı kapsamda çalışacaksa (tüm gıdalar yerine, yalnızca belirli matrikslerde çalışılıyorsa) dört ya da dörtten az sayıda matrikste, matriks verifikasyon çalışması yapabilir. Bu durumda toplam verifikasyon çalışması, beş ya da beş den az olabilir.
- Kısıtlı kapsam ile birlikte yem ve swap analizleri gibi diğer kapsamlarda eklenecekse (Kısıtlı kapsam $N_{Gıda\ kategorisi}$ ve Diğer Kategoriler "$N_{Diğer}$") her kapsam için bir matriks verifikasyon çalışması ilavesi daha gerekmektedir.
- Laboratuvar sadece yem yada sadece swap gibi, diğer analizlerde verifikasyon çalışması yapmak istiyorsa, bu durumda toplam verifikasyon çalışması, üç yada üç den az olabilir.

Çizelge 3'te verifikasyon kapsamına göre gerekli en az matriks ve verifikasyon çalışma sayıları gösterilmektedir.

Çizelge 3. Verifikasyon Çalışmaları İçin Gerekli Olan, En Az Matriks ve Çalışma Sayısının Özeti

Verifikasyonun kapsamı	**Matriks Sayısı**		
	Uygulamanın Verifikasyonu	**Matriks Verifikasyonu**	**Toplam Verifikasyon Sayısı**
Geniş kapsamlı (≥ 5 gıda kategorisi)	1	≥ 5 Matriks'de Doğrulama	**≥ 6**
Kısıtlı kapsam ise $N_{Gıda\ kategorisi}$	1	$N_{Gıda\ kategorisi} \leq 4$ Matriks'de Doğrulama	**$(N_{Gıda\ kategorisi} + 1) \leq 5$**
Geniş Kapsamlı Gıda ve Diğer Kategoriler ($N_{Diğer}$)	1	≥ 5 Gıda Matriksinde Doğrulama + Her bir $N_{Diğer}$ kategoriden bir matriks.	**$\geq 6 + N_{Diğer}$**
Kısıtlı kapsam $N_{Gıda\ kategorisi}$ ve Diğer Kategoriler ($N_{Diğer}$)	1	$N_{Gıda\ kategorisi} \leq 4$ + Her bir $N_{Diğer}$ kategoriden bir matriks.	**$(N_{Gıda\ kategorisi} + N_{Diğer} + 1) \leq 8$**
Sadece diğer kategoriler ($N_{Diğer}$)	1	$N_{Diğer} \leq 3$ Matriks'de Doğrulama	**$(N_{Diğer} + 1) \leq 4$**

*ISO 16140-3 / Tablo 1.

5. KALİTATİF METOTLAR

ISO 16140-3'e göre kalitatif analizlerin verifikasyon çalışması için, öncelikle çalışılması planlanan metodunun valide olup olmadığı değerlendirilir. Metot eğer valide ise; uygulama ve matriks verifikasyonu, valide değilse; yalnızca matriks verifikasyonu (Çizelge 1-2) çalışması planlanır. Planlanan çalışmalar için ilgili performans kriterleri Çizelge 1-2'de gösterilmiş olup, kalitatif analizlerde hem uygulama hem de matriks verifikasyonunda yalnızca LOD50 performans kriteri tanımlanmıştır. Verifikasyon (uygulama verifikasyonu, matriks verifikasyonu) için çalışılması gerekli matriks ve matriks sayısı, sırasıyla ISO 16140-3 Ek:A ve Çizelge 3 den metodun kapsamına göre seçilebilir.

5.1. Tahmini Tespit Seviyesi-eLOD$_{50}$

LOD_{50}, bir ölçüm prosedürü ile %50 olasılıkla tespit edilebilen en düşük mikroorganizma seviyesidir. Diğer bir ifadeyle tekrarların %50 sinin pozitif veya negatif olduğu seviyedir. Test edilen örnek sayısı az olduğu için, LOD_{50}'nin doğru bir şekilde belirlenmesi mümkün değildir. Bu nedenle "tahmini LOD_{50}" ($eLOD_{50}$) terimi kullanılmaktadır.

ISO 16140-3'e göre söz konusu doğrulama çalışmalarında 3 ayrı protokol önerilmektedir. Üç protokolden birinin seçimi, laboratuvarın istenen bulaştırma (kirletme) seviyesine ulaşma yeteneğine bağlıdır. Buna göre;

- **Protokol 1;** Test porsiyonlarının istenilen seviyede bulaştırılmasına erişmede belirsizlik var ise kullanılabilir. Çalışmanın kültür ile yapıldığı ve test porsiyonlarını aşılamada kullanılacak kültürün konsantrasyonu bilinmediği durumlarda uygundur.
- **Protokol 3;** İnokulumun kirlenme seviyesi bilindiğinde, örneğin konsantrasyonu bilinen referans materyal kullanıldığında seçimi uygundur.
- **Protokol 2;** Eğer seçilen ilk protokol (Protokol 1 ya da 3) beklenen sonucu vermez ise, deneyi tekrarlamak için kullanılır.

Bu protokollere göre, $eLOD_{50}$ tespiti için, aşılama seviyesi başına gerekli tekrarlı çalışma sayıları Çizelge 4'de gösterilmektedir.

Çizelge 4. Protokollere Göre, eLOD$_{50}$Tespiti İçin İnokülasyon Seviyesi Başına Gerekli Tekrarlı Çalışma Sayıları

Test Porsiyonunun Aşılanma Seviyesi						
Protokol	**9 × LOD$_{50}$** /test por.	**3 × LOD$_{50}$** /test por.	**1 × LOD$_{50}$** /test por.	**3 - 5 kob** /test por.	**Kontrol örneği** (Blank)	**Toplam Tekrar Sayısı**
1	1	4	4	-	1	**10**
2	-	3	5	-	1	**9**
3	-	-	-	7	1	**8**

*ISO 16140-3 / Tablo 3.

Protokoller aşağıdaki gibi gerçekleştirilmelidir;

- Test porsiyon aşılamasında, bulaştırma seviyesini belirlemek için, metodun validasyonunda kullanılan ilgili gıda kategorilerinin, LOD$_{50}$ verileri kullanılır (Bu bulaştırma seviyeleri 1-9 katı arasında olmalıdır (Çizelge 4). Validasyon çalışmasında ilgili gıda kategorisi bulunmuyorsa LOD$_{50}$ değeri ≤ 1 kob/test porsiyonu olarak kabul edilir. Valide edilmemiş kalitatif referans metotlarda da, LOD$_{50}$ değeri 1 kob/test porsiyonu olarak kabul edilir.
- Seçilen protokole göre çalışmada kullanılacak matriks için gerekli test porsiyonları kullanılacak sayıya göre hazırlanır. Ayrıca aranan mikroorganizma ile doğal olarak kirlenmeyen bir örnek seçilmelidir.
- Çalışmada kullanılacak örnekleri aşılamak, hedef mikroorganizma kültürlerinin bulaştırma aralığını belirlemek için, taze kültür (16-24 saat) kullanılır, LOD çalışmasında kullanılan hedef mikroorganizmaların taze hazırlanması önemlidir. Seçici olmayan bir besiyerinde suşun kob/ml olarak konsantrasyonu belirlenir. Hedeflenen bulaştırma aralığına göre seyreltme işlemi yapılır.
- Dilüsyonlardaki istenilen bulaştırma seviyesini elde etmek ihtimalini arttırmak için fazladan dilüsyonlar ve test porsiyonları hazırlanabilir.
- Test porsiyonlarının aşılanması sırasında aynı anda aşı süspansiyonun kirletme seviyesini belirlemek için dilüsyonlardan seçici olmayan agara ekim yapılarak ya da EMS yöntemi ile ISO 7218'e göre sayım yapılır.
- Test porsiyonlarının analizi, doğrulamalarda dahil olacak şekilde, metotta belirtilen şekilde yapılır. Aşılama için kullanılan kültürün seviyesi bilinmiyorsa, hedef seviyelerin doğrulaması amacı ile ekstra seyreltmelerle ilave test bölümleri inoküle edilebilir. Analiz yöntemi uygulanarak bulaştırma yapılmış test porsiyonlari analiz edilir.
- Çizelge 4'e göre, protokol 1'in uygulamasında üç seviyede kirletilmiş örnekler ile yapılan tekrarlar kullanılır. Çalışmalar protokol 1 için en az 3 aşılama seviyesi, protokol 2 için en az 2

aşılama seviyesi ve negatif kontrol (blank) kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Buna göre çalışmalarda kullanılacak olan aşılama seviyeleri hazırlanırken;

- ✓ **Yüksek seviye,** metodun validasyonunda elde edilmiş LOD_{50} değerinin 9 katı, **(9 × LOD_{50}),** (Protokol 1 için, 1 test porsiyonu)
- ✓ **Orta seviye,** metodun validasyonunda elde edilmiş LOD_{50} değerinin 3 katı, **(3 × LOD_{50}),** (Protokol 1 için 4 test porsiyonu, Protokol 2 için 3 test porsiyonu,
- ✓ **Düşük seviye,** metodun validasyonunda elde edilmiş LOD_{50} seviyesinde, **(1 × LOD_{50}),** (Protokol 1 için 4 test porsiyonu, Protokol 2 için 5 test porsiyonu,

olacak şekilde hazırlanmalıdır.

- Protokol 3 için ise, yine Çizelge 4 doğrultusunda, yalnızca **3 - 5 kob /test porsiyonu** seviyesinde 7 çalışma ve bir blank hazırlanır.
- Bu doğrultuda ilgili protokollere göre aşılama seviyeleri ve seyreltme oranları Çizelge 5'de gösterilmiştir.

Çizelge 5. Protokol Başına Aşılama Seviyeleri

	Yüksek Seviye 9 × LOD_{50} / test porsiyonu	**Orta Seviye 3 × LOD_{50} / test porsiyonu**	**Düşük seviye 1 × LOD_{50} / test porsiyonu**	**3 - 5 kob /test por.**
PROTOKOL 1	Beklenen LOD_{50}'nin en fazla dokuz katı olmalıdır.	Yüksek aşılama seviyesinden, orta seviyeye ulaşmak için 1: 3 seyreltme ile gerçekleştirilir.	Orta seviyesinden, düşük seviyeye ulaşmak için 1: 3 ile seyreltme gerçekleştirilir.	-
PROTOKOL 2	-	Beklenen LOD_{50}'nin en fazla üç katı olmalıdır.	Orta seviyesinden, düşük seviyeye ulaşmak için 1: 3 seyreltme gerçekleştirilir.	-
PROTOKOL 3	-	-	-	İnokulumun kirlenme seviyesi bilinmektedir. (Miktarı bilinen referans materyal)

*ISO 16140-3 / Tablo 4.

5.2. Seçilen Protokole Göre eLOD50'nin Tespiti

Protokol 1 ve 2 için $eLOD_{50}$ değeri, Çizelge 4 doğrultusunda, elde edilen pozitif ve negatif sonuçların sayısı ve blank sonucuna göre, sırasıyla Çizelge 6 ve Çizelge 7 kullanılarak belirlenir. Protokol 3 için ise, yine Çizelge 4 doğrultusunda, yalnızca 7 tekrardan elde edilen pozitiflerin sayısı ve blank sonucuna göre değerlendirilir.

Protokol 1 için;

- ✓ Blank negatif olmalıdır, aksi taktirde tüm çalışma tekrarlanır.
- ✓ Yüksek seviye aşılama sonucu sadece pozitif olmalıdır, aksi taktirde tüm çalışma tekrarlanır.
- ✓ Bazı sonuç kombinasyonları nadir de olsa, tabloda (Çizelge 6) "güvenilir olmayan EMS sonucu" olarak çıkabilir, bu durumda tüm çalışma tekrarlanmalıdır.
- ✓ Birden fazla dilüsyon kullanıldığında LOD_{50}'ye en yakın 3 dilüsyondan, en düşük aşılama seviyesi alınır. İlgili üç dilüsyona ait sonuçlar, Çizelge 6'ya göre değerlendirilir.

Protokol 2 için;

- ✓ Blank negatif olmalıdır, aksi taktirde tüm çalışma tekrarlanır.
- ✓ Hem orta hem de düşük aşılama seviyelerindeki sonuçlar pozitiflik ve negatiflik gösterebilir. Tüm çalışmaların sonucu negatif bulunursa tüm çalışma tekrarlanır.
- ✓ Bazı sonuç kombinasyonları nadir de olsa, tabloda (Çizelge 7) "güvenilir olmayan EMS sonucu" olarak çıkabilir bu durumda tüm çalışma tekrarlanmalıdır.
- ✓ Birden fazla dilüsyon kullanıldığında LOD_{50}'ye en yakın 2 dilüsyondan, en düşük aşılama seviyesi alınır. İlgili iki dilüsyona ait sonuçlar, Çizelge 7'ye göre değerlendirilir.

Protokol 3 için;

- ✓ Blank negatif olmadır, aksi taktirde tüm çalışma tekrarlanır.
- ✓ Bu protokolden elde edilecek sonuçlar sadece test porsiyonu bulaştırma seviyesi 3 - 5 kob/ test porsiyonu olduğunda kullanılabilir.
- ✓ Eğer bulaştırma seviyesi 5 kob/ test porsiyonundan büyükse sonuçlar kullanılamaz tüm çalışma tekrarlanır. Eğer bulaştırma seviyesi 3 kob/ test porsiyonundan küçükse sonuçlar değerlendirmede kullanılabilir.

5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Protokol 1 ve 2 için;

Protokol 1 veya 2'ye gore $eLOD_{50}$ tespit edildikten sonra, çalışılan metodun validasyon çalışmasında ki LOD_{50} değeri ile karşılaştırılır.

Uygulama verifikasyonu için, ilgili gıdaya ait (matriks) LOD_{50} değeri kullanılır.

- ✓ Matriks verifikasyonu için, standart metot içerisinde LOD_{50} belirtiliyor ise, bulunan **$eLOD_{50} > 4 \times LOD_{50}$** olmamalıdır.
- ✓ **Eğer matriks için ilgili LOD_{50} değeri bulunmuyorsa,** LOD_{50} teorik olarak 1 kob/ test porsiyonu olarak kabul edilir, bu nedenle **$eLOD_{50}$ 4 kob/test** porsiyonuna eşit veya daha düşük olmalıdır.

Protokol 3 için;

- ✓ Protokol 3 kullanılmış ise 7 tekrar analizinden **en az 6 tekrarı pozitif sonuç** olmalıdır.

Not: Standart metotda kullanılan test kısmı ile gerçekleştirilen doğrulama çalışmasında kullanılan test porsiyonu (25g, 100ml, 375g vb) aynı veya daha küçük olmalıdır. Eğer standart metotta sonuç kob/g veya kob/ml şeklinde belirtilmiş ise kullandığımız test miktarı ile sonuç çarpılmalı ve buna göre değerlendirilmelidir. Örn 0,1 kob/g veya kob/ml'lik bir LOD_{50}, 25 g veya ml'lik bir test kısmı kullanıldığında sonuç 2,5 LOD_{50} olarak verilmelidir.

Çizelge 6. Protokol 1'i Kullanarak, Bulaştırma Düzeylerinin Pozitif Sonuç Sayısına Göre, $eLOD_{50}$ nin Belirlenmesi

Yüksek İnokülasyonSeviyesi Hedeflenen: **9xLOD_{50}/** Test Porsiyonu	**Orta İnokülasyonSeviyesi** Hedeflenen: **3xLOD_{50}/** Test Porsiyonu	**Düşük İnokülasyonSeviyesi** Hedeflenen: **1xLOD_{50}/** Test Porsiyonu	**Boş Çalışma (Blank)**	**$eLOD_{50}$** kob /Test Porsiyonu
1/1	4/4	4/4	0/1	**< 1,0 × DİS[a]**
1/1	4/4	3/4	0/1	**= 0,5 × DİS**
1/1	4/4	2/4	0/1	**= 0,7 × DİS**
1/1	4/4	1/4	0/1	**= 1,0 × DİS**
1/1	4/4	0/4	0/1	**= 1,5 × DİS**
1/1	3/4	4/4	0/1	**= 0,7 × DİS**
1/1	3/4	3/4	0/1	**= 1,0 × DİS**
1/1	3/4	2/4	0/1	**= 1,3 × DİS**
1/1	3/4	1/4	0/1	**= 1,7 × DİS**
1/1	3/4	0/4	0/1	**= 2,3 × DİS**
1/1	2/4	4/4	0/1	**= 1,1 × DİS**
1/1	2/4	3/4	0/1	**= 1,5 × DİS**
1/1	2/4	2/4	0/1	**= 1,9 × DİS**
1/1	2/4	1/4	0/1	**= 2,6 × DİS**
1/1	2/4	0/4	0/1	**= 3,7 × DİS**
1/1	1/4	4/4	0/1	**Güvensiz Sonuç[b] EMS**
1/1	1/4	3/4	0/1	**= 2,1 × DİS**
1/1	1/4	2/4	0/1	**= 2,8 × DİS**
1/1	1/4	1/4	0/1	**= 4,0 × DİS**
1/1	1/4	0/4	0/1	**= 6,3 × DİS**
1/1	0/4	4/4	0/1	**Güvensiz Sonuç[b] EMS**
1/1	0/4	3/4	0/1	**= 3,0 × DİS**
1/1	0/4	2/4	0/1	**= 4,3 × DİS**
1/1	0/4	1/4	0/1	**= 6,7 × DİS**
1/1	0/4	0/4	0/1	**= 14,0 × DİS**

*ISO 16140-3 / Tablo 6.
[a] DİS: Düşük Aşılama Seviyesi
[b] Güvensiz Sonuç: EMS kombinasyonunun oluşması pek olası değildir. Deney tekrarlanmalıdır.

Çizelge 7. Protokol 2'yi Kullanarak Bulaştırma Düzeylerinin Pozitif Sonuç Sayısına Göre, $eLOD_{50}$ nin Belirlenmesi

Orta İnokülasyon Seviyesi Hedeflenen: **3xLOD_{50}/** Test Porsiyonu	**Düşük İnokülasyonSeviyesi** Hedeflenen: **1xLOD_{50}/** Test Porsiyonu	**Boş Çalışma (Blank)**	**$eLOD_{50}$** kob / Test Porsiyonu
3/3	5/5	0/1	**< 1,0 × DİS[a]**
3/3	4/5	0/1	**= 0,4 × DİS**
3/3	3/5	0/1	**= 0,7 × DİS**
3/3	2/5	0/1	**= 1,0 × DİS**
3/3	1/5	0/1	**= 1,4 × DİS**
3/3	0/5	0/1	**= 2,0 × DİS**
2/3	5/5	0/1	**= 0,7 × DİS**
2/3	4/5	0/1	**= 0,9 × DİS**
2/3	3/5	0/1	**= 1,2 × DİS**
2/3	2/5	0/1	**= 1,6 × DİS**
2/3	1/5	0/1	**= 2,3 × DİS**
2/3	0/5	0/1	**= 3,7 × DİS**
1/3	5/5	0/1	**Güvensiz Sonuç[b] EMS**
1/3	4/5	0/1	**= 1,4 × DİS**
1/3	3/5	0/1	**= 1,8 × DİS**
1/3	2/5	0/1	**= 2,6 × DİS**
1/3	1/5	0/1	**= 4,1 × DİS**
1/3	0/5	0/1	**= 8,6 × DİS**
0/3	5/5	0/1	**Güvensiz Sonuç[b] EMS**
0/3	4/5	0/1	**Güvensiz Sonuç[b] EMS**
0/3	3/5	0/1	**= 2,9 × DİS**
0/3	2/5	0/1	**= 4,5 × DİS**
0/3	1/5	0/1	**= 9,4 × DİS**

*ISO 16140-3 / Tablo 8.
[a]DİS: Düşük Aşılama Seviyesi
[b] Güvensiz Sonuç: EMS kombinasyonunun oluşması pek olası değildir. Deney tekrarlanmalıdır.

5.4. Örnek Çalışma "ISO 6579-1'e göre *Salmonella* Spp. Tespiti için, Gıda Kapsamında, Protokol 1 Doğrultusunda Yapılacak Olan Verifikasyon Çalışması"

5.4.1. Çalışma Kültürünün Hazırlanması

Çalışılacak taze kültürün (16-24 saatlik) başlangıç dilüsyonundan ekim yapılarak ana stok kob/ml olarak hesaplanır (Ek 5). Bakteri yükü hesaplanmış olan ana stoktan aşağıda belirtilen şekilde dilüsyonlar hazırlanır.

Örneğin ana stoğun yükü **6 x 10^8** kob/ml olarak bulunmuşsa, bu ana stoğun 10^{-7} dilüsyonunun ml'sinde 60 kob/ml olacağı kabul edilir ve bu dilüsyona "Dilüsyon A" adı verilerek, çalışmada kullanılır. Ancak ana stok hazırlandıktan sonraki, bu yeni gecelik kültürün miktarı bilinmediğinden, $eLOD_{50}$ tespitinde kullanılacak bulaştırma seviyelerini bulmak için, kullanıcı laboratuvarı Çizelge 9 daki gerekli olan her dilüsyonu ve test kısımlarını kullanarak 3 düzey hedef seviyeyi elde etmek için birkaç dilüsyon kullanabilir. Olması planlanan sayı doğrultusunda, LOD seviyesine kadar, aşağıda belirtilen şekilde 1:3 lük seyreltmeleri yapılır ve dilüsyonların her biri isimlendirilir. Daha sonra bu dilüsyonlardan seçici olmayan bir besiyerine ekim yapılarak elde edilen koloni sayıları tespit edilir (ISO 16410-3, Ek:C)

- ✓ Ana stoğun 10^{-7} dilüsyonundan 1 ml alınır, **Dilüsyon A** (60 kob/ml),
- ✓ Dilüsyon A dan 1 ml alıp, 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon B** (20 kob/ml),
- ✓ Dilüsyon B den 1 ml alıp 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon C** (6,67 kob /ml),
- ✓ Dilüsyon C den 1 ml alıp 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon D** (2,22 kob /ml),
- ✓ Dilüsyon D den 1 ml alıp 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon E** (0,74 kob /ml),
- ✓ Dilüsyon E den 1 ml alıp 1:3 seyreltilir, **Dilüsyon F** (0,25 kob /ml) olması planlanır.

Hazırlanan Dilüsyonlar ve Elde Edilen Sonuçlar, Çizelge 8'de gösterilmiştir.

Çizelge 8. Hazırlanan Dilüsyonlar ve Elde Edilen Sonuçlar

Dilüsyon Adı	Planlanan Koloni Sayısı	Elde Edilen Koloni Sayısı
A	60kob/ml	54 kob/ml
B	20 kob/ml	18 kob/ml
C	6.67 kob/ml	6 kob/ml
D	2,22 kob/ml	2 kob/ml
E	0,74 kob/ml	Üreme yok
F	0,25 kob/ml	Üreme yok

Çizelge 6'da verilen örnekte, doğru dilusyonların dahil edildiğinden emin olmak icin altı dilüsyon kullanılmıştır. Toplamda 21 bulaştırma yapılmış test bölümü ve bir kontrol örneği ile

birlikte incelenmiştir. $eLOD_{50}$ tayini için sadece ilgili üç seviye ve negatif kontrol (aşılama yapılmamış) değerlendirmeye alınmıştır. Çizelge 6'da LOD_{50} değerine en yakın olan dilüsyon, D dilüsyonu olarak bulunmuştur. Bu nedenle Protokol 1 çalışması için, "B, C ve D" dilüsyonlarına ait sonuçlar $eLOD_{50}$ belirlenmesinde kullanılacaktır (Çizelge 9)

Protokol 1, 2 ve 3'e göre, $eLOD_{50}$ tespitinde kullanılacak, bulaştırma seviyelerini bulmak için hazırlanmış olan bu dilüsyonların, tekrarlı en az çalışma sayıları Çizelge 9'da verilmiştir.

Çizelge 9. Gerekli Minimum Dilüsyon Sayısından Fazlasını Kullanan Protokol 1, 2 ve 3 için Dilüsyonlar ve Karşılık Gelen Tekrar Sayısı

	Dilüsyon A (10^{-7})	**Dilüsyon B (A'nın 1:3)**	**Dilüsyon C (B'nin 1:3)**	**Dilüsyon D (C'nin 1:3)**	**Dilüsyon E (D'nin 1:3)**	**Dilüsyon F (E'nin 1:3)**	**Kontrol Örneği**
Protokol 1	1 tekrar	4 tekrar	4 tekrar	4 tekrar	4 tekrar	4 tekrar	1 tekrar
Protokol 2	-	3 tekrar	5 tekrar	5 tekrar	5 tekrar	5 tekrar	1 tekrar
Protokol 3	-	-	7 tekrar	7 tekrar	7 tekrar	7 tekrar	1 tekrar

*ISO 16140-3 / Tablo 5.

Çizelge 9'da, Protokol 1 için belirtilen çalışma sayılarına göre, yapılan uygulama verifikasyonunda (implementation verification) elde edilen sonuçlar, Çizelge 10'da gösterilmiştir.

Çizelge 10. Test Porsiyonlarının Çalışma Sonuçları

	Dilisyon B (A'nın 1:3)	**Dilisyon C (B nin 1:3)**	**Dilisyon D (C nin 1:3)**	**Dilisyon E (D nin 1:3)**	**Dilisyon F (E nin 1:3)**	**Negatif Kontrol (Aşılama Yapılmamış)**
Protokol 1	*1/1	*4/4	*2/4	*0/4	*0/4	*0/1
*Pozitif Sayısı /Tekrar Sayısı						

Çizelge 9 daki gibi daha fazla seyreltme kullanıldığında, düşük bulaştırma seviyesi LOD_{50}'ye en yakın olan üç seyreltme düzeyi verileri Çizelge 6'ya göre değerlendirmek için kullanılacaktır. Çizelge 10'da bulunan ilgili dilüsyonların pozitif sayıları ile Çizelge 6'daki sonuç kombinasyonlarının (Dilusyon B 1/1, Dilusyon C 4/4, Dilusyon D 2/4) eşleştiği satırdaki $eLOD_{50}$

katsayısı (0,7) ile düşük aşılama (2 kob/test porsiyonu) seviyesi çarpılarak çalışmanın $eLOD_{50}$ değeri bulunur ve ilgili satırdaki sonuç değerlendirilir. Buna göre elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmanın $eLOD_{50}$ değeri, 0,7x2=1,4 kob/ test porsiyonu olarak bulunmuştur. Bulunan sonuç, metot validasyonundaki LOD_{50} değeri ile karşılaştırılarak uygunluğu değerlendirilir. Uygulama verifikasyon çalışmasında matriks olarak çiğ kanatlı eti kullanılmıştır. Bu matriks için, ISO 6579-1 metot validasyonunda LOD_{50} değeri, Annex C (Metot Validasyon Çalışmaları ve Performans Karakteristikleri)' de 2,2 kob/ test porsiyonu olarak belirtilmiştir. Çalışma sonucu belirlenen $eLOD_{50}$ değeri **1,4 kob/test porsiyonu < 4 x 2,2 kob/test porsiyonu** olduğundan dolayı **yapılan çalışma uygundur.**

Uygulama verifikasyonu çalışması yapıldıktan sonra aynı protokol, farklı matriks verifikasyonlarında da kullanılır. Burada unutulmaması gereken uygulama verifikasyonunda hangi protokol kullanıldı ise matiriks verifikasyonunda aynı protokolün kullanılması gerektiğidir.

Buna göre, sadece gıda kapsamında, ilgili metot doğrultusunda çalışma yapılacak ise, Çizelge 1 de belirtilen sayıya göre, en az beş matriksde aynı şekilde "matriks verifikasyon" çalışması yapılır. Çizelge 11'de çiğ kanatlı eti matriksi için yapılan "matriks verifikasyon" çalışması özetlenmiştir.

Çizelge 11. Protokol 1'e Göre Çiğ Kanatlı Eti İçin Test Porsiyonlarının Çalışma Sonuçları (Food/ItemVerification)

Yüksek Seviye 18 kob/ test porsiyonu	**Orta Seviye** 6 kob/ test porsiyonu	**Düşük Seviye** 2 kob/ test porsiyonu	**Blank** 0 kob/test porsiyonu	**[b] $eLOD_{50}$**	**[d] LOD_{50}**	**Uygunluk Değerlendirmesi**
[a] 1/1	[a] 4/4	[a] 2/4	[a] 0/1	0,7 x [c] DİS(2)= 0,7x2=1,4	2,2	**[b] $eLOD_{50}$ < 4x LOD_{50} 1,4 < (4x2,2) olması sebebi ile çalışma uygundur.**

[a] Pozitif Sayısı /Tekrar Sayısı
[b] Çizelge 6 da gösterilen, yüksek, orta, düşük aşılama seviyelerinden elde edilen sonuç kombinasyonlarına karşılık gelen katsayı ile (0,7), düşük aşılama seviyesi (2 kob/test porsiyonu) çarpılarak belirlenir (0,7x2=1,4).
[c] Düşük İnokülasyon Seviyesi
[d] Metodun (ISO 6579-1, Annex C) bildirilen LOD_{50} değeri

Çizelge 11'de gösterildiği şekilde, metot (ISO 6579-1) kapsamındaki, ISO 16140-3 Ek-A Tablo 1'de bildirilen 4 farklı matriks örneği için de aynı çalışma tekrar edilir. Uygunluk durumuna göre çalışma sonlandırılır.

Eğer, çalışmada seçilen protokol (Protokol 1 ya da 3) beklenen sonucu vermez ise, deneyi tekrarlamak için Protokol 2 kullanılır.

ISO 16140-3 standartı, ilgili laboratuvardaki metot verifikasyonunu tanımladığı için, laboratuvar, verifikasyon çalışmalarını (uygulama ve matriks) personele paylaştırabilir. Bu durumda, laboratuvarın yukarıdaki örnek verilen çalışma için, gıda kapsamı dahilinde, Protokol 1 doğrultusunda, 21 Çalışma x En az 6 tekrar (1 uygulama verifikasyonu + en az 5 gıda matriksi verifikasyonu) = 126 çalışma yapması gereklidir. Çizelge 3'de en az çalışma sayıları verilmiştir. Laboratuvar, fazla sayıda personel bulunduruyorsa bu durumda her personel için ilave bir matriks verifikasyon çalışması planlayabilir. Bununla birlikte laboratuvara yeni personelin gelmesi durumunda da, yetkinliği sağlanmış ya da yetkin olan yeni personelin analizi yapma yetkisini alabilmesi için, bir uygulama verifikasyon çalışması yapması yeterli olacaktır.

6. KANTİTATİF METOTLAR

ISO 16140-3'e göre kantitatif analizlerin verifikasyon çalışması için, öncelikle çalışılması planlanan metodunun valide olup olmadığı değerlendirilir. Metot eğer valide ise; uygulama ve matriks verifikasyonu, valide değilse; yalnızca matriks verifikasyonu (Çizelge 1-2) çalışması planlanır. Planlanan çalışmalar için ilgili performans kriterleri Çizelge 1-2'de gösterilmiş olup, kantitatif analizlerde uygulama verifikasyonu için "Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapmasının (S_{IR}) Belirlenmesi" matriks verifikasyonu için ise "Tahmini Sapma (eBias) Belirlenmesi" performans kriterleri olarak tanımlanmıştır. Verifikasyon (uygulama verifikasyonu, matriks verifikasyonu) için çalışılması gerekli matriks ve matriks sayısı, sırasıyla ISO 16140-3 Ek:A ve Çizelge 3'den metodun kapsamına göre seçilebilir.

6.1. Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapmasının (SIR) Belirlenmesi

Uygulama doğrulaması tek bir laboratuvarda gerçekleştirilir ve bu nedenle tekrarüretilebilirlik kavramı "laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik/ara kesinlik" standart sapması (S_{IR}) olarak ifade edilir.

ISO 16140-3 doğrultusunda Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapmasının (S_{IR}) belirlenmesi, yalnızca valide kantitatif metotlarda ve yalnızca uygulama doğrulamasına (implementation verification) uygulanır (Çizelge1-2)

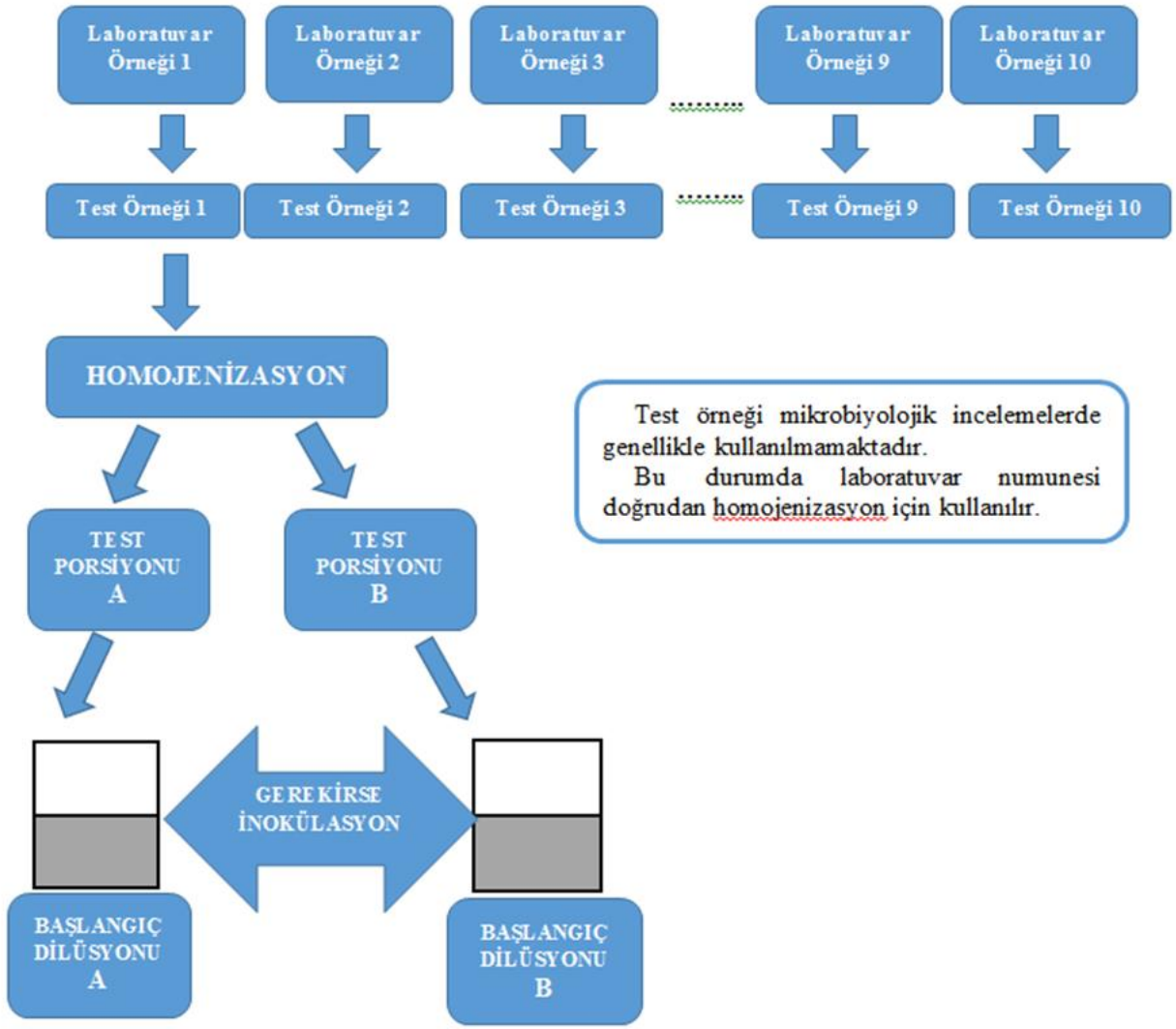
Bununla birlikte ISO 16140-3'e göre kullanılacak olan metodun valide olmaması durumunda (S_{IR} değeri bulunmayan metotlar), "uygulama verifikasyonu yapılmaz" şeklinde Çizelge 2'de belirtildi ise de, **validasyon verisi olmayan kantitatif analiz metotları için**, analizin güvenilirliği açısından, ölçüm belirsizliğini gösterebilmek adına, teknik ölçüm belirsizliğini gösteren S_{IR} *"Laboratuvar İçi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması"* performans kriteri çalışılmalı, yani bir uygulama verifikasyonu yapılmalıdır.

Uygulama doğrulamasındaki Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapmasının belirlenmesi, ISO 19036'da belirtilen üç ana belirsizlik bileşeninden (teknik, matriks, dağılım) biri olan teknik belirsizliğin tespit edilmesini sağlar. Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik standart sapması (S_{IR}) hesaplanmasında, ISO 19036:2019, 5.2.2. maddesi kaynak alınmıştır.

Uygulama doğrulaması sırasında metot, doğrulama çalışmaları da dahil olmak üzere bildirildiği şekilde çalışılmalıdır.

6.1.1. Protokolün Uygulanması

- Uygulama verifikasyon çalışması için aynı gıda matriksine sahip en az 10 örnek gereklidir. İstenirse daha fazla örnekle de çalışma yapılabilir.
- Her bir örnek homojenize edildikten sonra iki test porsiyonuna (A, B) ayrılır, bu işlem mikroorganizmaların eşit dağılımı için zorunludur. (Şekil 1). Sıvı ürünler için karıştırma, örneğin elle çalkalanması ile, katı ürünler için ise stomacher ile yapılabilir.
- Test porsiyonlarının (A, B) analizinde kullanılan koşullar validasyon kapsamının izin verdiği ölçüde çeşitlendirilir. Laboratuvar aksini savunmadıkça,
    - farklı kullanıcılarla,
    - farklı kimyasal ve besiyeri lotlarıyla,
    - opsiyonel olarak gerekli ise mikroorganizmanın farklı suşları ile
    - laboratuvar alt yapısı izin veriyorsa farklı ekipmanlar (İnkübatör, pipet, vorteks,…) kullanarak,
    - eğer gıda matriksi yeterince stabil ise analiz farklı günlerde de yapılabilir.



Şekil 1. Laboratuvariçi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapmasının Belirlenmesi İçin Örneklerin Hazırlanması (*ISO 16140-3, Ek D)

- Uygulama verifikasyon çalışmasında (implementation verification) mümkünse "doğal kirlenmiş" bir matriks kullanılması önerilir.
- Çalışmada doğal kirlenmiş örnekler kullanılacaksa, bulaştırma seviyeleri laboratuvarın daha önce çalışıp tespit ettiği seviyeleri temsil eden aralıklarda olmalıdır.
- Çalışmada kullanılan doğal kirlenmiş test porsiyonları, homojenizasyon işleminden sonra doğrudan analize alınabilir.
- Çalışmada doğal kirlenmiş bir matriks kullanılması mümkün değilse ya da test porsiyonundaki doğal kirlenme seviyesi 10 kob/g'dan az olduğu tahmin ediliyorsa validasyon kapsamındaki herhangi bir gıda matriksi spayklanmak için seçilebilir. Matriks belirsizliğini en aza indirmek için kolay homojenizasyonu sağlanabilen bir gıda matriksi 16140-3 Ek:A'dan seçilebilir.
- Öncelikle uygulama verifikasyonu için, metot kapsamındaki kategorilerden kolay

homojenize edilebilen bir matriks seçilir. Verifikasyon çalışması için en az 10 örnek gereklidir. Her örnek test porsiyonu iki katı miktarında olmalıdır. Örnekler, mümkünse farklı lot, hatta farklı markalardan temin edilmelidir.

- Bulaştırma yapılacak örneklerin bulaştırma seviyeleri, doğal kirlenme seviyeleri düzeyinde ve ilgili analiz metodunun tespit edebildiği limitleri kapsayacak şekilde olmalıdır. Bu doğrultuda, çalışmada kullanılacak örnekleri aşılamak, hedef mikroorganizma kültürlerinin bulaştırma aralığını belirlemek için, taze kültür (16-24 saat) kullanılır. Çalışmada kullanılan hedef mikroorganizmaların taze hazırlanması önemlidir. Seçici olmayan bir besiyerinde suşun kob/ml olarak konsantrasyonu belirlenir ve hedeflenen bulaştırma aralığına göre seyreltme işlemi yapılır (Ek:5).
- Bulaştırma yapılacak suş ile metodunun belirleyebildiği, bilinen bulaştırma seviyesindeki aşı süspansiyonu, örneğe ait test porsiyonlarının başlangıç süspansiyonlarına aşılanır.

6.1.2. Sonuçların Değerlendirilmesi

En az 10 laboratuvar örneğine ait verilerden yola çıkarak, laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

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

S_{IR} = Laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması

i = Laboratuvar örneğinin sıra numarası

n = Örneklerin sayısı

y_{iA}, y_{iB} = Örneklerden kob/g veya kob/ml olarak elde edilen sonuçların $\log_{10}$ hali

6.1.3. Kabul Edilebilirlik Limitleri

Laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması *(S_{IR})* ilgili metodun validasyon çalışmasındaki gıda matriksinde elde edilmiş en düşük ortalama değerin (üç seviyedeki S_{IR} değerinin aritmetik ortalaması) iki katına eşit veya daha düşük olmalıdır. Eğer validasyon çalışmasında sadece bir değer (SR) belirlenmişse, doğrulama yapılan metodun laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması *(S_{IR})*, laboratuvarlararası tekrarüretilebilirlik standart sapmasının (SR) iki katına eşit veya iki katından düşük olmalıdır.

Bununla birlikte, her ne kadar ISO 16140-3, valide edilmemiş kantitatif metotlar için (S_{IR} değeri bulunmayan metotlar) "uygulama verifikasyonu yapılmaz" ifadesi ile, bir performans kriteri tanımlanmamış olsa da (Çizelge 2), söz konusu metot aynı zamanda **kantitatif analiz metodunun**

validasyon verisi yoksa, analizin güvenilirliği açısından ölçüm belirsizliğini hesaplayabilmek adına S_{IR} çalışılabileceğini, bunun için de "kabul edilebilirlik kriterlerinin" başka bir resmi dökümandan alınabileceğini beyan etmiştir. Bu doğrultuda **"NMKL 32"** dökümanına göre *"Eğer ortaklaşa çalışmadan bir değer elde edilmemişse (metodun validasyon verileri yoksa), laboratuvariçi tekrar üretilebilirlik (S_{IR}) standart sapması genel kural olarak* ***0,4 log10 kob/g*** *değerini geçmemelidir."* ifadesi doğrultusunda S_{IR} çalışmaları yapılabilir.

6.1.4. Örnek Çalışma

Bir laboratuvar 12 adet tiramisu numunesini *Enterobacteriaceae* seviyelerini tespit etmek için ISO 21528-2'ye göre analiz etmiştir ve Çizelge 12'de verilen sonuçları elde etmiştir.

Çizelge 12. Temsili Analiz Sonuçları

Laboratuvar Örnek Numarası	Beklenen Kirlilik seviyesi (kob/g)	Sonuç A (x_{iA}) (kob/g)	Sonuç B (x_{iB}) (kob/g)	Log_{10} Sonuç A $y_{iA}=\log_{10}(x_{iA})$	Log_{10} Sonuç B $y_{iB}=\log_{10}(x_{iB})$
1	30	< 40 (10)	< 40 (30)	≤ 1,60	≤ 1,60
2	300	110	182	2,04	2,26
3	300	410	620	2,61	2,79
4	600	640	330	2,81	2,52
5	600	690	570	2,84	2,76
6	600	780	640	2,89	2,81
7	600	620	1300	2,79	3,11
8	600	870	1500	2,94	3,18
9	6000	8600	6400	3,93	3,81
10	6000	16000	5000	4,20	3,70
11	6000	> 15000	13400	> 4,18	4,13
12	30000	20000	32000	4,30	4,51

*****ISO 16140-3, Tablo 10

Birinci ve on birinci numunelere ait sonuçlar ISO 7218'e göre sayım limitleri dışında olduğundan dolayı hesaplamalarda kullanılmayacaktır. Kalan 10 sonuç Çizelge 13'de gösterildiği şekilde hesaplanarak değerlendirilecektir.

Çizelge 13. Laboratuvariçi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapmasının *(S_{IR})* Hesaplanması

Laboratuvar Örnek Numarası	**Log_{10} Sonuç A $y_{iA}=log_{10}(x_{iA})$**	**Log_{10} Sonuç B $y_{iB}=log_{10}(x_{iB})$**	**Mutlak Fark $\|yiA - yiB\|$**	**Mutlak Farkın Karesi $\|yiA - yiB\|^2$**
1	≤ 1,6021	≤ 1,6021	Kullanılmadı	Kullanılmadı
2	2,0414	2,2601	0,2187	0,0478
3	2,6128	2,7924	0,1796	0,0323
4	2,8062	2,5185	0,2877	0,0828
5	2,8388	2,7559	0,0830	0,0069
6	2,8921	2,8062	0,0859	0,0074
7	2,7924	3,1139	0,3216	0,1034
8	2,9395	3,1761	0,2366	0,0560
9	3,9345	3,8062	0,1283	0,0165
10	4,2041	3,6990	0,5051	0,2552
11	> 4,1761	4,1271	Kullanılmadı	Kullanılmadı
12	4,3010	4,5051	0,2041	0,0417
			Toplam	0,6500
			Toplam / (2 × 10)	0,0325
			S_{IR} = √(0,0325)	0,18

*****ISO 16140-3, Tablo 11

Hesaplanan değer *(S_{IR})* 0,18 metodun validasyon çalışmasından elde edilen veriler ile karşılaştırılmıştır. Metodun validasyon çalışmasından elde edilen veriler (SR) Çizelge 14'te verilmiştir.

Çizelge 14. ISO 21528-2'nin Validasyon Çalışmasında Elde Edilen (S_{IR}) Verilerin Özeti

(Gıda) Matriks	**Validasyon Çalışmasındaki S_R Değerleri**			
	Düşük İnokülasyon seviyesi	**Orta İnokülasyon seviyesi**	**Yüksek İnokülasyon seviyesi**	**Üç İnokülasyon Seviyesinin Ortalama Değeri**
Yumurta Ürünleri	0,32	0,50	0,48	0,43
Çiğ Et	0,28	0,36	0,57	0,40
Hayvan Yemi	0,18	0,17	0,20	0,18
Pastörize Süt	0,24	0,18	0,19	0,20
Tiramisu	0,22	0,18	0,13	0,18
*****ISO 16140-3, Tablo 12				

- Deney, gıda matriksinin etkisinin olmadığı kabul edilerek tasarlanmıştır. *(S_{IR})* değeri, metot validasyon çalışmasında test edilen herhangi bir matrikste elde edilmiş en düşük ortalama SR değeri ile karşılaştırılır. Bu örnekte en düşük ortalama SR değeri hayvan yemi ve tiramusuda elde edilmiş olup 0,18'dir.
- Uygulama doğrulaması çalışmasında elde edilen *(S_{IR})* değeri olan 0,18, metot

validasyonunda elde edilmiş SR değerinin 2 katı (2 x 0,18) ile karşılaştırılır.

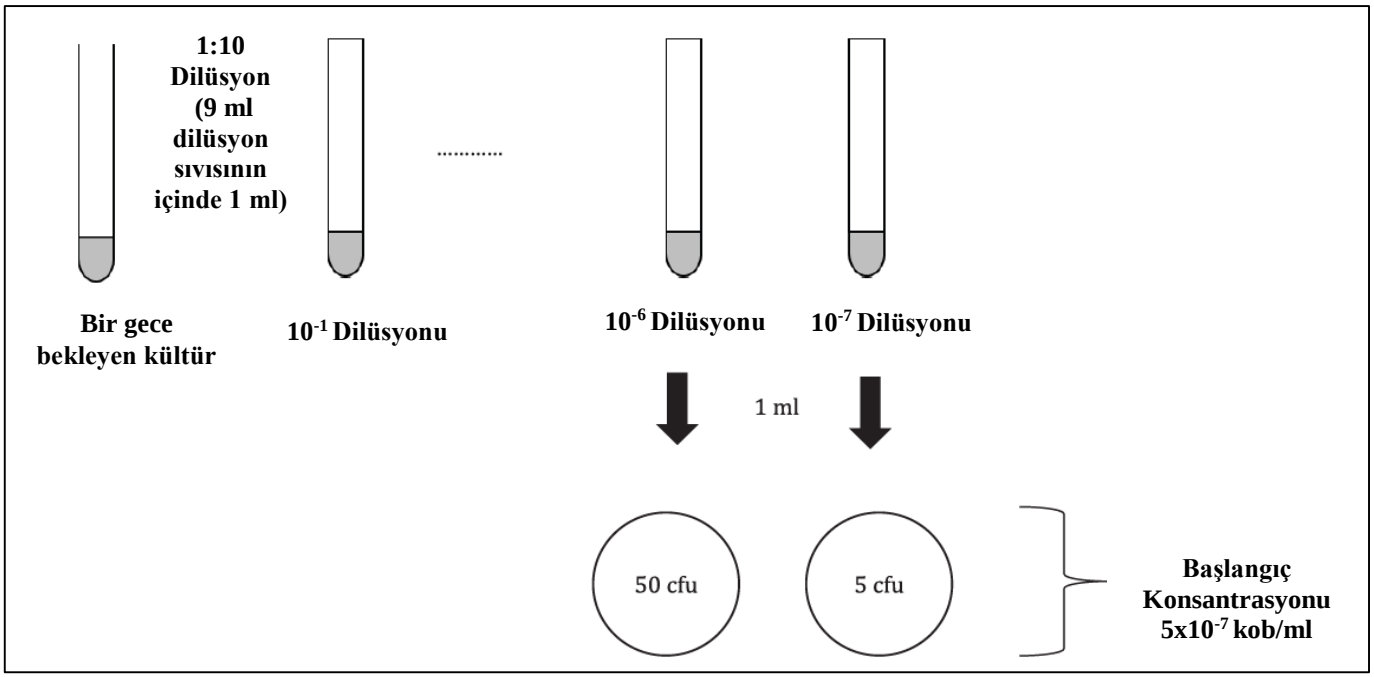
- Uygulama doğrulaması çalışmasında elde edilen *(S_{IR})* değeri olan 0,18, 0,36 (2 x 0,18)'dan küçük olduğundan dolayı uygulama doğrulaması kabul edilebilirlik limitleri içerisindedir.
- Metot validasyon çalışmasında sadece bir SR değeri verilmişse, *(S_{IR})* değeri bu verilen değer ile karşılaştırılır.
- Metot validasyon çalışmasında SR değeri yoksa, *(S_{IR})* değeri, 0,4 log10 kob/g değerini geçmemelidir.

6.2. Tahmini Sapma (eBias) Belirlenmesi

Hem valide hem de valide edilmemiş referans kantitatif metotlar için belirlenmesi gereken verifikasyon parametrelerinden biridir. Tahmini sapma hesaplanması (eBias) sadece gıda matriksi doğrulamasında (food ıtem verıfıcatıon) gereklidir (Çizelge 1 ve 2). Gıda matriksi doğrulamasında analiz metodu tarif edildiği gibi, eğer varsa doğrulama (konfirmasyon) prosedürü de, her bir test porsiyonu için uygulanır.

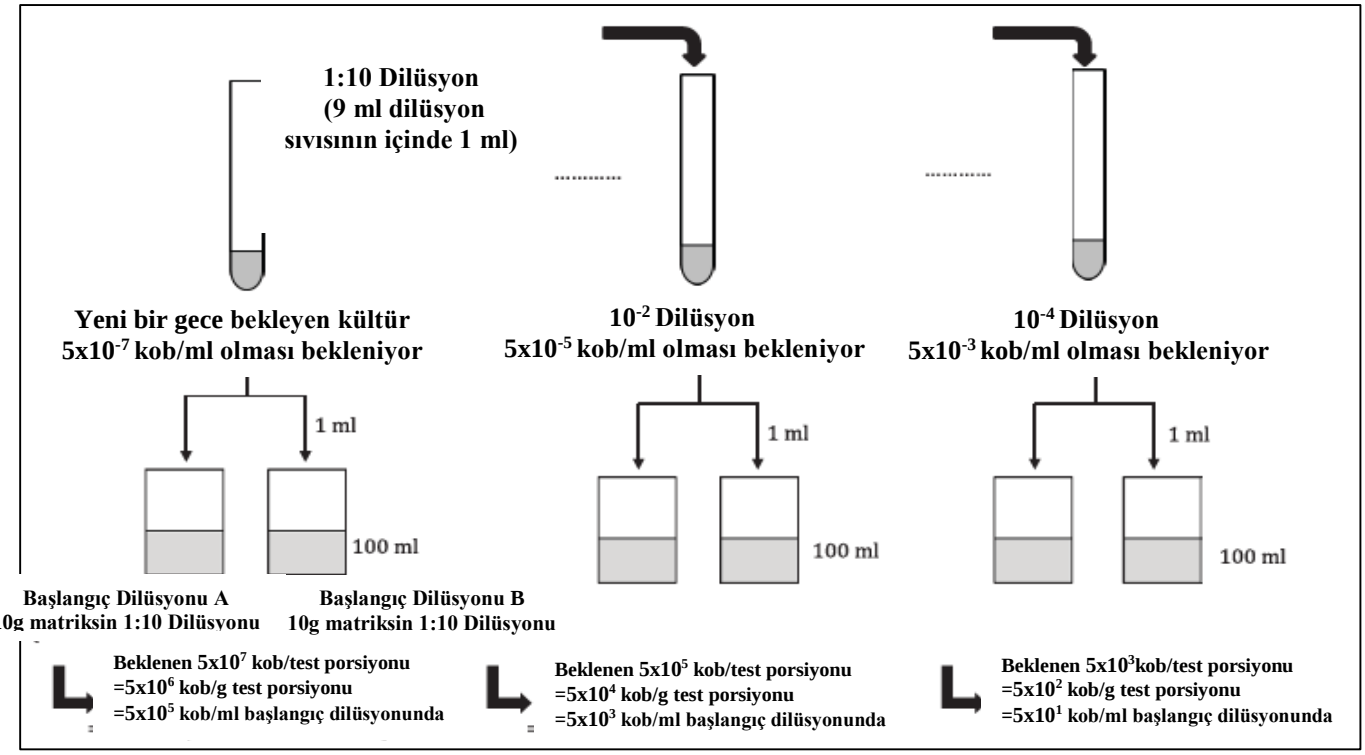
6.2.1. Protokolün Uygulanması

- Gıda matriksi/ matrikslerinin seçimi; laboratuvar, gereken gıda kategorilerinin her birinden en az bir gıda matriksi seçmelidir (Çizelge 3).
- Numune olarak seçilen ilgili matriks, metodun limitlerini kapsayacak şekilde en az üç farklı bulaştırma seviyesinde, iki test porsiyonuna ayrılır ve bunlar başlangıç dilüsyonları olarak inokule edilir.
- Seçilen gıda matriksi için, tercihen her bir aşılama seviyesi için, farklı partiye ait ürün ya da laboratuvar örneği seçilir.
- Her bir aşılama seviyesine ait laborartuvar örneğinden veya ürün partisiden bir tane inokule edilmemiş test porsiyonu arka plan kirliliğini belirlemek için analiz edilir. Bu negatif kontrollerin sonucunun kaydedilmesi kök sebep analizi gerektiğinde faydalı bilgi sağlayacaktır.
- Gıda matrikslerinin bulaştırılmasında kullanılan aşı süspansiyonun (saf kültür) ve bulaştırma yapılmış gıda matrikslerinin bakteri sayımı ilgili metoda göre yapılır.
- Bulaştırma seviyeleri, ilgili analiz metodunun tespit edebildiği limitleri kapsayacak şekilde olmalıdır. Bu doğrultuda, çalışmada kullanılacak örnekleri aşılamak, hedef mikroorganizma kültürlerinin bulaştırma aralığını belirlemek için, taze kültür (16-24 saat) kullanılır. Çalışmada kullanılan hedef mikroorganizmaların taze hazırlanması önemlidir. Seçici olmayan bir besiyerinde suşun kob/ml olarak konsantrasyonu belirlenir ve hedeflenen bulaştırma aralığına göre seyreltme işlemi yapılır (Ek:5).



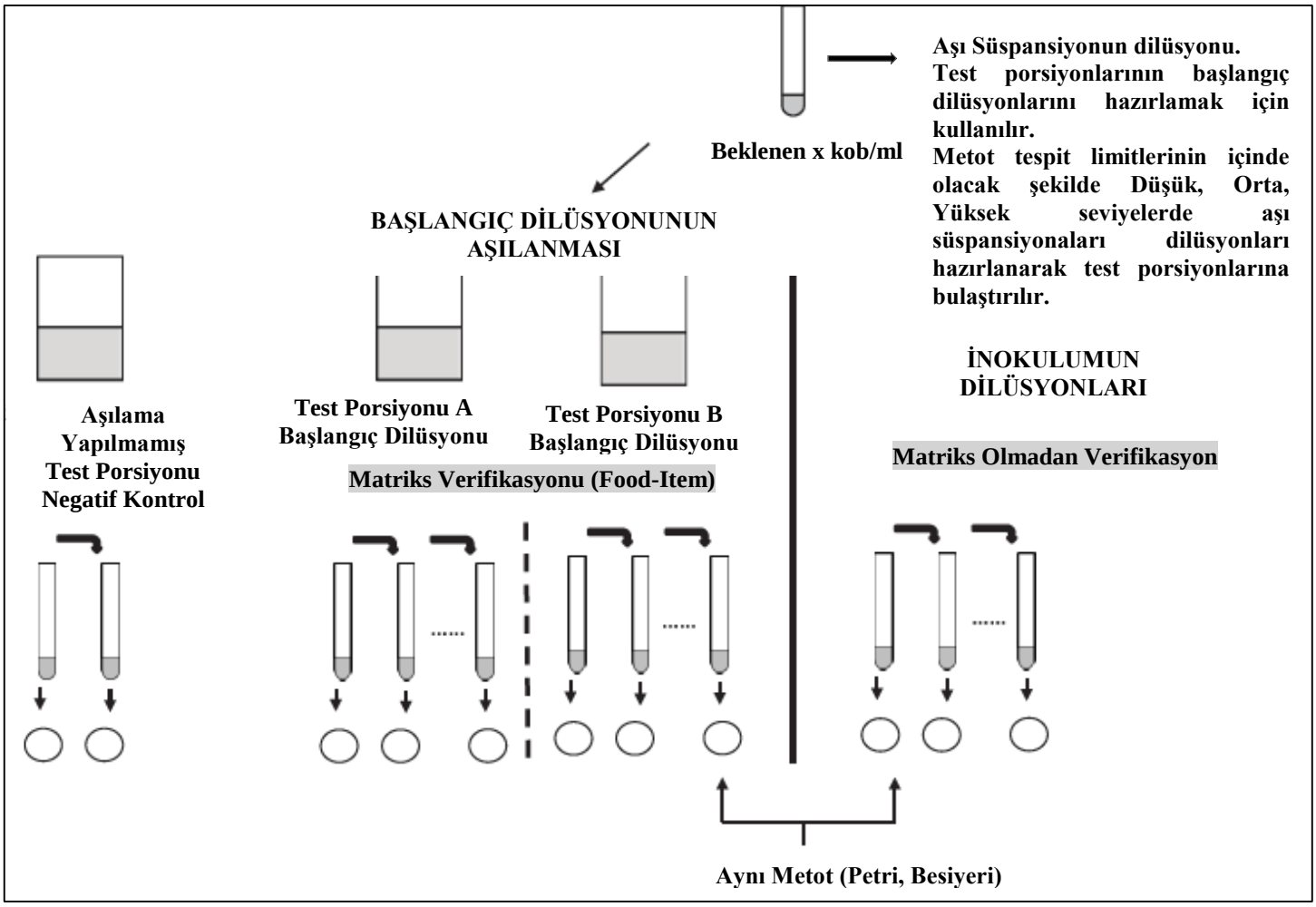
Şekil 2. Kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) için, bir matriksin yapay kirletilmesinde kullanılacak olan aşı süspansiyonun seviyesinin ön belirlenmesi

(ISO 16140-3, Ek:D)



Şekil 3. Kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) için, bir matrikse ait test porsiyonlarının aşılanması

(ISO 16140-3, Ek:D)



Şekil 4. Bir matriks için, yapay kirletme kullanılarak yapılan kantitatif yöntem doğrulaması (eBias) (*ISO 16140-3, Ek:D)

Bir laboratuvar yapacağı çalışmada numunelerde 10^2 – 10^6 kob/g arasında kirlenme beklemektedir. Analizde test porsiyonun 10g ve test porsiyonunun sulandırılmış başlangıç dilüsyonunun 100ml olduğu varsayılmaktadır. Başlangıç dilüsyonunun bulaştırma seviyelerinin 10^1 kob/ml, 10^3 kob/ml ve 10^5 kob/ml olması gerekmektedir. Bunun nedeni başlangıç dilüsyonunun test porsiyonunun onda birlik sulandırması olmasıdır. Böylece test porsiyonunun 10^2 kob/g, 10^4 kob/g ve 10^6 kob/g düzeylerinde bulaştırılması temsil edilmiş olacaktır (Şekil 3).

Gereken mikroorganizmanın gecelik taze kültürü hazırlanır ve önceki ölçümlerden yola çıkılarak 10^7 kob/ml olduğu kabul edilmiştir. İnokulasyon için hedef limitler olan 10^3 kob/ml ve 10^7 kob/ml yoğunluğu kapsayacak şekilde onda birlik dilüsyonları hazırlanmıştır.

Bir test porsiyonu inokule edilmeden kullanılır. Hazırlanan aşı süspansiyonlarından bir'er ml test porsiyonlarının başlangıç dilüsyonlarına aşılanır. Dilüsyonların tahmini kirlilik yoğunlukları sırasıyla 10^1 kob/ml, 10^3 kob/ml ve 10^5 kob/ml (test porsiyonlarında 10^2 kob/g, 10^4 kob/g ve 10^6 kob/g'a karşılık gelmektedir) olacak şekilde ayarlanır. Bu aşamada aşı süspansiyonundaki gerçek mikroorganizma düzeyi bilinmediğinden daha geniş aralıkta fazladan dilüsyonlar da (10^0- 10^6 kob/ml olan başlangıç dilüsyonları) hazırlanmıştır (ISO 16140-3 6.2.4.2), (Şekil 3).

Aşılanmamış test porsiyonunun ve inokule edilmiş başlangıç dilüsyonlarının ilgili analiz metodu kullanılarak sayımları yapılmıştır. Ayrıca gerçek mikroorganizma yoğunluğunu belirlemek için gecelik kültürün ve gecelik kültürün dilüsyonlarının da sayımı yapılmıştır.

Yapılan sayımlar sonunda gecelik kültürün aslında $5x10^8$ kob/ml yoğunluğa sahip olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sebeple başlangıç dilüsyonlarının gerçek yoğunluklarının 10^2 kob/ml ile 10^6 kob/ml arasında değiştiği, test porsiyonlarının ise 10^3 kob/g ve 10^7 kob/g arasında değiştiği anlaşılmıştır.

Fazladan dilüsyonlar kullanıldığından dolayı laboratuvar, test porsiyonlarının 10^2 kob/g, 10^4 kob/g ve 10^6 kob/g (başlangıç dilüsyonları için 10^1 kob/ml, 10^3 kob/ml ve 10^5 kob/ml) düzeyleri ile ilişkili sonuçlarını kullanabilecektir. Elde edilen sonuçlar aşı süspansiyonları ile karşılaştırılacaktır.

6.2.2. Örnek e-BİAS Çalışması

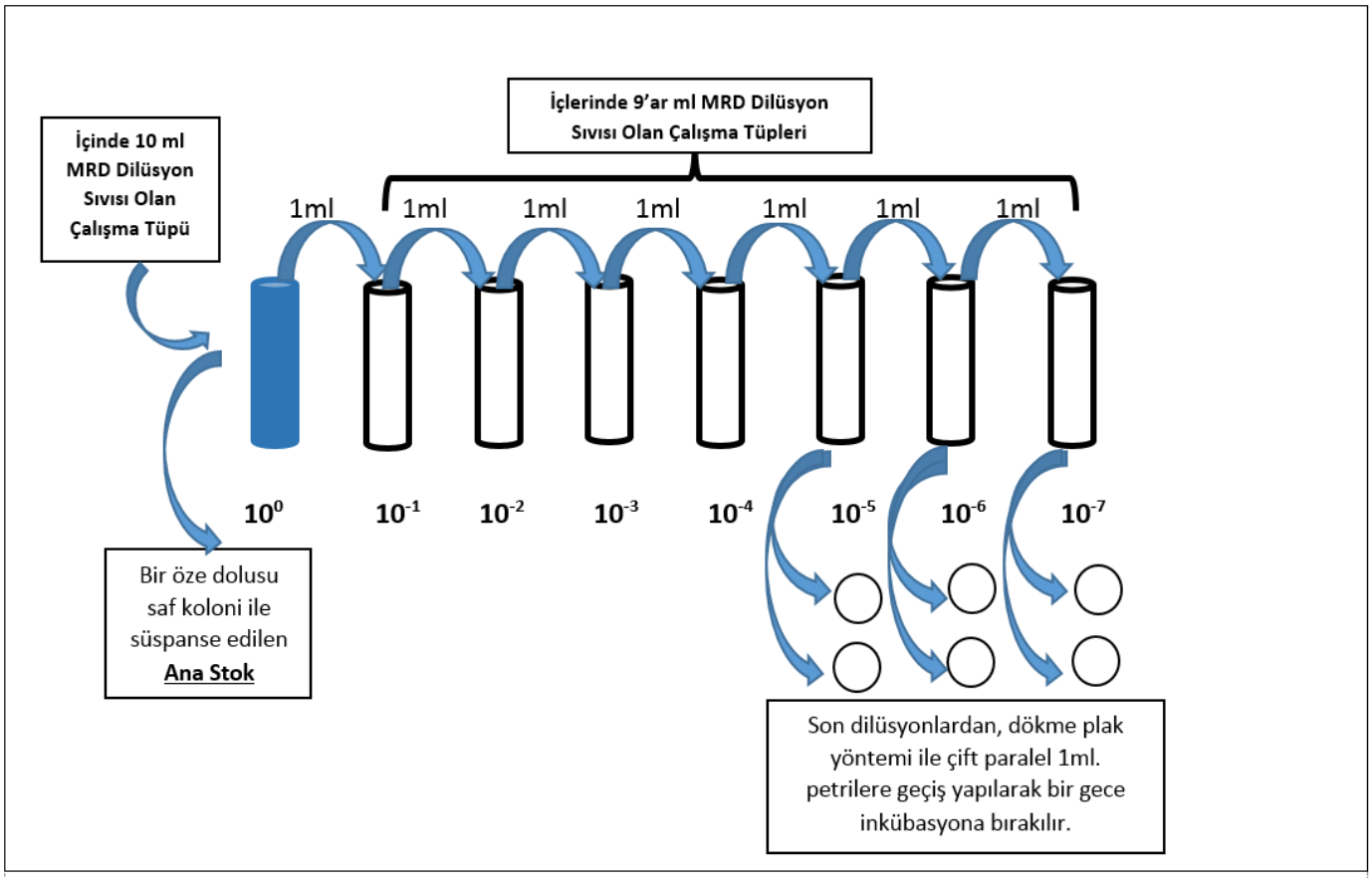
Yukarıda anlatılanlar doğrultusunda, aşağıda verilen görseller ile örnek bir e-BİAS çalışması anlatılmıştır.

a) Bulaştırma Yapılacak Mikroorganizmanın Ana Stok Yükünün Hesaplanması

Laboratuvarda çalışılması planlanan Kantitatif analizin (eğer doğal kirlenmiş örnek yoksa) hem S_{IR}, hemde e-bias çalışması için öncelikle bulaştırma yapılacak mikroorganizmanın, ana stoğunun yükünün belirlenmesi gereklidir.

Bu amaçla "Nutrient Agarda" çoğaltılan saf koloniden bir öze dolusu alınarak (farklı yöntemler tercih edilebilir Bkz. Ek:5), 10 ml MRD broth içerisinde "Ana Stok" olarak süspanse edilir. Buradan ana stoğun 1/9'luk dilüsyonları yaklaşık 10^{-7} seviyesine kadar hazırlanır (Şekil 5).

Dilüsyon sonrası, hazırlanmış olan son dilüsyonlardan, dökme plak yöntemi ile 1ml hacimde genel bir besiyerinin petrilerine geçiş yapılır. Ana stok buzdolabına kaldırılır. Bir gecelik inkübasyondan sonra ekim yapılan petrilerden sayım yapılır.



Şekil 5. Bulaştırma Yapılacak Mikroorganizmanın, Ana Stoğunun Yükünün Belirlenmesi (1. Gün)

Sayım sonucunda **N=C / [V(n1+0,1n2)d]** formülüne göre (ISO 7218) hesaplamalar yapılır ve ana stoğun yükü kob/ml olarak belirlenir.

ISO 7218'e göre Mikroorganizmaların Sayımı İçin Kullanılan Formüldeki Bileşenlerin Tanımı

N= Gıda numunesinin 1g (ml) miktarındaki mikroorganizma sayısı

C= Sayımı yapılan tüm petri kutularındaki koloni sayısı toplamı

V= Sayımı yapılan petri kutularına aktarılan hacim (Dökme plak için 1ml, Yayma plak için 0,1ml)

n1= İlk seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi

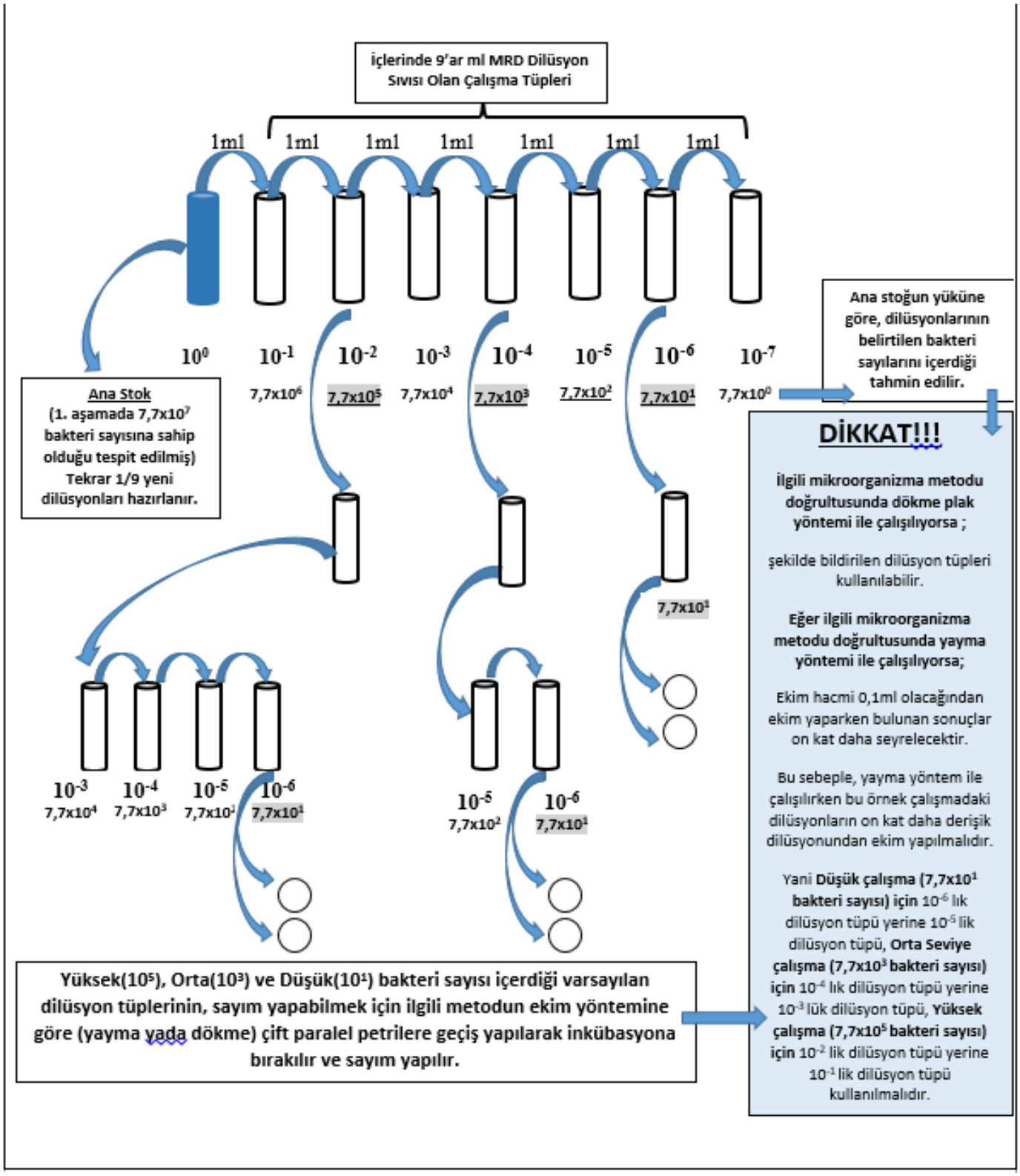
n2= İkinci seyreltiden yapılan sayımlarda sayım yapılan petri kutusu adedi, ağırlıklı aritmetik ortalamasının alınmasından dolayı 0,1 ile çarpılır.

d= Sayımın yapıldığı ardışık iki seyreltiden daha konsantre olanının seyreltme oranıdır.

b) Matriks olmadan Mikroorganizma Sayısının Hesaplanması

Çalışmanın ilk günü bulaştırma yapılacak olan mikroorganizmanın ana stoğunun yükü belirlendikten sonra, ilk olarak ana stoğun tekrar dilüsyonları hazırlanır ve 16140-3'de bildirilen seviyeler doğrultusunda, Yüksek (10^5), Orta (10^3) ve Düşük (10^1) mikroorganizma sayısı içerdiği varsayılan dilüsyon tüplerinden, petrilere geçiş yapılır (Şekil 6).

Sayım sonucunda ilgili mikroorganizmanın ekim yöntemine göre (dökme ya da yayma) **$N= C / [V x (n_1+0,1 x n_2) x d]$** formülü kullanılarak hesaplamalar yapılır. Bununla birlikte, yayma plak çalışılan mikroorganizmalar için, mikroorganizmanın düşük sayıda sayılması gereken durumlarda 1 ml başlangıç solüsyonu kullanılabilir. Bu durumda 1 ml"lik aşılama 3 petri kabına 0,3ml, 0,3ml, 0,4ml (=1ml) olacak şekilde yayılmalı ve **$N=C / (V x n x d)$** formülüne göre hesaplanmalıdır (ISO 7218).



Şekil 6. Bulaştırma Yapılacak Mikroorganizmanın, Ana Stoğunun Yükünün Belirlendikten Sonra ISO 16140-3 Doğrultusunda e-BİAS çalışması için "Yüksek (10^5), Orta(10^3) ve Düşük(10^1)" Bakteri Sayısına Sahip Dilüsyonlarından Ekim Yapılması (Matriks Olmadan) (2. Gün)

c) Matrikse Bulaştırma Yapılması

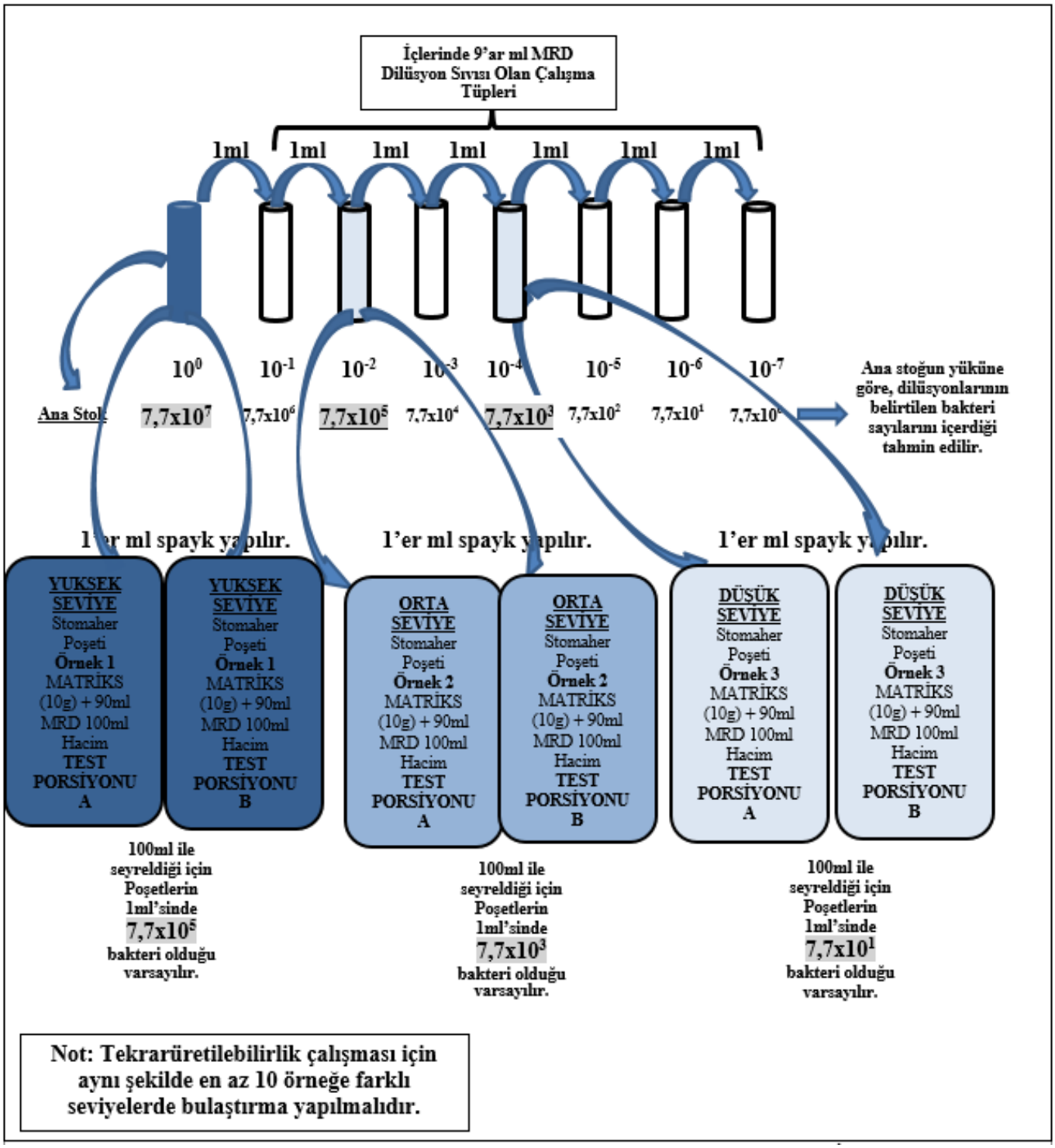
Matriks olmadan mikroorganizma sayım sonuçları elde edildikten sonra, 2. Aşama olan matriks kullanılarak yapılacak sayım sonuçları için örneklerin bulaştırılması aşamasına geçilir.

16140-3 Ek-A'dan seçilen matrikslere yine 16140-3'de bildirilen seviyeler doğrultusunda Yüksek(10^5), Orta(10^3) ve Düşük(10^1) seviyelerinde olacak şekilde bulaştırma yapılır.

E-bias çalışmasında kullanılacak olan her matriks için, farklı lotlar da üç örnek alınır. Her bir örnek A ve B olmak üzere iki test porsiyonuna ayrılır. Örneklerin biri Yüksek(10^5), biri Orta(10^3) ve son örnekte Düşük(10^1) seviyede olacak şekilde, ilgili mikroorganizma ile her örneğin test porsiyonlarına bulaştırma yapılır.

Bu seviyelere göre ana stok ve dilüsyonlarından örneklere nasıl bulaştırma yapılacağı Şekil 7'de gösterilmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta bulaştırma yapılacak olan dilüsyon tüpünün bakteri yükü seçilirken, 100 ml hacimli örneğe bulaştırılacağı düşünülerek, bulaştırma yapılacak dilüsyon tüpünün daha konsantre olan tüpten seçilmesi gerektiğidir. Örneğin yüksek seviyede (10^5) bulaştırma sağlayabilmek için, toplamda 100 ml hacime bulaştırma yapılacağı için, $7{,}7 \times 10^5$ mikroorganizma sayısı içerdiği düşünülen dilüsyon tüpü yerine, $7{,}7 \times 10^7$ mikroorganizma sayısı içerdiği düşünülen dilüsyon tüpünden bulaştırma yapılır.

NOT: Şekil 7'de anlatılan bulaştırma işlemi, e-bias çalışmalarından önce, uygulama verifikasyonu performans kriteri olan S_{IR} 'nın belirlenmesi için, eğer doğal kirlenmiş örnekler bulunamadıysa, aynı bulaştırma prensibi mantığıyla, 10 örneğe bulaşı yapacak şekilde kullanılabilir.

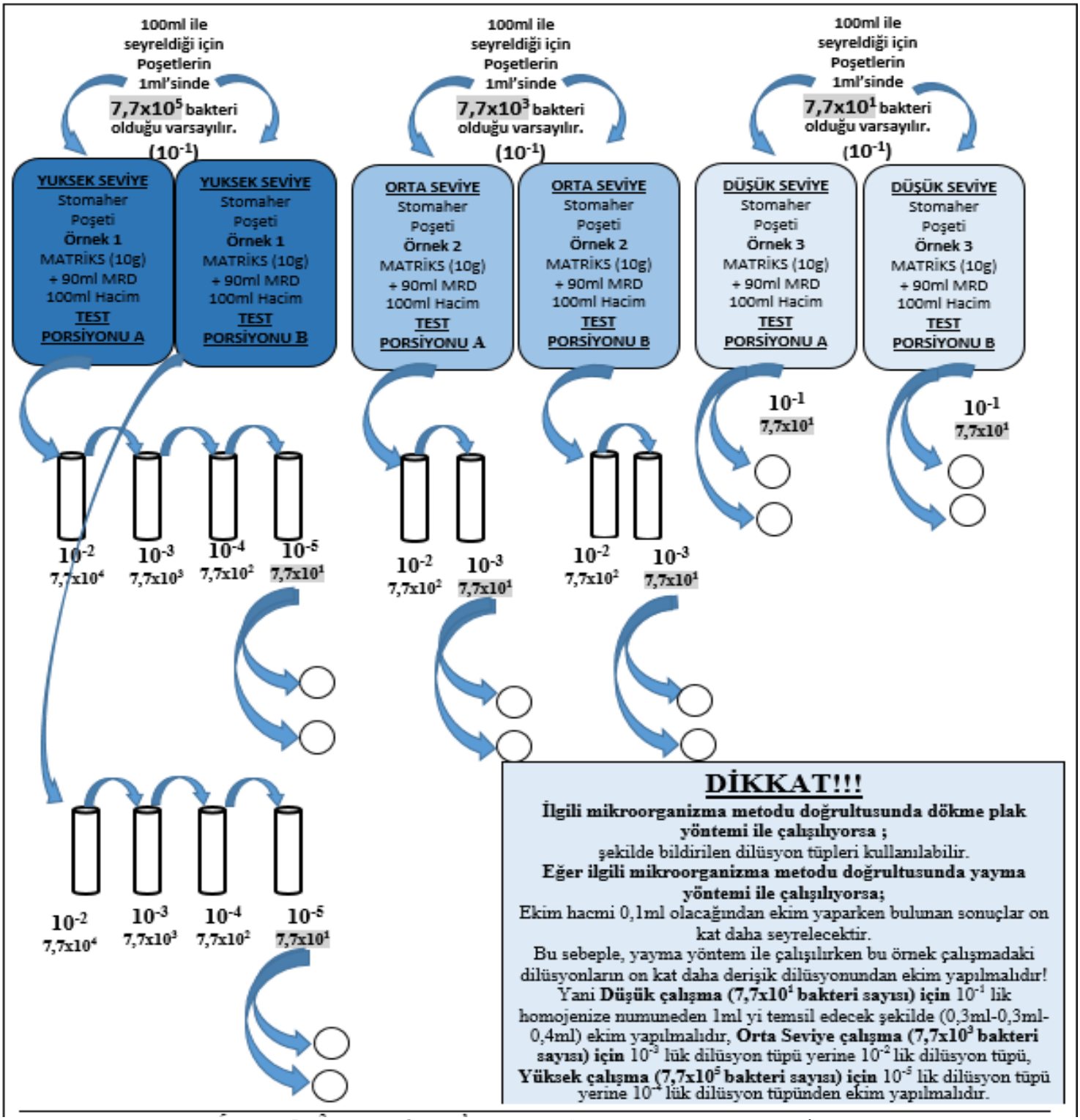


Şekil 7. "Yüksek (10^5), Orta (10^3) ve Düşük (10^1)" olacağı varsayılarak İlgili Dilüsyonlardan, Mikroorganizmaların İlgili Matrikse Bulaştırılması (2.Gün)

d) Bulaştırma Yapılan Matrikste Dilüsyonların Hazırlanması ve Mikroorganizma Sayısının Hesaplanması

İlgili örneklerin Stomaher poşetlerine, Yüksek (10^5), Orta (10^3) ve Düşük (10^1) seviyelerde bulaştırma yapıldıktan sonra (Şekil 7), stomaher poşetlerinin dilüsyonları yapılarak (bakteri yükünün 10^1 seviyesine getirildiği düşünülerek dilüsyon yapılır), sayım için bulaştırma yapılan mikroorganizmanın ekim yöntemi ve besiyerine göre petrilere geçilir (Şekil 8).

Burada dikkat edilmesi gereken nokta, bulaştırma yapılan mikroorganizmanın ekim yöntemidir (dökme ya da yayma). Bulaştırma yapılan mikroorganizma ilgili metoduna göre dökme plak çalışılıyorsa, ekim hacmi 1 ml olacağından, son dilüsyon tüpünden petrilere geçilerek sayım sonucu ilgili formülle hesaplanarak verilebilir. Ancak bulaştırma yapılan mikroorganizma ilgili metoduna göre yayma plak çalışılıyorsa, ekim hacmi 0,1 ml olacağından bulunan sonuçlar on kat seyrelecektir. Bu sebeple son dilüsyon tüpünden petrilere geçmek yerine, son dilüsyon tüpünün on kat derişik halinden petrilere geçiş yapılır. Çıkan sayım sonuçları yine ilgili formülle, ekim hacimleri dikkate alınarak hesaplanır.



Şekil 8. Yüksek (10^5), Orta (10^3) ve Düşük (10^1)" olacağı varsayılarak İlgili Dilüsyonlardan, Mikroorganizmaların İlgili Matrikse Spayklanması (2.Gün)

6.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Aşılanmış gıda matrikslerinden ve aşı süspansiyonlarından elde edilen sonuçlar karşılaştırılır. Bu karşılaştırma için gıda matrikslerine ait sonuçlar $\log_{10}$ kob/test porsiyonu, aşı süspansiyonlarına ait sonuçlar $\log_{10}$ kob/ml olarak verilmelidir. İnokule edilmemiş, negatif kontrol olarak kullanılan test porsiyonuna ait sonuçlar, gıda matriksinin hedeflenen mikroorganizma ile eğer varsa doğal kirlenme seviyesi hakkında bilgi verecektir.

6.2.4. Kabul Edilebilirlik Seviyeleri

Her seviyede, aşılanmış gıda matriksinden gelen sonuç ile aşı süspansiyonun sonucunun mutlak farkının 0,5 $\log_{10}$ değerine eşit veya daha küçük olması gerekmektedir. Aşılanmamış test porsiyonlarından gelen sonuç ise çalışmada herhangi bir olumsuz durumla karşılaşıldığında çözüm için yardımcı olacaktır.

Örnek: Bir laboratuvar valide edilmiş *Enterobacteriaceae* sayımı metodunun eBias doğrulamasını haşlanmış makarnada yapmak istemektedir. Beklenen bulaştırma seviyeleri 10^2 kob/g ve 10^4 kob/g arasındadır. Çalışmaya ait sonuçlar Çizelge 15'te verilmiştir.

Çizelge 15. Örnek Test Sonuçları

Matriks Adı :						
Çalışma Tarihi :						
Çalışma Sayısı :						
Çalışan Personel :						
İnokülasyon Seviyeleri	**Laboratuvar Örnekleri**	**Yapay Kirletme ile Bulaştırılmış Gıda Matriksi, Ortalama Sonucu (1g daki sonuç)** (log_{10} kob /g) [a]	**Karşılaştırma**		**"e-Bias" Aşılama Süspansiyonu ile Yapay Kirletilmiş Gıdanın Sonuçları Arasındaki Farkın Mutlak Değeri**	**Değerlendirme e-Bias ≤ 0,5log$_{10}$**
			Yapay Kirletme ile Bulaştırılmış Gıda Matriksi, Ortalama Sonucu (10g daki sonuç) (log_{10} kob /g) [b]	**Aşılama Süspansiyonu (gıda matriksi olmadan) Bulunan Sonuç** (log_{10} kob /g)		
Düşük Seviye İnokülasyon	1.Parti 1.Test Porsiyonu	**2,06** [a] (log 1.87 ile log 2,25'in ortalaması)	3,06 [b]	3,17	0,11	**0,11 ≤ 0,5 log$_{10}$ UYGUN**
	1.Parti, 2.Test Porsiyonu					
Orta Seviye İnokülasyon	2.Parti 1.Test Porsiyonu	**3,11** [a] (log 3,16 ile log 3,06'nın ortalaması)	4,11 [b]	4,05	0,06	**0,06 ≤ 0,5 log$_{10}$ UYGUN**
	2.Parti, 2.Test Porsiyonu					
Yüksek Seviye İnokülasyon	3.Parti 1.Test Porsiyonu	**3,99** [a] (log 3,93 ile log 4,04'ün ortalaması)	4,99 [b]	5,29	0,30	**0,30 ≤ 0,5 log$_{10}$ UYGUN**
	3.Parti, 2.Test Porsiyonu					

[a] Tabloda verilen örnek çalışma 10 g test porsiyonunun 1 ml aşı süspansiyonu ile bulaştırılmasıyla yapılmıştır. [a] değeri analiz sonucunun 1 g daki sonucudur. **Ortalama test porsiyonunda bulunan sonucun kullanılabilmesi için, aynı seviye test porsiyonları arasındaki <u>fark 0,5 log$_{10}$ dan yüksek olmamalıdır!</u>**

[b] değeri bu test porsiyonunun tamamının yani 10 g daki sonucudur (Analiz sonucunun ortalamasının 10 g karşılığı).

*****ISO 16140-3, Tablo 13

7. EMS (EN MUHTEMEL SAYI) METOTLARI VE DEĞERLENDİRME

ISO 16140-3'de EMS metotları ile ilgili bir çalışma bulunmamakla birlikte, ilgili dökümandan faydalanılarak (matriks seçimi, sayısı ve performans karakteristikleri vb.) Çizelge 16 ve Çizelge 17oluşturulmuştur.

EMS metotlarının verifkasyonu, analizin kalitatif ve kantitatif olmasına göre, ISO 16140-3 doğrultusunda yapılır. Valide edilmiş ve valide edilmemiş, kalitatif ve kantitatif EMS metotlarının verifikasyon çalışması için gerekli performans karekteristikleri sırasıyla Çizelge 16 ve Çizelge17'de verilmiştir.

Çizelge 16. Valide Edilmiş Kalitatif ve Kantitatif EMS Metotlarının Verifikasyon Çalışması İçin Gerekli Performans Karekteristikleri

EMS METOTLARI	PERFORMANS KRİTERLERİ	UYGULAMA VERİFİKASYONU (IMPLEMENTATION VERIFICATION)	MATRİKS VERİFİKASYONU ("FOOD" ITEM VERIFICATION)
Kalitatif EMS Metotları	Tahmini LOD50 ($eLOD_{50}$)	✓	✓
*Kantitatif EMS Metotları	Tekrarüretilebilirlik	✓	Uygulanamaz
	Tahmini Sapma (eBİAS)	Uygulanamaz	✓

*****ISO 16140-3'de kantitatif analizler için anlatılan kabul kriterleri, EMS'nin doğası gereği uygulanamayacağı için Madde 7.2'de anlatılan kabul kriterleri kullanılacaktır.

Çizelge 17. Valide Edilmemiş, Kalitatif ve Kantitatif EMS metotların Verifikasyon Çalışması İçin Gerekli Performans Karekteristikleri

EMS METOTLARI	PERFORMANS KRİTERLERİ	*UYGULAMA VERİFİKASYONU (IMPLEMENTATION VERIFICATION)	MATRİKS VERİFİKASYONU ("FOOD" ITEM VERIFICATION)
Kalitatif EMS Metotları	Tahmini LOD50 ($eLOD_{50}$)	Uygulanamaz	✓
Kantitatif EMS Metotları	Tekrarüretilebilirlik	✓	Uygulanamaz
	Tahmini Sapma (eBİAS)	Uygulanamaz	✓

*Madde 7.2'de anlataılan kabul kriterlerine istinaden, EMS'nin Laboratuvar içi Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması (S_{IR}) hesaplanamayacağı için, ilgili metodun validasyon verilerine ihtiyaç olmayacaktır. Bu sebeple valide olmayan (S_{IR} verisi bulunmayan) metotlarda da uygulama verifikasyonu yapılacaktır.

7.1. Kalitatif EMS Metotları

ISO 16140-3'de EMS metotları ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple, ilgili dokümandan (matriks seçimi, sayısı ve performans karakteristikleri vb.) faydalanılarak, Kalitatif EMS Analizleri Verifikasyon parametreleri belirlenmiş ve Çizelge 16, 17'de gösterilmiştir.

Buna göre, Valide Edilmiş Kalitatif EMS analizlerde hem uygulama hem de matriks verifikasyonunda Tahmini LOD_{50}($eLOD_{50}$) performans kriteri, Valide Edilmemiş Kalitatif EMS analizlerde matriks verifikasyonunda Tahmini LOD_{50}($eLOD_{50}$) performans kriteri gerçekleştirilmelidir. Verifikasyon (uygulama verifikasyonu, matriks verifikasyonu) için çalışılması gerekli matriks ve matriks sayısı, sırasıyla ISO 16140-3 Ek:A ve Çizelge 3 den metodun kapsamına göre seçilebilir.

Kalitatif EMS analizleri verifikasyon çalışmalarında; seçilen protokole göre $eLOD_{50}$'nin tespiti, sonuçların değerlendirilmesi, Rehberin 5. maddesine göre gerçekleştirilmelidir.

Not: Tahmini Tespit Seviyesi-$eLOD_{50}$ belirlenirken, aşı süspansiyonunun kontaminasyon seviyesini belirlemek için alternatif olarak, EMS yaklaşımı kullanılabilir. (ISO 16140-3 Ek-C.7, C.8, Tablo C.1)

7.2. Kantitatif EMS Metotları

ISO 16140-3'de EMS metotları ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple, ilgili dokümandan (matriks seçimi, sayısı ve performans karakteristikleri vb.) faydalanılarak, Kantitatif EMS Analizleri Verifikasyon parametreleri belirlenmiş ve Çizelge 16, 17'de gösterilmiştir. Buna göre, uygulama verifikasyon parametresi tekrarüretilebilirlik, analizin "Kesinliğini" yansıtırken, matriks verifikasyonu parametresi eBİAS ise, analizin "Doğruluğunu" göstermektedir.

Kantitatif EMS Verifikasyon çalışmaları ISO 16140-3 doğrultusunda yapılmakla birlikte, ISO 16140-3'de kantitatif analizler için anlatılan kabul kriterleri, EMS'nin doğası gereği uygulanamamaktadır. Bu sebeple kantitatif EMS metotları uygulama verifikasyonu için, Madde 6.1.3. de anlatılan Kabul Edilebilirlik Limitleri kullanılamayacaktır. Diğer bir ifadeyle, Laboratuvar içi Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması (S_{IR}) hesaplanmayacak olup, bunun yerine, Tekrarüretilebilirlik çalışmasına katılan iki personelin çalışma sonuçlarının birine ait %95 güven aralığı limit değerleri kullanılarak, diğer personelin sonuçlarının değerlendirmesi yapılacaktır. Bu doğrultuda, kabul kriterinin (S_{IR}) olmaması sebebiyle, Kantitatif EMS metodunun valide olup olmadığına bakılmaksızın analizin uygulama verifikasyonları yapılacaktır (Örnek 1).

Kantitatif EMS metotları matriks verifikasyonu için ise, aynı şekilde Madde 6.2.4. de anlatılan kabul edilebilirlik seviyeleri (e-Bias $\leq 0{,}5\log_{10}$) kullanılamayacak olup, bunun yerine e-

bias çalışmasında kullanılan aşı süspansiyonunun ilgili mikroorganizma sayım sonucuna ait %95 güven aralığı limit değerleri kullanılarak, yapay kirletme ile bulaştırılmış gıda matrikslerinden elde edilen EMS sonuçlarının değerlendirilmesi yapılacaktır (Örnek 2).

Örnek 1. Kantitatif EMS Metodu Uygulama Verifikasyonu / Tekrarüretilebilirlik Çalışması

Analizin doğası gereği, %95 Güven Aralığında sonuçların verilmesi sebebiyle, Düşük, Orta, Yüksek olmak üzere, her seviyeden, her çalışmada 2 personelin katılımı ile (her çalışmada, laboratuvarın personel sayısına göre mümkün olduğunca farklı iki personel çalıştırılmalıdır) en az 10 Tekrarüretilebilirlik çalışması yapılır. Bununla birlikte çalışmalardan Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması (S_{IR}) hesaplanmaz, Uygunluk değerlendirmesi için,

a) Çalışılan seviye için, her bir örnekten birinci personelin elde ettiği EMS sonuçları ve bu sonuçlara karşılık gelen karşılık gelen %95 güven aralığı alt-üst limit değerleri belirlenir (Bu limit değerlere ISO 7218 Standardında yer alan tablolardan ya da **http://standards.iso.org/iso/7218/** adresinde yer alan Excel programından ulaşılabilir).

b) Aynı çalışma seviyesindeki her bir örnek için İkinci personelin çalışmalardan elde ettiği EMS sonuçlarının, birinci personelin o örnek için elde ettiği EMS sonucuna ait %95 güven aralığı alt-üst limit değerleri arasında olması beklenir, 10 çalışma sonucu bu değerler arasında ise yapılan çalışmalar uygundur. Bu kriter her seviyede yapılacak olan çalışmalar için geçerlidir.

Çizelge 18. Kantitatif EMS Metodu Uygulama Verifikasyonu / Tekrarüretilebilirlik Çalışması (Düşük, Orta, Yüksek Seviyelerde)

Lab. Örnek Numarası/ (Çalışma Sayısı)	1.Personel Adı	1.Personel Sonucu (EMS/g)	1.Personel Sonuca ait %95 Güven Aralığı Alt-Üst Limit Değerleri (EMS/g)	2.Personel Adı	2.Personel Sonucu (EMS/g)	Değerlendirme
1	--	7,5	1,9-30	--	4,3	4,3 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
2	--	9,3	2,2-40	--	7,5	7,5 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
3	--	2,1	0,71-6,2	--	1,5	1,5 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
4	--	4,3	0,95-19,0	--	7,5	7,5 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
5	--	46	9,6-220	--	24	24 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
6	--	24	5,6-100	--	15	15 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
7	--	22	7,2-64	--	46	46 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
8	--	15	4,4-51	--	24	24 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
9	--	1100	250-4900	--	460	460 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
10	--	460	96-2200	--	1100	1100 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.

Örnek 2. <u>Kantitatif EMS Metodu Matriks Verifikasyonu / E-Bias Çalışması</u>

Çizelge 3 doğrultusunda seçilen kapsama göre matriks sayısı belirlenir. Her matriks için personel/ler, 3 farklı seviyede (Düşük, Orta, Yüksek), olmak üzere Madde 6.2'de anlatıldığı gibi 2 test porsiyonuna ayrılmış, her biri farklı seviyede aşılama yapılan 3 örnek ile birlikte Aşı süspansiyonundaki mikroorganizma sayısını tespit etmek için EMS metodu ile çalışır. Uygunluk değerlendirmesi için,

a) Her seviye için inokülasyon süspansiyonunun EMS sonucu ve bu sonuca karşılık gelen %95 güven aralığı alt-üst limit değerleri belirlenir (Bu limit değerlere ISO 7218 Standardında yer alan tablolardan ya da **http://standards.iso.org/iso/7218/** adresinden ulaşılabilir)

b) Her seviyeden yapay kontaminasyon ile kirletilmiş gıda matriksleri çalışılarak EMS sonuçları elde edilir.

c) Yapay kontaminasyon ile kirletilmiş gıda matrikslerinden elde edilen EMS sonuçlarının, o seviye için belirlenen inokulum sonucunun EMS sonuca karşılık gelen %95 güven aralığı alt-üst limit değerleri içerisinde olması istenir, tüm sonuçlar bu değerler arasında ise yapılan çalışmalar uygundur.

Çizelge 19. Kantitatif EMS Metodu Matriks Verifikasyonu / E-Bias Çalışması

Matriks Adı :					
Çalışma Tarihi :					
Çalışma Sayısı :					
Çalışan Personel/ler :					
İnokülasyon Seviyeleri	**Laboratuvar Örnekleri**	**Yapay Kirletme ile Bulaştırılmış Gıda Matriksi, (EMS/g)**	****Aşılama Süspansiyonu (gıda matriksi olmadan) Bulunan Sonuç (EMS/g)**	**İnokülasyon Süspansiyonu Sonuca ait %95 Güven Aralığı Alt-Üst Limit Değerleri (Gıda matriksi olmadan) (EMS/g)**	***Değerlendirme e-Bias**
Düşük Seviye İnokülasyon	1.Parti 1.Test Porsiyonu	**7,5**	9,3	**Alt Limit: 2,2** **Üst Limit: 40**	7,5 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
	1.Parti, 2.Test Porsiyonu	**4,3**			4,3 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
Orta Seviye İnokülasyon	2.Parti 1.Test Porsiyonu	**24**	46	**Alt Limit: 9,6** **Üst Limit: 220**	24 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
	2.Parti, 2.Test Porsiyonu	**15**			15 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
Yüksek Seviye İnokülasyon	3.Parti 1.Test Porsiyonu	**1100**	1100	**Alt Limit: 250** **Üst Limit: 4900**	1100 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.
	3.Parti, 2.Test Porsiyonu	**460**			460 sonucu %95 Güven Aralığında olduğundan Uygundur.

* Yapay kontaminasyon ile kirletilmiş gıda matrikslerinden elde edilen EMS sonuçları, o seviye için belirlenen inokulum sonucunun EMS sonuca karşılık gelen %95 güven aralığı alt-üst limit değerleri içerisinde ise yapılan çalışmalar uygundur.

** İnokulasyon süspansiyonu ile yapay kirletme ile bulaştırılmış gıda matriksinin (10 g örnek+90 ml seyreltme sıvısı) sonuçlarının karşılaştırılabilmesi için inokülasyon süspansiyonunun 1/100 oranında seyreltilmesi gerekmektedir, bunun için **inokülasyon süspansiyonunun 2.dilüsyonu analiz edilmeli ve elde edilen EMS sonucu tabloya işlenmelidir.**

8. YÜZEY KONTROL/SWAB ANALİZLERİ

Yüzey analizleri, gıda işletmeleri ya da laboratuvarlarda hijyen kontrollerini sağlamak, yüzeylerin mikroorganizma ile kontamine olup olmadığı ve/veya kirlilik düzeyinin tespiti için çalışılmaktadır. Yüzey analizlerinde, genelde pamuğa sarılı çubuk ya da sünger ile hazırlanan swab kullanılır. Örnekler gıda ile temas eden her madde ve malzemeden alınabilir.

Yüzey analizleri aranacak bakteri grubuna göre kalitatif ve kantitatif olmak üzere 2 grupta gerçekleştirilmelidir. Bu nedenle doğrulama işlemi her iki grup için ayrı ayrı olacak şekilde ISO 16140-3 doğrultusunda yapılır. Kantitatif analizlerde örnek almada belirli bir alan kullanıldıysa, petrideki üremelerin sayısı bu alana göre hesaplanmalı ve sonuçta bu alana göre verilmelidir.

Swap ile yapılan örneklemede swaplanan yüzey belirlenmiş ise aşağıdaki formül kullanılmaktadır (ISO 18593).

$$N_s = \frac{NxF}{A} \text{ x } D$$

N: 1 ml seyreltme sıvısı/nötralizanlı sıvıda kob sayısı (kob/cm2 ya da kob/yüzey)

F: ml cinsinden tüp veya homojenleştirici torbanın içindeki seyreltme sıvısının (veya nötrleştirici sıvının) miktarı(ml)

D: Kullanılan dilüsyon faktörü (Örn.,10^8)

A: Örneklenmiş yüzey (örn.cm^2)

Sonuç kob/cm^2 olarak tanımlanır. Swabın alındığı yüzey tanımlı olmadığında/yüzey ölçülemez olduğunda A=1 olarak değerlendirilir ve sonuç kob/yüzey olarak tanımlanır.

Kalitatif analizlerde ise alan ölçüsüne göre nitel sonuç verilir (Tespit Edilemedi /50 cm^2 ya da Tespit Edilemedi/yüzey)



Yüzeyden alınacak örnekler için **swap** yada **contact plate** kullanılarak, rutin analiz işlemleri gerçekleştirilir. Doğrulama çalışmasında kullanılacak swaplar ve contact plate'ler, laboratuvarda steril olarak hazırlanabileceği gibi ticari olarak da temin edilebilir Ancak ticari olarak satılan için swap yada contact plate'lerin geçerli kılma verileri satıcı firmadan mutlaka istenmelidir. Swaplarda kullanılan dilüsyon sıvısının nötralizanlı olması önemlidir.

Bu çalışmalar planlanırken yüzeylerinde besiyeri bulunan hazır petriler “Contact plate“ ile çalışma yapıldığında bu kitlerin çoğunun, belirtildiği gibi AOAC ve ya AFNOR onaylarının olmadığı bilinmeli, satıcı firmadan bu kitlerin geçerli kılma verileri istenmelidir.



Kirletme yapılan yüzeyden örnek alınması için yüzeyin kuru olması gerekmektedir. Bu nedenle kirletme yapılan yüzeyin oda sıcaklığında (20°C -25°C) 16-24 saat bekletilerek kurutulması ve sonrasında örnek alma işleminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Kirletilecek yüzeyler; paslanmaz çelik, plastik, (Polietilen, polipropilen, polikarbonat, seramik, cam) gibi pürüzsüz yüzeyler olması tavsiye edilir.

Aynı anda birden fazla hedef mikroorganizmayı tespit etmesi amaçlanırsa, kirletme çalışmasında hedef mikroorganizmaların aynı yüzeye aşılanması ve doğrulama çalışmasının aynı anda yapılması tasarlanabilir.

Doğrulama işleminde yapılacak işlemler aşağıda tanımlanmıştır;

- Kullanılacak alan boyutlarının belirlenmesi ve mümkünse belirlenmiş boyutlar için çerçeve hazırlanması (örn. 10cm x 10 cm)
- Kullanılacak referans kültürlerin Ek-5 Mikroorganizma ile Numunelerin Aşılanması Talimatı’na göre hazırlanması,
- Kontrol edilecek yüzey alanının hedeflenen mikroorganizma seviyesine göre yüzeye eşit olarak kirletilme işlemi uygulanması;
- Belirlenen yüzeyden nötralizanlı aparatlar (örn. swab ile) ile örneklerin toplanması için aranan analiz parametresine göre rutin işlemlerin gerçekleştirilmesi

Yüzey analizlerinin doğrulama çalışmaları yapılan analiz yöntemine göre; (kalitatif, kantitatif) ISO 16140-3 doğrultusunda yapılır.

9. MİKROSKOBİK ANALİZLER

9.1. Mikroskobik Sayım Analizleri

Mikroskobik sayım analizlerinde (Örn.,somatik hücre sayımı) CRM ile yapılan çalışmalarda en az iki personel tarafından en az 6 tekrarlı olacak şekilde üç farklı seviyede tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirilik çalışmalar gerçekleştirilir. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmalarında aynı yöntem kullanılarak elde edilen iki bağımsız analiz sonucu arasındaki mutlak

fark %5'i geçmemelidir (TS EN ISO 13366-1/AC 2010).

9.2. Mikroskobik Saha (Alan) Analizleri

Mikroskobik saha (alan) analizlerinde (Örn., howard lamı ile küf sayımı) en az farklı (marka, lot vb.) 6 numune en az iki personel tarafından her numune için en az 2 tekrarlı olacak şekilde tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirilik çalışmalar gerçekleştirilir. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmalarında aynı yöntem kullanılarak elde edilen iki bağımsız analiz sonucu arasındaki mutlak fark %5'i geçmemelidir (TS EN ISO 13366-1/AC 2010).

10. ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ

Ölçüm belirsizliği kısa tanımlaması ile ölçüm sonuçlarının dağılımının ifadesidir ve yapılan ölçümün hangi değerler arasında yer alacağını, güven aralığını gösterir. Yapılan hiçbir ölçümün mükemmel olması beklenemez.

ISO 17025 standardında deney faaliyetleri gerçekleştiren bir laboratuvarın, ölçüm belirsizliğini değerlendirmesi gerektiği ifade edilmiştir. Bu doğrultuda laboratuvarlar ölçüm belirsizliğinin kaynaklarını belirlemelidir. Ölçüm belirsizliğini değerlendirirken numune almadan kaynaklananlar da dâhil, önemi bulunan tüm etmenler uygun analiz yöntemleri kullanılarak hesaba katılmalıdır.

Ancak mikrobiyolojik deneyler genellikle, ölçme belirsizliğinin, metrolojik olarak ve istatistiksel açıdan geçerli hesaplanmasını engelleyen kategoriye girmektedir. Bunun ana nedeni, ürün matrisi içinde organizmaların dağılımından kaynaklanan belirsizliğin, lâboratuvarın performansının bir fonksiyonu olmayıp deneyden geçirilmekte olan numuneye özgü bir durum olmasıdır. Bu sebeple, müşteri tarafından talep edilmedikçe, bu belirsizlik bileşeninin, tahmine dâhil edilmesi tavsiye edilmemektedir (ISO/IEC Guide 98-3:2008, Eurachem Guide - Accreditation for Microbiological Laboratories, TS 13134).

Bununla birlikte, akredite olmuş mikrobiyoloji deney lâboratuvarları, analiz metodunun uygulanmasına yönelik teorik ilkelerin ve pratik tecrübenin anlaşılmasına dayalı bir tahminde bulunmalıdır (ISO 17025). Belirsizlik hesaplamalarında bireysel bileşenlerinin kontrol altında olduğu ve değerlendirilen sonuçlarının değişkenliğine katkıları tanımlanmalı ve kanıtlanmalıdır (TS 13134). **Bu doğrultuda, iç kalite kontrol amaçlı yapılan ara kontroller ile de ölçüm belirsizliğinin korunduğunun kontrolünün sağlanması son derece önemlidir.**

Sonuçlara ait ölçüm belirsizliklerinin oluşturulduğu ve doğrulandığı belirli bir yöntem için, tanımlanmış kritik etki unsurlarının kontrol altında olduğu gösterildiği takdirde, her bir sonuç için ölçüm belirsizliğinin değerlendirilmesine gerek yoktur (ISO 17025).

Belirsizlik kavramı, tanımlama amacıyla yapılan niteliklerin tayinine veya tayin amaçlı deneylerde kalitatif deney sonuçlarına doğrudan uygulanamaz (TS 13134).

Kantitatif analizler için, ISO 19036'ye göre ölçüm belirsizliği 3 ana bileşen doğrultusunda hesaplanır.

1. Teknik standart belirsizliği;
2. Matriks standart belirsizliği
3. Dağılım standart belirsizliği'dir.

Buna göre, laboratuvar ölçüm belirsizliğini belirlemede iki seçeneğe sahiptir;

Birincisi; ISO 19036' da bildirilen ölçüm belirsizliğinin 3 ana bileşeni (teknik standart belirsizliği, matriks standart belirsizliği ve dağılım standart belirsizliği), ayrı ayrı hesaplanır. Elde edilen veriler doğrultusunda ölçüm belirsizliği hesaplanır.

İkincisi; **Sadece laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapması (SIR) hesaplamasını ölçüm belirsizliği olarak kullanabilir.** ISO 16140-3 de bildirilen, kantitatif analizlerde valide edilmiş metotlar için yapılan uygulama doğrulamasından elde edilen, Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapması (SIR), ISO 19036 5.2.2'de belirtilen üç ana belirsizlik bileşeninden biri olan teknik belirsizliğin tespit edilmesini sağlar.

10.1. Teknik Belirsizlik - Laboratuvar İçi Deneylerden Elde Edilen Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması "S_{IR}" İle Ölçüm Belirsizliğinin Hesaplanması

ISO 16140-3 de bildirilen, kantitatif analizlerde valide edilmiş metotlar için yapılan uygulama doğrulamasından elde edilen, Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapması (SIR), ya da laboratuvariçi, iç kalite kontrol amaçlı yapılan ara kontrollerdeki tekrarüretilebilirlik çalışmalarından elde edilen tekrarüretilebilirlik standart sapması "S_{IR}" bu doğrultuda kullanılabilir. Buna ilaveten metot validasyonu için yapılan "Laboratuvarlar Arası Karşılaştırma" ya da "Laboratuvarlar Arası Yeterlilik Testleri"nin tekrarüretilebilirlik standart sapması da bu doğrultuda kullanılabilir.

Tekrarüretilebilirlik çalışmaları için, analiz içindeki belirsizlik bileşenlerinin etkilerini değerlendirebilmek amacıyla, madde 6.1.1'de anlatıldığı şekilde, A ve B koşulları oluşturulmalıdır. A koşulunda kullanılan tüm faktörlerin B koşulunda kullanılmadığı yine B koşulundaki tüm faktörlerin ise A koşulunda kullanılmadığı ortamlarda analizler gerçekleştirilmelidir. (örn; farklı analistler ile farklı parti besiyerinin kullanımı, test porsiyonlarına farklı suşların aşılanması, farklı inkübatörlerde inkübasyonun yapılması, farklı otomatik pipet kullanımı ve farklı hacim ölçerler gibi analizin her basamağında olası muhtemel değişkenliklerin sağlanması, vb). Bununla birlikte belirsizliğe sebep olabilecek fazla sayıda şartlar varsa, bu durumda yukarıda bahsedilen koşul sayıları artırılabilir (Örn; analizde kullanılabilen 3 adet 30°C inkübatörün varlığı gibi). Bu durumda

3 koşul için A, B, C ya da 4 koşul için A, B, C, D gibi koşullar gruplandırılarak sınıflandırılır.

İki koşul varlığındaki ölçüm belirsizliği çalışmalarında Çizelge 20, koşulların arttırılması durumunda ise Çizelge 21 örnek olarak alınabilir (ISO 19036 Ek A)

Laboratuvar içi deneylerden elde edilen tekrarüretilebilirlik standart sapması "S_{IR}" nın hesaplanabilmesi için öncelikle her testin sonucu kob/g ve kob/ml çevrilerek, $\log_{10}$ olarak hesaplanmalıdır.

Eğer Çizelge 20'da verildiği gibi iki koşul oluşturularak S_{IR} hesaplanmak isteniyorsa, aşağıdaki formül kullanılabilir.

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

S_{IR} = Laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması

i = Laboratuvar örneğinin sıra numarası

n = Örneklerin sayısı

y_{iA}, y_{iB} = Farklı koşullarda çalışılan örneklerden kob/g veya kob/ml olarak elde edilen sonuçların $\log_{10}$ olarak çevrilmiş hali

Eğer Çizelge 21'de verildiği gibi ikiden fazla koşul oluşturularak S_{IR} hesaplanmak isteniyorsa, aşağıdaki formül kullanılabilir.

$$s_{IR} \text{ or } s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p_i}\left(y_{ij}-\bar{y}_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n}(p_i-1)}}$$

S_{IR} = Laboratuvariçi tekrarüretilebilirlik standart sapması

i = Laboratuvar numunesinin indeksidir. (i = 1, 2, …, n)

j = örnek i içindeki test kısmının değerinin indeksidir (j = 1, 2, …, p_i);

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{p_i} y_{ij}}{p_i}$$

$y_{ij} = \log_{10} x_{ij}$.

n = Örneklerin sayısı

SD = Serbestlik Derecesi (n_i-1)

y_i = Farklı koşullarda çalışılan örneklerden kob/g veya kob/ml olarak elde edilen sonuçların $\log_{10}$ olarak çevrilmiş hali

Matris belirsizliği değerlendirilirken ortaya çıkabilen tek bir örnek için, n = 1, bu $\log_{10}$ dönüştürülmüş verisinin standart sapmasıdır. Çizelge 21'de (ISO 19036 Tablo A.1), Çizelge 20'ye benzer bir veri seti üzerinde elle hesaplamayı gösterir. Hesaplamalar, (seyreltme faktörleri (d) için gösterilen değerler ve sayılan koloniler (C) örnek verilmiştir) Excel 'de yapılmıştır. Değerler yuvarlanmıştır.

Çizelge 20. Örnek Test Sonuçları Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapmasının Hesaplanması
(Karışık kanatlı etinde aerobik mezofilik floranın sayımı, her ikisinde birer tekrar ile seyreltmeler test edildi)

Laboratuvar Örneği	**Test porsiyonu**	**Dilüsyon faktörü (d) Koloni Sayısı (C)**				**Toplam Koloni Sayısı**	**Koloni Sayım Sonuçlarının Ağırlıklı Ortalaması cfu/g yada cfu/ml (ISO 7218)**	**$\log_{10}$ kob/g ya da $\log_{10}$ kob/ml**	**Fark $\log_{10}$ kob**	**Farkın Karesi**
i	***j***	d_1	C_1	d_2	C_2	ΣC_{ij}	X_{ij}	$y_{ij} = \log_{10}(X_{ij})$	$y_{iA} - y_{iB}$	$(y_{iA} - y_{iB})^2$
1	A	3	102	4	8	110	$1{,}0 \times 10^5$	5,0000	0,2421	0,0586
1	B	3	59	4	4	63	$5{,}7 \times 10^4$	4,7579		
2	A	5	61	6	6	67	$6{,}1 \times 10^6$	6,7847	-0,0432	0,0019
2	B	5	66	6	8	74	$6{,}7 \times 10^6$	6,8278		
3	A	4	168	5	18	186	$1{,}7 \times 10^6$	6,2281	0,3010	0,0906
3	B	4	86	5	7	93	$8{,}5 \times 10^5$	5,9271		
4	A	5	266	6	25	291	$2{,}6 \times 10^7$	7,4225	0,2708	0,0733
4	B	5	140	6	16	156	$1{,}4 \times 10^7$	7,1517		
5	A	6	45	7	5	50	$4{,}5 \times 10^7$	7,6576	0,5406	0,2923
5	B	5	129	6	15	144	$1{,}3 \times 10^7$	7,1170		
6	A	4	129	5	12	141	$1{,}3 \times 10^6$	6,1078	0,0454	0,0021
6	B	4	117	5	10	127	$1{,}2 \times 10^6$	6,0624		
7	A	2	92	3	8	100	$9{,}1 \times 10^3$	3,9586	-0,1584	0,0251
7	B	2	131	3	13	144	$1{,}3 \times 10^4$	4,1170		
8	A	3	139	4	13	152	$1{,}4 \times 10^5$	5,1405	-0,0168	0,0003
8	B	3	143	4	15	158	$1{,}4 \times 10^5$	5,1573		
9	A	1	49	2	5	54	$4{,}9 \times 10^2$	2,6910	-0,4199	0,1763
9	B	1	129	2	13	142	$1{,}3 \times 10^3$	3,1109		
10	A	4	142	5	13	155	$1{,}41 \times 10^6$	6,1489	0,7872	0,6197
10	B	3	227	4	26	253	$2{,}3 \times 10^5$	5,3617		
									Toplam =	1,3401
									1,3401 / (2x10) =	0,0670
									$s_{IR} = \sqrt{0{,}0670} =$	0,2589

x_{ij}, test kısımlarında hesaplanan koloni sayılarıdır. Örnek; $x_{1B} = 10^{d1} \frac{\Sigma C_{1B}}{1,1} = 10^3 \frac{63}{1,1} = 10^3 \times 57{,}3 = 5{,}73 \times 10^4$

*ISO 19036, Tablo 1

Çizelge 21. Örnek Test Sonuçları Laboratuvar İçi Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapmasının Hesaplanması
(Her laboratuvar numunesinden ikiden fazla değerin, genel durumunun hesaplaması)

Laboratuvar Örneği	**Test porsiyonu**	**Dilüsyon faktörü (d) Koloni Sayısı (C)**				**Toplam Koloni Sayısı**	**Koloni Sayım Sonuçlarının Ağırlıklı Ortalaması cfu/g yada cfu/ml (ISO 7218)**	**$\log_{10}$ kob/g ya da $\log_{10}$ kob/ml**	**Ortalama Sayı $\log_{10}$**	**Ortalamalardan farkların karesi $\log_{10}$ kob**	**Serbestlik Dercesi**
i	***j***	d_1	C_1	d_2	C_2	ΣC_{ij}	X_{ij}	$y_{ij} = \log_{10}(X_{ij})$			(n_i-1)
1	A	3	102	4	8	110	$1{,}00\times10^{5}$	5,0000		0,002 70	
1	B	3	59	4	4	63	$5{,}73\times10^{4}$	4,7579	5,0520	0,086 44	2
1	C	3	248	4	27	275	$2{,}50\times10^{5}$	5,3979		0,119 70	
2	A	5	61	6	6	67	$6{,}09\times10^{6}$	6,7847	6,8063	0,000 47	1
2	B	5	66	6	8	74	$6{,}73\times10^{6}$	6,8278		0,000 47	
3	A	4	168	5	18	186	$1{,}69\times10^{6}$	6,2281		0,011 88	
3	B	4	86	5	7	93	$8{,}45\times10^{5}$	5,9271	6,1191	0,036 88	3
3	C	4	95	5	12	107	$9{,}73\times10^{5}$	5,9880		0,017 20	
3	D	4	216	5	21	237	$2{,}15\times10^{6}$	6,3334		0,045 89	
4	A	5	266	6	25	291	$2{,}65\times10^{7}$	7,4225	7,2871	0,018 33	1
4	B	5	140	6	16	156	$1{,}42\times10^{7}$	7,1517		0,018 33	
5	A	6	45	7	5	50	$4{,}55\times10^{7}$	7,6576	7,3873	0,073 06	1
5	B	5	129	6	15	144	$1{,}31\times10^{7}$	7,1170		0,073 06	
6	A	4	129	5	12	141	$1{,}28\times10^{6}$	6,1078	6,0851	0,000 52	1
6	B	4	117	5	10	127	$1{,}15\times10^{6}$	6,0624		0,000 52	
7	A	2	92	3	8	100	$9{,}09\times10^{3}$	3,9586		0,015 48	
7	B	2	131	3	13	144	$1{,}31\times10^{4}$	4,1170	4,0830	0,001 15	2
7	C	2	149	3	15	164	$1{,}49\times10^{4}$	4,1735		0,008 18	
8	A	3	139	4	13	152	$1{,}38\times10^{5}$	5,1405	5,1489	0,000 07	1
8	B	3	143	4	15	158	$1{,}44\times10^{5}$	5,1573		0,000 07	
9	A	1	49	2	5	54	$4{,}91\times10^{2}$	2,6910		0,084 20	
9	B	1	129	2	13	142	$1{,}29\times10^{3}$	3,1109	2,9812	0,016 83	3
9	C	1	88	2	7	95	$8{,}64\times10^{2}$	2,9363		0,002 01	
9	D	1	151	2	18	169	$1{,}54\times10^{3}$	3,1865		0,042 15	
10	A	4	142	5	13	155	$1{,}41\times10^{6}$	6,1489	5,7553	0,154 93	1
10	B	3	227	4	26	253	$2{,}33\times10^{5}$	5,3617		0,154 93	
									Toplam =	0,985 44	
									0,985 44/16 =	0,061 59	16
									s_{IR} = √0,061 59 =	0,248 17	

*ISO 19036, Tablo A1

Manuel hesaplamaya bir alternatif olarak, Standart sapma, grup içi ortalama karenin karekökü olduğunda, tek yönlü ANOVA ile standart sapma hesaplanabilir.

Örneğin, yukarıdaki y_{ij} verileri üzerinden Excel'de tek faktörlü ANOVA, grup içi ortalama kare değerinin 0,06159 olduğu bu sonucu verir, bu durumda:

$$s_{IR} = \sqrt{0,061\,59} = 0,248\,17$$

Tek yönlü varyans analizine sahip ANOVA kullanarak, birden fazla numune üzerinde analitik sonuçlar için laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik standart sapma hesaplamaları görseli aşağıda yer almaktadır.

Anova: Single factor

SUMMARY

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Row 1	3	15,155 89	5,051 963	0,104 423
Row 2	2	13,612 52	6,806 261	0,000 931
Row 3	4	24,476 56	6,119 139	0,037 283
Row 4	2	14,574 23	7,287 116	0,036 658
Row 5	2	14,774 55	7,387 274	0,146 128
Row 6	2	12,170 24	6,085 119	0,001 031
Row 7	3	12,249 03	4,083 009	0,012 404
Row 8	2	10,297 72	5,148 858	0,000 141
Row 9	4	11,924 72	2,981 18	0,048 398
Row 10	2	11,510 67	5,755 333	0,309 851

ANOVA

Source of variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between groups	51,327 08	9	5,703 009	92,596 53	4,36102E-12	2,537 667
Within groups	0,985 438	16	**0,061 59**			
Total	52,312 52	25				

Key

SS: sum of squares, df: degrees of freedom, MS: mean of squares, F: F-distribution variable, P-value: significance level, F-crit: critical value of F-distribution variable

10.2. Matriks Belirsizliği

Bir test sonucu hem matriks hem de mikrobiyel dağılımdan etkilenebilir. Matris belirsizliği, laboratuvar numunesinin kusurlu karıştırılmasından kaynaklanır, bu da katı matrisler ve özellikle kompozit gıda ürünleri için büyük olabilen test bölümleri arasındaki mikrobiyal seviyelerin zayıf tekrarlanabilirliği ile sonuçlanır. Matris belirsizliği, her bir matris türü için tahmin edilir. ISO 19036'ya göre "matris belirsizliği" terimi, yalnızca belirli bir matristeki mikrobiyal dağılımın etkilerini ifade eder. Diğer bir ifadeyle aynı laboratuvar örneğinin farklı test porsiyonlarından elde edilen sonuçlar arasındaki, farklılığı gösterir. Matriks belirsizliği, analitik yöntemden bağımsız olarak kabul edilir.

Matriks belirsizliği için üç ayrı yaklaşım tanımlanmıştır.

1- Sabit değer kullanımı: İyi karışmış homojen laboratuvar örnekleri için (örn; sıvılar) matriks belirsizliğinin küçük olması beklenir. Sabit (minumum) bir değer kullanılabilir.

$\boldsymbol{U_{matrix}}$**=0,1 log$_{10}$ kob/g ya da ml**

NOT: Test kısmı alınmadan önce laboratuvar numunesinin tamamının homojen hale getirilmesi şartıyla, matris belirsizliği $\boldsymbol{U_{matrix}}$**=0,1 log$_{10}$ kob/g yada ml** alınabilir.

2- Laboratuvar (veya test) örneklerinin çoklu test porsiyonlarının analizinden elde edilen örnek içi varyanstan belirlenebilir. Matriks belirsizliği bir veya daha çok Laboratuvar örneğinden tekrarlanabilirlik koşulları altında çoklu test porsiyonlarının analizi ile elde edilen çalışmanın, laboratuvar içi örnek standart sapması olarak tahmin edilebilir. Yapay kirletmenin, gerçek matris belirsizliğini yansıtma olasılığı düşük olduğundan, doğal olarak kirlenmiş numuneler kullanılmalıdır. Matris belirsizliği, ölçülen büyüklükten ve kullanılan test yönteminden bağımsız olarak kabul edildiğinden, doğal olarak kirlenmiş numunelerin bulunması muhtemel olan ölçülen büyüklükler seçilmelidir. Toplam mezofilik aerobik, *Enterobacteriaceae* veya termofilik spor oluşturan mikroorganizmaların tümü, matriks belirsizliği çalışması için uygun olabilir.

Her bir laboratuvar örneğinden en az iki test porsiyonu alınmalı ve test porsiyonlarının toplam sayısı labortauvar örneklerinin sayısından on fazla olmalıdır. Bunun için,

- 10 Laboratuvar örneğinin her birinden 2 test porsiyonu alınır ya da,
- 1 Laboratuvar örneğinin her birinden 11 test porsiyonu alınır.
- Tekrarlanabilirlik standart sapması 19036 Ek A.1, Çizelge 17'ye göre hesaplanabilir. Basit bir şekilde Matris belirsizliğini değerlendirirken tek bir

örnek için (n = 1), $\log_{10}$ dönüştürülmüş verilerin tekrarlanabilirlik standart sapması hesaplanır.

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p_i}\left(y_{ij} - \bar{y}_i\right)^2}{\sum_{i=1}^{n}(p_i - 1)}} \qquad \bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{p_i} y_{ij}}{p_i}$$

S_r = Laboratuvariçi tekraredilebilirlik standart sapması

i = Laboratuvar örneğinin sıra numarası ($i=1,2,....p_i$)

j = i numunesi içindeki test porsiyonunun değerinin indeksi ($j=1,2,....p_i$)

yij =Çalışılan örneklerden kob/g veya kob/ml olarak elde edilen sonuçların $\log_{10}$ olarak çevrilmiş hali.

3- Matriksin ve yöntemin ilgili özelliklerinin iyi bilindiği durumlarda, matriks belirsizliği önceki bilgilerden tahmin edilebilir. Laboratuvar numunelerinin benzer bir matris belirsizliğine sahip olup olmadığı, ISO 16140-3, Ek A3' de tanımlanan farklı kategoriler tablosu ile değerlendirilmelidir. Bununla birlikte, bir laboratuvarda elde edilen matriks belirsizlik değerleri, benzer bir matriks belirsizliğine sahip olması beklenen numuneler için başka bir laboratuvar tarafından kullanılabilir.

10.3. Dağılım (Poisson) Belirsizliği

Homojen materyaller için bile, test materyalinin içindeki mikroorganizmaların rastgele dağılımından dolayı, ortaya indirgenemez bir belirsizlik bileşeni çıkmaktadır ve bu genellikle poisson dağılımı ile modellenir.

Analiz metodunun özelliğine göre dağılımsal belirsizlik ISO 19036 madde 7.2 ve 7.4'e göre hesaplanır.

10.3.1. Koloni Sayımı Tekniği - Poisson Belirsizliği

Sonucun hesaplanmasında kullanılan koloni sayımı tekniğine dayalı yöntemler için, toplam sayılan koloni sayısının, minimum dağılım belirsizliğine katkısı mevcuttur.

Poisson Standart belirsizliği aşağıdaki gibi hesaplanır.

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

Örneğin eğer ΣC = 100 ise

$$u_{\text{Poisson}} = \frac{0{,}4343}{\sqrt{100}} = \frac{0{,}4343}{10} = 0{,}043\,43.$$

olacaktır.

Büyük ΣC değerleri için, diğer belirsizlik bileşenleri büyükse Poisson belirsizlik bileşeni ihmal edilebilir.

10.3.2. Koloni Sayım Tekniği- Doğrulama Belirsizliği

Doğrulama testleri; uygun yöntemler kullanılarak hedef organizma olarak onaylanan seçili sayıda koloninin oranını tahmin ederek varsayımsal sayımı düzeltmek için kullanılır. Kolonilerin eşit olarak dağıldığı kabul edilir ve binom dağılımı, tek bir sonuca özgü dağılım belirsizliğini hesaplamak için kullanılır.

Varsayımsal kolonilerin, np'nin test edildiğini ve birkaçının doğrulandığı varsayılır ise, nc, göreceli başarı sayısı nc/np, varsayımsal sayımı onaylanmış sayıma dönüştürmek için çarpan olarak kullanılır. Bu, varsayımsal sayıma dayalı olarak log10 cfu/g veya ml değerine bir log10 nc/np düzeltmesi ekleme etkisine sahiptir. Doğrulama belirsizliği aşağıdaki Formülle hesaplanır;

$$u_{\text{conf}} = \frac{1}{2{,}303}\sqrt{\frac{(n_c + 0{,}5)(n_p - n_c + 0{,}5)n_p^2}{(n_p + 1)^2(n_p + 2)n_c^2}}$$

10.4. En Muhtemel Sayı (EMS) için Belirsizlik (Most Probable Number - MPN)

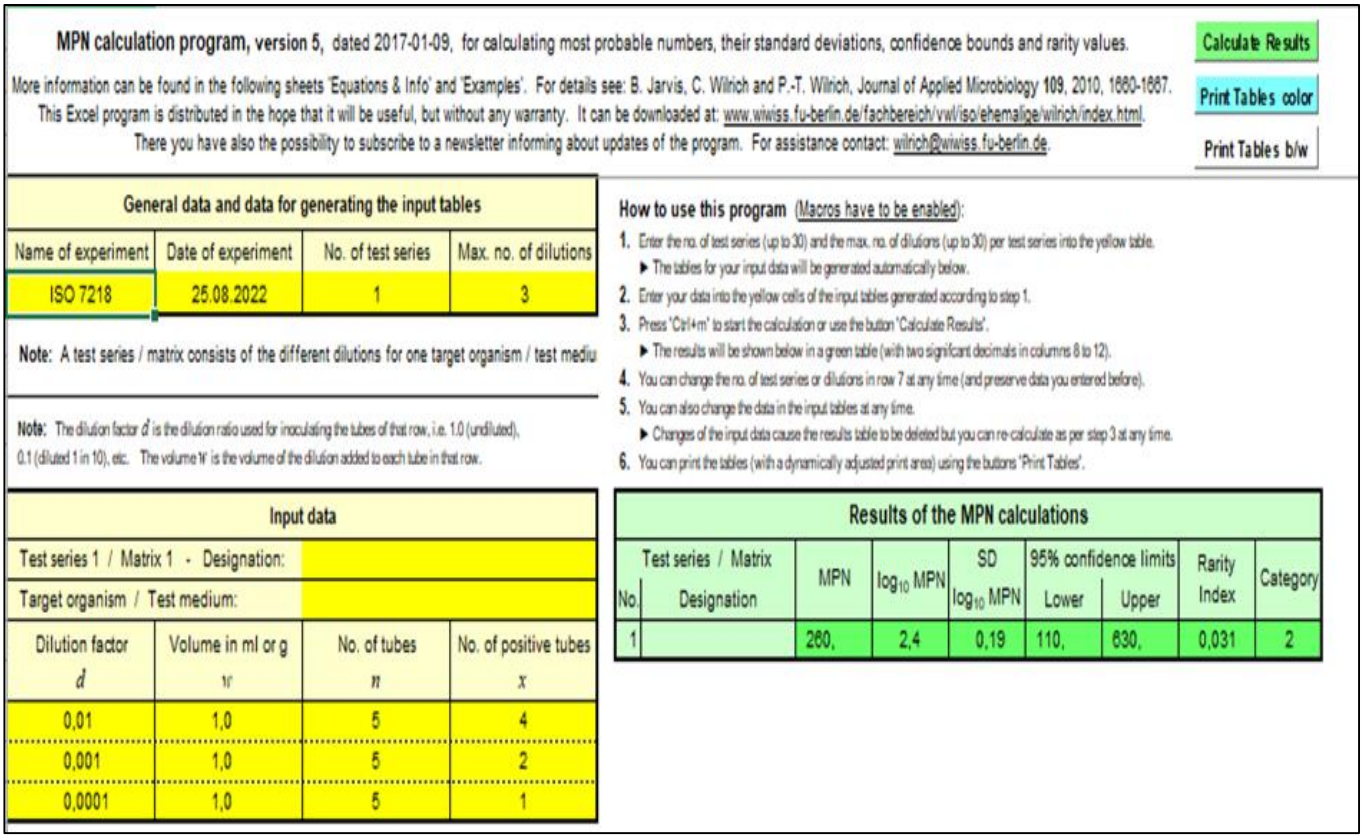
En Muhtemel Sayı (EMS) metotlarında belirsizlik hesaplamaları, ISO 7218 standardının, 10.5.6.3. maddesinin **http://standards.iso.org/iso/7218/** linkinde yer alan "***MPN calculation Excel programm_ver5.xls"*** Excel dosyası programına göre gerçekleştirilir. Elde edilen veriler ISO 7218 standardı Çizelge 5-6-7'de belirtilen %95 güven aralığı sınırları içinde olacak şekilde değerlendirilir.

Laboratuvarın gerek görmesi durumunda, ilgili linkteki excel dosyasında yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen **SD $\log_{10}$ MPN (EMS) değeri** ölçüm belirsizliği için kullanılabilir.

SD $\log_{10}$ MPN Değerinin Hesaplanması İçin Örnek Çalışma;

- ✓ 5'li tüp yöntemi ile, 10^{-2}, 10^{-3} ve 10^{-4} üç dilüsyon seviyelerinin her birine 1 ml numune aşılanmıştır. İnkübasyon sonrasında her dilüsyondaki pozitif kültür sayısı sırasıyla 4, 2 ve 1 olarak belirlenmiştir.

✓ Değerler, ISO 7218 standardı, **http://standards.iso.org/iso/7218/** adresinde ki Excel tablosuna işlenmiş, MPN 260/ml; $\log_{10}$MPN = 2,42; SD $\log_{10}$MPN = standart sapma = 0,19 $\log_{10}$ MPN olarak hesaplanmış olup, görseli aşağıda yer almaktadır.



MPN calculation program, version 5, dated 2017-01-09, for calculating most probable numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values.

Calculate Results | Print Tables color | Print Tables b/w

More information can be found in the following sheets 'Equations & Info' and 'Examples'. For details see: B. Jarvis, C. Wilrich and P.-T. Wilrich, Journal of Applied Microbiology 109, 2010, 1660-1667.
This Excel program is distributed in the hope that it will be useful, but without any warranty. It can be downloaded at: www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html.
There you have also the possibility to subscribe to a newsletter informing about updates of the program. For assistance contact: wilrich@wiwiss.fu-berlin.de.

General data and data for generating the input tables

Name of experiment	Date of experiment	No. of test series	Max. no. of dilutions
ISO 7218	25.08.2022	1	3

Note: A test series / matrix consists of the different dilutions for one target organism / test mediu

Note: The dilution factor *d* is the dilution ratio used for inoculating the tubes of that row, i.e. 1.0 (undiluted), 0.1 (diluted 1 in 10), etc. The volume *w* is the volume of the dilution added to each tube in that row.

How to use this program (Macros have to be enabled):

1. Enter the no. of test series (up to 30) and the max. no. of dilutions (up to 30) per test series into the yellow table.
   ▶ The tables for your input data will be generated automatically below.
2. Enter your data into the yellow cells of the input tables generated according to step 1.
3. Press 'Ctrl+m' to start the calculation or use the button 'Calculate Results'.
   ▶ The results will be shown below in a green table (with two significant decimals in columns 8 to 12).
4. You can change the no. of test series or dilutions in row 7 at any time (and preserve data you entered before).
5. You can also change the data in the input tables at any time.
   ▶ Changes of the input data cause the results table to be deleted but you can re-calculate as per step 3 at any time.
6. You can print the tables (with a dynamically adjusted print area) using the buttons 'Print Tables'.

Input data

Test series 1 / Matrix 1 - Designation:

Target organism / Test medium:

Dilution factor *d*	Volume in ml or g *w*	No. of tubes *n*	No. of positive tubes *x*
0,01	1,0	5	4
0,001	1,0	5	2
0,0001	1,0	5	1

Results of the MPN calculations

Test series / Matrix No.	Designation	MPN	$\log_{10}$ MPN	SD $\log_{10}$ MPN	95% confidence limits Lower	Upper	Rarity Index	Category
1		260,	2,4	0,19	110,	630,	0,031	2

10.5. Raporlarda Ölçüm Belirsizliğinin Belirtilmesi

Raporlamada ölçüm belirsizliği (UM) müşteri isterse belirtilir.

✓ Analiz raporlarında tahmini ölçüm belirsizliğinin belirtilmesi gerektiğinde; belirtilen ölçüm belirsizliğinin genişletilmiş bir belirsizlik olduğu ile birlikte güven aralığı ve tahmininin ISO 19036 standardına dayanarak yapıldığı açıkça ifade edilmelidir.

Örnek olarak:

"Raporlanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği ISO 19036 standardına dayanılarak tahmin edilmiştir ve % 95 güven aralığında, standart belirsizlik çarpanı k = 2 alınarak hesaplanmıştır"

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

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

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

kullanılan belirsizlik bileşenlerine bağlı yukarıdaki formüller doğrultusunda hesaplanır.

✓ Eğer ölçüm belirsizliği olarak, sadece tekrarüretilebilirlik standart sapması baz alındıysa, bu durum raporda açıkça ifade edilmelidir.

Örnek olarak:

"Raporlanan genişletilmiş ölçüm belirsizliği ISO 19036 standardına dayanılarak tahmin edilmiştir ve % 95 güven aralığında, standart belirsizlik çarpanı k = 2 alınarak hesaplanmıştır. Kombine standart belirsizlik laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapmasına eşit olarak alınmıştır."

Bu doğrultuda Ölçüm belirsizliği (U) ;

$U = k \times S_{IR} = 2 \times S_{IR}$ formülü kullanılarak hesaplanır ve metodun içinde bildirilen tekrarüretilebilirlik verisi ile karşılaştırılır.

Tekrarüretilebilirlik verisi bulunmayan standart metotların ölçüm belirsizliği için, metodun matriks verifikasyonu (food ıtem verification) e-bias çalışmalarında kullanılan matriksler için tekrarüretilebilirlik çalışmaları yapılabilir. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapması en yüksek olan değer, ölçüm belirsizliği olarak kullanılabilir.

✓ Raporlamada ölçüm belirsizliğine yer verilmesi gerektiğinde kullanılan yöntem açıkça belirtmelidir. Ölçüm belirsizliği test sonucu ile aynı birimde olmalıdır.

Örnek olarak;

$S_R = 0{,}15\ (\log_{10})$ kob/g

$U = 0{,}3\ (\log_{10})$ kob/g

Analiz sonucu = 5,0 ($\log_{10}$) bulunan bir örnekte, raporlama aşağıda verilen şekillerde yapılabilir.

- 5,0 log ± 0,3 log
- 5,0 log [4.7, 5,3]
- 10^5 kob/g [5.10^4, 2.10^5]

11. VALİDE EDİLMİŞ ALTERNATİF DOĞRULAMA VE TİPLENDİRME METOTLARI, VERİFİKASYONU İÇİN TEKNİK PROTOKOL

Analiz metotları için kaynak oluşturan her analize özgü ISO standartlarında, izolasyon sonrasında doğrulama için gerekli en temel testler belirtilmiştir. Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle yeni analiz metotları ortaya çıkmaktadır. Validasyonu yapılmış olan bu yeni analiz metotlarının doğrulama için Laboratuvarda kullanılması durumunda verifikasyon yapılmalıdır.

Valide edilmiş alternatif doğrulama ve tiplendirme metotlarının verifikasyonu için, sadece implementation verification (Uygulama verifikasyon çalışması) gereklidir. Numune tanımlanmış seçici ya da seçici olmayan besiyerinden izole edilmiş bir kolonidir.

11.1. Uygulama Verifikasyon Çalışması (Implementation Verification)

Uygulama verifikasyon çalışması (Implementation Verification), kullanıcı laboratuvarın valide edilmiş alternatif doğrulama veya tiplendirme yöntemini gerçekleştirme yeteneğini göstermektedir. Bu belirli seçici ya da seçici olmayan besiyerlerinde izole edilmiş bir koloni için beklenen sonuçları elde etme yeteneğiyle belirlenir.

Kullanıcı laboratuvar aşağıda belirtilenleri yapmalıdır:

- Metoda ait validasyon verilerini gözden geçirmelidir (validasyon verisine alternatif metodun validasyon raporundan ulaşılabilir).
- Validasyon çalışmasında denenmiş, eğer mümkünse laboratuvar kapsamında yer alan, bir seçici besiyeri tercih edilmelidir.
- Bu seçici besiyeri uygulama verifikasyon çalışması (Implementation Verification) için kullanılmalıdır. Eğer seçici bir besiyeri kullanılmamışsa, uygulama verifikasyon çalışması (Implementation Verification) için, validasyon çalışmasında denenmiş seçici olmayan besiyeri kullanılmalıdır.

11.2. Deney Dizaynı

11.2.1. Suş sayısı

Valide edilmiş alternatif doğrulama yada tiplendirme metotlarının, uygulama verifikasyon çalışması (implementation verification) için, test edilecek suş sayıları Çizelge 22'de verilmiştir.

Çizelge 22. Valide Edilmiş Alternatif Doğrulama ya da Tiplendirme Metotlarının, İmplementation Verification (Uygulama Verifikasyon Çalışması) İçin, Test Edilecek Suş Sayıları

Doğrulama Seviyesi	Metot Kapsamında Yer Alan Hedef Mikroorganizmalarla Yapılan Çalışmalar için	Metot Kapsamında Yer Almayan Hedef Olmayan Mikroorganizmalarla Yapılan Çalışmalar için
Aile	5	5
Cins		
Tür		
Mikrobiyal alt tip (örneğin *Salmonella* serotiplendirmesi)		

11.2.2. Suş Seçimi

Verifikasyon çalışmasında kullanılacak olan suşlar;

1. Kültür koleksiyonlarından,
2. Kullanıcı laboratuvar koleksiyonundan,

3. Referans materyallerden (ticari referans materyaller dahildir, örneğin dondurarak kurutulmuş suşlar) seçilebilir.

Test suşları seçilirken, çoğunlukla labortuvarın uygulama kapsamındaki gıda kategorilerinden köken almalıdır ve identifikasyon özelliklerindeki çeşitliliğe göre hedef analitin belirlenmiş aralığını kapsamalıdır. Örneğin; biyokimyasal, serotip, faj tipi, coğrafi dağılım ve insidens (ISO 16140-2:2016, Annex E)

Uygulama verifikasyon çalışması (Implementation Verification) için; metot kapsamında yer alan beş hedef suş ve metot kapsamında yer almayan beş tane de hedef olmayan suş seçilir.

Suş seçiminde validasyon çalışmasında denenmiş suşlar baz alınabilir. Metot kapsamında yer almayan hedef olmayan suşlardan en az biri, hedef mikroorganizmayla ilgili olmalıdır (Örneğin; L. monocytogenes valide edilmiş alternatif doğrulama metodu için, L. innocua seçilmelidir).

11.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Uygulama verifikasyon çalışması (Implementation Verification) yapılacak olan, valide edilmiş alternatif doğrulama veya tiplendirme metoduna göre, hedef ve hedef olmayan mikroorganizmalardan seçilmiş suşlar analiz edilir.

Bu çalışmalara ait sonuçlar tablo haline getirilir (Çizelge 23). Uygulama verifikasyon çalışması (Implementation Verification) yapılan, valide edilmiş alternatif doğrulama veya tiplendirme metoduna ait sonuçlar ile beklenen doğrulama veya tiplendirme sonuçları arasındaki uyum veya sapmalar rapor edilir.

Çizelge 23. Uygulama Verifikasyon Çalışması (Implementation Verification) Yapılan, Valide Edilmiş Alternatif Doğrulama Veya Tiplendirme Metoduna Ait Sonuç Değerlendirme Tablosu

Test edilen suş	Metot kapsamında yer alan **hedef suş** / Metot kapsamında yer almayan **hedef olmayan** suş isimleri	Suş özellikleri	Beklenen doğrulama/tiplendirme sonucu	Verifiye edilen metoda ait sonuç	Değerlendirme
1					
2					
…					
9					
10					

11.4. Kabul Edilebilirlik Limiti

Verifiye edilen doğrulama veya tiplendirme metoduna ait sonuçlar, beklenen sonuçlar ile aynı olmalıdır. Bu yüzden sonuçlarda %100 uyum olmalıdır.

11.5. Alternatif Doğrulama Metodu Verifikasyonu İçin Örnek Çalışma 1

Bir laboratuvar ISO 11290'da belirtilen şekilde *Listeria monocytogenes* izolasyonu ve doğrulaması yapmaktadır. Ottaviani ve Agosti'ye uygun besiyerinde izole edildikten sonra, doğrulama için L-rhamnose ve D-xylose fermentasyon testleri ile hemoliz testi temel gereksinimidir. Valide edilmiş alternatif doğrulama testi olarak ticari bir PCR test kiti ile izole edilen koloniler analize alınmaktadır.

Hedeflenen *Listeria monocytogenes* için 5 çeşit suş seçilir.

Hedef olmayan 5 suş seçilirken, bunlardan en az biri *Listeria innocua* suşu olmalıdır. Alternatif doğrulama veya tiplendirme metodu kapsamında seçilmiş hedef ve hedef olmayan mikroorganizmalar söz konusu metoda gore analiz edilerek, uygulama verifikasyon çalışması (Implementation Verification) yapılır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 24'te verilmiştir.

Çizelge 24. Uygulama Verifikasyon Çalışması (Implementation Verification) Yapılan, Valide Edilmiş Alternatif Doğrulama veya Tiplendirme Metoduna Ait Sonuç Değerlendirme Tablosu

Test edilen suşlar	Metot kapsamında yer alan hedef suş (Dahililik) / Metot kapsamında yer almayan hedef olmayan suş (Haricilik)	Suş Özellikleri	Beklenen Doğrulama Sonucu	Verifiye Edilen Metoda Ait Sonuç	Değerlendirme
1	Dahililik Çalışması	***L. monocytogenes*** (serotip 4b) WDCM 00021 İnsan izolatı	+	+	Uygun
2	Dahililik Çalışması	***L. monocytogenes*** (serotip 1/2a) WDCM 00109Kobay izolatı	+	+	Uygun
3	Dahililik Çalışması	***L. monocytogenes*** (genotip IV) 12MOB112LMEt izolatı	+	+	Uygun
4	Dahililik Çalışması	***L. monocytogenes*** (genotip II) 12MOB118LM Süt ürünü izolatı	+	+	Uygun
5	Dahililik Çalışması	***L. monocytogenes*** aha suşu LM01 Dumanlamış alabalıkizolatı	+	+	Uygun
6	Haricilik Çalışması	***L. innocua*** WDCM 00017	-	-	Uygun
7	Haricilik Çalışması	***L. ivanovii*** WDCM 00018	-	-	Uygun
8	Haricilik Çalışması	***Bacillis cereus*** WDCM 00001	-	-	Uygun
9	Haricilik Çalışması	***Enterococcus faecalis*** WDCM 00009	-	-	Uygun
10	Haricilik Çalışması	***Staphylococcus aureus*** WDCM 00034	-	-	Uygun

11.6. Alternatif Tiplendirme Metodu Verifikasyonu İçin Örnek Çalışma 2

Bir laboratuvar ISO 16140-6 standardına uygun olarak valide edilmiş ticari PCR tabanlı bir serotiplendirme metodunu, ISO/TR 6579-3 Salmonella spp. serotiplendirme metoduna alternatif olarak kullanmak istediğinde aşağıdaki şekilde çalışma yapmalıdır.

Hedeflenen 5 çeşit suş seçilir.

Hedef olmayan 5 suş seçilir.

Alternatif doğrulama veya tiplendirme metodu kapsamında seçilmiş hedef ve hedef olmayan mikroorganizmalar söz konusu metoda gore analiz edilerek, uygulama verifikasyon çalışması (Implementation Verification) yapılır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 25'te verilmiştir.

Çizelge 25. Uygulama Verifikasyon Çalışması (Implementation Verification) Yapılan, Valide Edilmiş Alternatif Tiplendirme Metoduna Ait Sonuç Değerlendirme Tablosu

Test edilen suşlar	Dahililik/ Haricilik Çalışması	Suş Özellikleri	Beklenen Doğrulama Sonucu	Verifiye Edilen Metoda Ait Sonuç	Değerlendirme
1	Dahililik Çalışması	S. Anatum (3,{10}{15}{15,34}:e,h:1,6) Saha suşu Salm01 Süt ürünü izolatı	*Salmonella* Anatum	*Salmonella* Anatum	Uygun
2	Dahililik Çalışması	S. Enteritidis (1,9,12:g,m:-) WDCM 00030	*Salmonella* Enteritidis	*Salmonella* Enteritidis	Uygun
3	Dahililik Çalışması	S. Hadar (6,8:z10:e,n,x) Saha suşu Salm02 Kanatlı eti izolatı	*Salmonella* Hadar	*Salmonella* Hadar	Uygun
4	Dahililik Çalışması	S. Infantis (6,7,14:r:1,5) Saha suşu Salm03 Yumurta ürünleri izolatı	*Salmonella* Infantis	*Salmonella* Infantis	Uygun
5	Dahililik Çalışması	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:1,2) WDCM 00031 Tavuk dokusu izolatı	*Salmonella* Typhimurium	*Salmonella* Typhimurium	Uygun
6	Haricilik Çalışması	S. Panama (1,9,12:l,v:1,5) Saha suşu Salm04	-	-	Uygun
7	Haricilik Çalışması	S. Saintpaul (1,4,[5],12:e,h:1,2) Saha suşu Salm05 Hindi izolatı	-	-	Uygun
8	Haricilik Çalışması	*Citrobacter freundii* WDCM 00006	-	-	Uygun
9	Haricilik Çalışması	*Echerichia coli* WDCM 00012	-	-	Uygun
10	Haricilik Çalışması	*Hafnia alvei* WDCM 00095	-	-	Uygun

12. PERSONEL YETKİLENDİRİLMESİ

12.1. Personel Yetkilendirmesi İçin Yapılması Gerekenler

Laboratuvar tarafından yeni atanan personele oryantasyon eğitimi verildikten sonra analizlerle ilgili eğitim için planlama yapılmalıdır. Bu planlama dahilinde personel yetkilendirileceği analizler için analiz metotları hakkında bilgilendirilir. Bilgilendirme sonrası personelin yetkinliğini alabilmesi için, ISO 16140-3 doğrultusunda, ilgili analiz metoduna göre bir adet uygulama verifikasyonu yapması yeterli olacaktır.

Personelin yetkinliği için yapılan çalışmaların sonuçları doğrulama raporunda ek olarak kayıt altına alınmalıdır. Sonuçlar doğrulama raporundaki sonuçlarla uyumlu bulunmuş ise doğrulama raporunun veya belirsizlik raporunun değiştirilmesine gerek yoktur. Ancak laboratuvardan ayrılan personelin doğrulama raporundaki verileri çıkartılmalıdır.

12.2. Personelin Yetkinlik Kontrolü

Mikrobiyolojik analizlerde yetkilendirilen personelin **en az yılda bir defa** yetkinlik izlemesi yapılmalıdır. İzleme prosedürü aşağıdaki değerlendirme metodolojilerinden birini veya birkaçını içerebilir. Belirlenen aralıklarda yetkinliği izlenmeyen personel için laboratuvarın tanımladığı çalışmalar yaptırıldıktan sonra personel analiz yapmaya başlayabilir.

Yetkinliğin izlenmesi için kullanılabilecek yöntemler;

- Performansın doğrudan gözlenmesi: Personel prosedürleri yürütürken gözlenerek, kullanılan bir kontrol listesi vasıtasıyla, bütün adımların eksiksiz tamamlandığı kaydı,
- Çalışılan analiz sayısı: Belirlenen süre içerisinde personelin değerlendirildiği parametrelerde gerçekleştirdiği analiz sayıları,
- Cihazın bakım ve performans kontrollerinin doğrudan gözlenmesi: Cihazın bakım ve performans kontrolünü yapan personelin dokümantasyon, eksiklik ve doğruluk yönünde yaptığı işlemlerin kontrolü,
- Test sonuçlarının kaydedilmesinin ve raporlanmasının izlenmesi: Günlük çalışma defterlerinde yeralan kayıtların uygunluğu, bilgisayar çıktıları, eksik ve yanlış sonuç girişlerinin kontrololü,
- Kalite kontrol kayıtlarının, yeterlilik testlerinin sonuçlarının incelenmesi: Kalite kontrol çalışmalarının kayıtları kontrol edilerek, eksiklik, doğruluk, prosedürlere uygunluk, sonuçların uygunluğu, uygun olmayan sonuçlar için yapılan faaliyetlerin kontrolü,

İzleme sırasında analizin farklı aşamaları; besiyeri hazırlama, numune hazırlama, analiz süreci, değerlendirme, raporlama, onaylama vb. değerlendirilebilir. İzleme çalışmalarına ait tüm objektif deliller saklanmalı ve kayıt altına alınmalıdır.

Çalışmalar sonucunda personelin yetkin ya da yetkin olmadığı kayıt altına alınmalıdır. Yetkin olmayan personele nasıl bir faaliyet uygulanacağına karar verilmelidir. Örneğin;

- Dokümanlarının gözden geçirilmesi
- Yetkilendirme sürecinin tekrarlanması
- Dış eğitim
- Başka pozisyonda değerlendirilmesi vb.
- **Mikroskobik sayım ve mikroskobik saha (alan) analizlerinde;**

  Yetkili personel tarafından eğitim verildikten sonra yeni personel ile en az 6 paralel preparatlar hazırlanıp, sayım yapılır. Sayımlar arasındaki mutlak fark %5'i geçmemelidir.

13. KALİTE KONTROL

Kalite kontrolünde amaç, her seferinde alınan sonuçların tutarlığını ve bunların tanımlanmış kriterlere uygunluğunu sağlamaktır. Değişkenliğin (rastgele ya da sistematik hata vb) kontrol altında olduğunun kanıtlanması için periyodik bir kontrol programı gerekmektedir. Kontrol laboratuvarın akreditasyonu kapsamına giren bütün deneyleri içermelidir. Bu çalışmalar analizin kalitatif ya da kantitatif olması ile yöntemine göre değişkenlik gösterir.

Kalite Kontrol çalışmaları "İç Kalite Kontrol" ve "Dış Kalite Kontrol" olarak iki ayrı şekilde uygulanır.

13.1. İç Kalite Kontrol

13.1.1.Genel Kalite Kontrol

Mikrobiyoloji laboratuvarında analizlerin doğruluğunun güvence altına alınması için genel kontroller yapılmalıdır. Bunlar aşağıda listelenmiştir (ISO 7218).

- Ortam kontrolü (Hava / Yüzey)
- Besiyeri kontrolü
- Besiyeri hazırlamada kullanılan suyun kontrolü (iletkenlik/mikrobiyal yük)
- Otoklav kontrolü
- Temizlik takip
- Terazi kontrolü
- Hacim doğrulama (pipet/ dispenser vb.)
- Cihaz ve ortam sıcaklık kontrolü
- pH metre doğrulaması
- Cihazların yıllık bakım onarımı
- UV etkinlik kontrolü (Ortam kontrolü olumsuzluğunda geri sorgulama amacıyla)

- Biyogüvenlik kabini kontrolü (DOPP testi ve haftalık UV temizliği)
- Referans suş kontrolü
- Hızlı test cihazlarının kalite kontrolü

13.1.2. Kantitatif Analizler için Kalite Kontrolü

Kalite kontrol analizleri laboratuvarın risk analizine (numune sıklığı, personel sayısı, analiz portföyü, laboratuvar deneyimi vb.) göre yıl içinde çalışılır. Laboratuvar tarafından kalite kontrol analizlerinin nasıl yapılacağı tanımlanmalıdır. Bunun için Kontrol kartı (Range kart) oluşturulabilir. Ayrıca okuma belirsizlikleri için çalışmalar yapılabilir. Aynı yıl içerisinde analizlerde yetkinliği bulunan tüm personel kalite kontrol analizlerinde en az bir kez yer almalıdır.

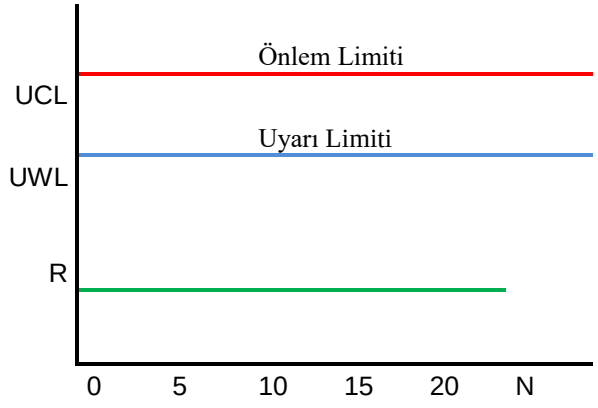
13.1.2.1. R kart uygulaması

Laboratuvarın elde ettiği deney sonuçlarının kalitesinde zaman içerisinde bir değişme olup olmadığını gösteren grafiklerdir. Bu grafikler, Kalite Kontrol Örnekleri kullanılarak uygulanan deney prosedürü sonuçlarından elde edilir.

Range Kart kesinliğin kontrolü için matriksin stabil olmadığı durumlarda kullanılır. Sınırlı olarak doğruluk kontrolü de yapılabilmektedir. R grafiğinde iki çalışmanın farkından yola çıkıldığı için, rutin çalışmalar sırasında gelen farklı örneklerin paralel çalışmaları kullanılabilir. Range grafiğinde yalnızca üst limit vardır, fark ne kadar az olursa sonuç o kadar doğrudur.

R Kart için farklı konsantrasyonlarda ve farklı matriksleri temsil eden örnekler kullanılabilir. Standart referans materyal kullanılması kalite kontrol için faydalı değildir. Grafik oluşturmak için en az 10-15 (15-20) veri gereklidir. R kart tekrarüretilebilirlik verileri kullanılarak oluşturulur. Elde edilen sonuçlar ile RPD Bağıl yüzde fark hesaplamasından yararlanarak RPD grafiği çizilir (Çizelge 26). Bir yıl sonunda elde edilen kontrol değerleri ile hesaplanan ortalama yüzde bağıl fark (ortRPD) kullanılarak yeni merkezi hat saptanmalıdır.

Çizelge 26. R Kart hazırlanması



Merkezi hat örneklerin farklı analistler tarafından paralel olarak çalışılması ile elde edilen yüzde bağıl fark (RPD-Relative Percent Difference) değerlerinin ortalaması kullanılarak oluşturulur.

RPD=[lA-Bl /((A+B) / 2)]*100

A: ilk analiz sonucu

B: ikinci analiz sonucu

|A-B|=Paralel çalışılan örnekler arasındaki farkın mutlak değer

Merkez Hat (R)

Uyarı Limiti(WL)= ort RPDx2,51

Önlem Limit(CL)= ort RPDx3,27

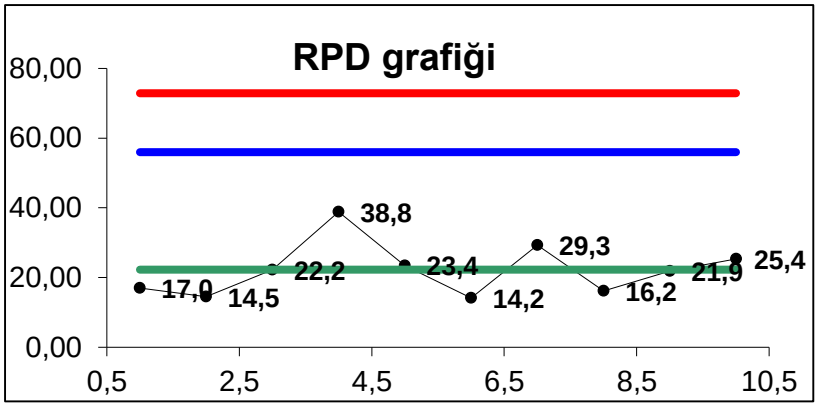
Bu formüle göre oluşturulan R kart için Merkez hat uyarı ve önlem hatları sabitlenir ve rutin olarak laboratuvar tarafından tanımlanan zamanlarda paralel çalışmalar yapılarak kart üzerine işlenir.

Aşağıdaki verilen Çizelge 27'deki örnekte olduğu gibi, önce R kart hazırlanarak R-WL ve CL değerleri bulunur ve sabitlenir. Daha sonra Çizelge 28'te olduğu gibi, bu limitlere göre hazırlanan R kart için çalışmalar yapılarak ya da laboratuvarın tercihine bağlı olarak, Laboratuvarın Tekrarüretilebilirlik çalışmalarından elde etmiş olduğu Standart Sapma (S_{IR}) kullanılarak limit aralığında olup olmadığı değerlendirilir (NMKL Procedure No.18).

Çizelge 27. Örnek R kart R,WL ve CL değerlerinin hazırlanması

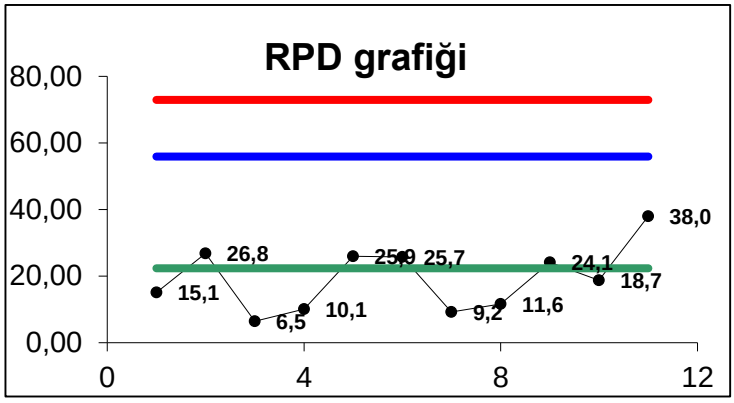
Parametre	E.coli Sayımı								
Metot	ISO 16649-1								
Örnek	Laboratuvar Numuneleri/Ara Kesinlik Çalışmaları								
Sıra	**Tarih**	**Örnek No**	**1. Analiz**	**2. Analiz**	**Ortalama**	**RPD %**	**R**	**WL**	**CL**
1	21.1.2021		300	253	277	17,0	**22,3**	**55,94**	**72,88**
2	21.1.2021		320	370	345	14,5	**22,3**	**55,94**	**72,88**
3	21.1.2021		350	280	315	22,2	**22,3**	**55,94**	**72,88**
4	21.1.2021		400	270	335	38,8	**22,3**	**55,94**	**72,88**
5	21.1.2021		245	310	278	23,4	**22,3**	**55,94**	**72,88**
6	21.1.2021		269	310	290	14,2	**22,3**	**55,94**	**72,88**
7	21.1.2021		320	430	375	29,3	**22,3**	**55,94**	**72,88**
8	21.1.2021		255	300	278	16,2	**22,3**	**55,94**	**72,88**
9	21.1.2021		360	289	325	21,9	**22,3**	**55,94**	**72,88**
10	21.1.2021		310	400	355	25,4	**22,3**	**55,94**	**72,88**

Ortalama RPD	Merkez hat	22,3
WL Uyarı limiti	2,51*mRPD	55,94
CL Önlem limiti	3,27*mRPD	72,88



Çizelge 28. Çizelge 27' ye göre yapılan örnek çalışma

Parametre	E.coli Sayımı								
Metot	ISO 16649-1								
Örnek	Laboratuvar Numuneleri								
Sıra	**Tarih**	**Örnek No**	**1. Analiz**	**2. Analiz**	**Ortalama**	**RPD %**	**R**	**WL**	**CL**
1	13.2.2021	Numune(x)	570	490	530	15,1	**22,3**	**55,9**	**72,9**
2	6.3.2021	Numune(x)	148	113	131	26,8	**22,3**	**55,9**	**72,9**
3	10.4.2021	Numune(x)	300	320	310	6,5	**22,3**	**55,9**	**72,9**
4	18.5.2021	Numune(x)	113	125	119	10,1	**22,3**	**55,9**	**72,9**
5	10.6.2021	Numune(x)	470	610	540	25,9	**22,3**	**55,9**	**72,9**
6	08.07.2021	Numune(x)	61	79	70	25,7	**22,3**	**55,9**	**72,9**
7	11.08.2021	Numune(x)	125	137	131	9,2	**22,3**	**55,9**	**72,9**
8	11.9.2021	Numune(x)	89	100	95	11,6	**22,3**	**55,9**	**72,9**
9	15.10.2021	Numune(x)	79	62	71	24,1	**22,3**	**55,9**	**72,9**
10	8.11.2021	Numune(x)	126	152	139	18,7	**22,3**	**55,9**	**72,9**
11	9.12.2021	Numune(x)	470	320	395	38,0	**22,3**	**55,9**	**72,9**
Ortalama RPD	Merkez hat		22,29						
WL Uyarı limiti	2,51*mRPD		55,94						
CL Önlem limiti	3,27*mRPD		72,88						



13.1.2.2. Okuma belirsizliği

Koloni sayımlarının kesinliğinin kontrolü için 10 petri seçilir. Görevli her analist bu 10 petrideki kolonileri sayar. Petriler +4˚C ye buzdolabına kaldırılır en az 1 saat en fazla 1 gün sonra tekrar okuma yapılır. Her petrinin relatif varyansı hesaplanır; relatif varyans %7.7' den yüksek olmamalıdır.

$$rv = \frac{|t1 - t2|}{X} * 100\%$$

t1: 1.sayım

t2: 2.sayım

3 çalışma hesabının yer aldığı Çizelge 29, aşağıda verilmiştir. Çalışmalar 10'a tamamlanmalıdır. Sayım yapan tüm analistlerin sonuçları karşılaştırılır. Sonuçlar %18.2'den yüksek olmamalıdır.

$X = \Sigma X / n$

n: çalışan personel sayısı.

Sonuçlar $x - (x * \%18.2)$; $x + (x * \%18.2)$ arasında olmalıdır.

Çizelge 29. Örnek Okuma belirsizliği

ANALİSTLER	t1	t2	X	rv%	t1	t2	X	rv%	t1	t2	X	rv%
A Kişi	42	44	43	4,6	69	73	71	5,6	90	83	86,5	8
B Kişi	43	41	42	4,7	72	67	70	7,2	74	72	73	2,7
C Kişi	42	42	42	0	74	72	73	2,7	80	86	83	7,2
D Kişi	43	44	43,5	2,3	74	75	75	1,3	90	83	86,5	8
D Kişi	44	41	42,5	7	78	74	76	5,2	86	90	88	4,5
			213				364				417	
X	42,6				72,8				83,6			
x-18,2%	50,4				86				98,8			
x+18,2%	34,9				59,6				68,4			

13.1.3. Kalitatif Analizlerde Kalite Kontrolü

Numune sıklığına göre kalitatif olarak en az bir negatif ve bir pozitif aşılanmış örneklerde analiz yapılır. Eğer yapay kirletilmiş numune kullanılcaksa, tercihen çalışılan referans kültürlerle, laboratuvarın uygulama verifikasyonu ile tespit edilen LOD_{50} seviyesinde bulaştırma yapılarak, yapay kirletilmiş örnek hazırlanır veya doğal kirli numune pozitif kontrol olarak kullanılabilir.

13.1.4. EMS Kullanılan Analizlerde Kalite Kontrolü

Kalitatif EMS analizileri için Rehberin 12.1.3. maddesindeki kalitatif metotlardaki iç kalite çalışmalarına, Kantitatif EMS analizileri için ise Rehberin 12.1.2. maddesindeki maddesindeki kantitatif metotlardaki iç kalite çalışmalarına, uygun olarak çalışmalar yapılır. Elde edilen sonuçların %95 güven aralığının içinde olup olmadığına bakılır.

13.2. Dış Kalite Kontrol

18.02.2022 tarih ve 31754 sayılı Gıda Kontrol Laboratuvarları Yönetmeliği gereği, Laboratuvar her sene bir mikrobiyolojik analizden yeterlilik testine girmelidir. Bununla birlikte kapsamda bulunan analizlerin her biri için, 4 yıl içinde en az bir defa yeterlilik testine katılım

sağlanmalıdır. Analiz metodu içinde farklı matriksler için analiz akışı değişiyor ise, bu matriksler için alt alan uygulaması gerekmekte olup bu matriksler için ayrıca yeterlilik testine katılım sağlanmalıdır. Kapsamda bulunan analizlerin TS EN ISO 17043 standartına göe akredite yeterlilik testi sağlayıcısı bulunmadığı taktirde TS EN ISO 17043 şartlarını sağlayan kurum tarafından düzenlenen LAK testine katılım sağlanmalıdır. . LAK testi bulunamaması durumunda ise iç kalite çalışmaları ile kontrol sağlanmalıdır.

13.3. Uygunsuzluk Durumları

Laboratuvarda yapılan tüm iç kalite kontrol çalışmaları sonucunda tespit edilen sapmalar için "uygun olmayan iş" statüsünde değerlendirilerek uygunsuzluk açılması gereklidir. Uygunsuzluğun niteliğine göre düzeltici faaliyet de açılabilir ya da analiz durdurulabilir.

14. FARKLI DURUMLARDA YAPILACAK İŞLEMLER İÇİN ÖNERİLER

14.1.Yeni Cihaz

Hızlı testler için kullanılan cihazla aynı prensipte çalışan ek bir cihaz alındığında veya aynı prensipte çalışan cihazla değiştirildiği durumda;

Kalitatif analizlerde her mikroorganizma için, bir uygulama verifikasyonu çalışması yapılır.

Kantitatif analizlerde her mikroorganizma için, bir uygulama verifikasyonu çalışması yapılır.

Yeni cihazın standart sapmasının eski cihazın standart sapmasından küçük ya da eşit olduğu kanıtlanmalıdır.

14.2. Yeni Ortam (Alan Değişikliği)

İç kalite kontrol parametreleri kontrol edilir. Parametrelerde bir değişiklik olursa düzeltici faaliyet başlatılır. Faaliyetin değerlendirmesine göre doğrulama veya iç kontrol parametreleri tekrar edilir.

Taşınmadan dolayı performansı etkilenebilecek cihazların (biyogüvenlik kabini dahil) kalibrasyonları ve performans kontrolleri yaptırılır. Bu amaçla cihazların taşınma sonrası OQ/PV testlerinin yaptırılarak, taşınmanın cihaz performansını olumsuz yönde etkilemediğine dair ispatı yapılmalıdır.

Kalitatif analizlerde her mikroorganizma için, bir uygulama verifikasyonu çalışması yapılır.

Kantitatif analizlerde her mikroorganizma için, bir uygulama verifikasyonu çalışması yapılır.

14.3. Yeni Kit

Laboratuvarda kullanılan kitin değişmesi durumunda; örneğin farklı marka kit kullanılıyorsa doğrulama yenilenir. Ancak kullanılan kitin farklı versiyonlarının kullanıldığı durumlarda ise ön işlemler değişiyorsa doğrulama yenilenir.

Kalitatif analizlerde her mikroorganizma için, bir uygulama verifikasyonu çalışması yapılır. Kantitatif analizlerde her mikroorganizma için, bir uygulama verifikasyonu çalışması yapılır.

15. REFERANSLAR

- ISO 16140-3:2021 Gıda Zinciri Mikrobiyolojisi- Metot Validasyonu-Bölüm 3: Referans Metotların ve Doğrulanmış Alternatif Metotların Tek Bir Laboratuvarda Doğrulanması için Protokol (Microbiology of the food chain - Method validation - Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory).
- ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2:Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
- TS EN ISO 19036:2019 Gıda zinciri mikrobiyolojisi- Kantitatif Ölçümler için, Ölçüm Belirsizliğinin Tahmini (Microbiology of the food chain – Estimation of measurument uncertainty for quantitattive determinations).
- TS EN ISO 7218:2014 Gıda ve Hayvan Yemlerinin Mikrobiyolojisi - Mikrobiyolijik Analizler için Genel Şartlar ve Rehber.
- TS EN ISO 13366-1/AC 2010 Süt - Somatik hücrelerin sayımı - Bölüm 1: Mikroskobik metot (referans metot).
- NMKL Procedure No.18:2006 The Use Of Reference Materıals, Reference Straıns And Control Charts In A Food Mıcrobıologıcal Laboratory / Nordıc Commıtte on Food Analysıs.
- NMKL Procedure No.32:2017 Verification of Microbiological Methods / Nordıc Commıttee On Food Analysıs.