INSO
19222
1st.Edition
2014

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۹۲۲۲
چاپ اول
۱۳۹۳

کیفیت آب-تغییرپذیری نتایج آزمون و عدم‌قطعیت اندازه‌گیری در روش‌های شمارش میکروبیولوژی

Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

ICS:13.060.70

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] ،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه-بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2 - International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« کیفیت آب-تغییرپذیری نتایج آزمون و عدم قطعیت اندازه‌گیری در روش‌های شمارش میکروبیولوژی »

رئیس :	**سمت و/ یا نمایندگی**
ابراهیمی امام، غلامحسن (کارشناس مهندسی‌کشاورزی- علوم و صنایع غذایی)	کارشناس استاندارد
دبیر :	
آغه‌میری، اسرین (کارشناس مهندسی‌کشاورزی- علوم و صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد استان کردستان
اعضاء : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
آغه‌میری، کیا (کارشناس مهندسی‌صنایع- برنامه‌ریزی و تحلیل سیستم‌ها)	شرکت دوام انرژی
الماسیان، ریکا (کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد استان لرستان
جانی‌قربان، محترم (کارشناس‌ارشد شیمی)	اداره کل استاندارد استان اصفهان
داوری، کامبیز (دکترای میکروبیولوژی)	دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج
سالمی، امیر (دکترای شیمی تجزیه)	دانشگاه شهید بهشتی
محمدی، میلاد (کارشناس مهندسی‌صنایع- برنامه‌ریزی و تحلیل سیستم‌ها)	شرکت زاگرس‌صنعت سپاهان
یزدانی، ژیلا (کارشناس‌ارشد شیمی فیزیک)	اداره کل استاندارد استان کردستان

فهرست مندرجات

عنوان		صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد		ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد		ج
پیش گفتار		ه
مقدمه		و
۱	هدف و دامنه کاربرد	۱
۲	مراجع الزامی	۱
۳	اصطلاحات و تعاریف	۲
۴	روش‌های آزمون میکروبیولوژی	۵
۵	انتخاب رویکرد	۶
۶	رویکرد مولفه‌ای جهت ارزیابی عدم قطعیت عملیاتی	۹
۷	رویکرد کلی‌نگر برای تعیین عدم قطعیت عملیاتی	۱۱
۸	عدم قطعیت مرکب در نتایج آزمون	۱۳
پیوست الف (اطلاعاتی) نمادها و تعاریف		۱۵
پیوست ب (الزامی) قواعد کلی ترکیب‌کردن مولفه‌های عدم قطعیت		۱۷
پیوست پ (الزامی) تغییرپذیری ذاتی - عدم قطعیت توزیع نسبی شمارش کلنی‌ها		۲۲
پیوست ت (الزامی) تغییرپذیری ذاتی تخمین‌های MPN		۲۴
پیوست ث (الزامی) تغییرپذیری ذاتی (عدم قطعیت استاندارد) در شمارش‌های تأییدی		۲۷
پیوست ج (الزامی) رویکرد کلی‌نگر برای تعیین عدم قطعیت‌های عملیاتی و مرکب		۳۱
پیوست چ (الزامی) رویکرد مولفه‌ای برای ارزیابی عدم قطعیت نسبی مرکب در شرایط تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی		۳۷
پیوست ح (الزامی) ارزیابی تجربی واریانس نمونه‌برداری فرعی		۴۲
پیوست خ (الزامی) تکرارپذیری و تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی نسبی در اندازه‌گیری‌های حجمی		۴۵
پیوست د (الزامی) عدم قطعیت نسبی مجموع آزمونه‌ها		۴۸
پیوست ذ (الزامی) عدم قطعیت نسبی فاکتور رقت F		۵۲
پیوست ر(الزامی) تکرارپذیری و تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی شمارش		۵۴
پیوست ز (الزامی) اثرات گرم‌خانه‌گذاری– عدم قطعیت ناشی از موقعیت و زمان		۵۹
پیوست ژ (اطلاعاتی) نحوه بیان وکاربرد عدم قطعیت اندازه‌گیری		۶۵
پیوست س (اطلاعاتی) کتاب‌نامه		۷۲

پیش‌گفتار

استاندارد "کیفیت آب- تغییرپذیری نتایج آزمون و عدم قطعیت اندازه‌گیری در روش‌های شمارش میکروبیولوژی" که پیش‌نویس آن درکمیسیون‌های مربوط توسط (سازمان ملی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران/ پژوهشگاه استاندارد) تهیه و تدوین شده و در سیصد و هفتادمین اجلاس کمیته‌ملی استاندارد بیولوژی و میکروبیولوژی مورخ ۱۳۹۳/۴/۷ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان ملی استاندارد ایران، مصوّب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحوّلات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و ماخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ISO 29201: 2012, Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods.

مقدمه

آزمایشگاه‌ها ملزم به انجام روش‌های اجرایی برای تخمین عدم قطعیت آزمون‌های خود می‌باشند. بدون چنین شاخصی نتایج آزمون‌ها با یکدیگر و یا با نتایج آزمون مواد مرجع قابل مقایسه نیست.

دستورالعمل‌های کلی برای ارزیابی و بیان عدم قطعیت اندازه‌گیری توسط کارشناسان اندازه‌شناسی شیمیایی و فیزیکی تدوین شده و با عنوان ISO/IEC Guide 98-3:2008 انتشار یافته‌است (کتاب‌نامه شماره ۷). ولی در این دستورالعمل‌ها راجع به شمارش شاخص‌های مشاهده‌شده هیچ بحثی صورت نگرفته‌است.

تاکید ISO/IEC Guide 98-3:2008 متکی براصل "قانون تعمیم عدم قطعیت" است، که بر مبنای آن تخمین نهایی عدم قطعیت از ترکیب مولفه‌های جداگانه تاثیرگذار قابل دسترسی حاصل می‌شود. در این استاندارد به این روش، اصل "رویکرد مولفه‌ای"[1] گفته می‌شود و هم‌چنین با نام "رویکرد قدم به قدم" یا "پایین- بالا" نیز شناخته می‌شود .

اطلاعات موجود نشان‌می‌دهد که رویکرد مولفه‌ای در بررسی عوامل موثر بر عدم قطعیت شمارش‌های میکروبیولوژی، قابل توجیه نیست و پاسخگویی کافی ندارد (مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶). در چنین رویکردی به‌دلیل نادیده‌گرفته‌شدن برخی مولفه‌های موثر برعدم قطعیت، امکان دارد که مقدار آن کم‌تر از حد واقعی نشان‌داده شود. اگرچه، کتاب‌نامه شماره ۱۹ نشان‌می‌دهد که مفاهیم ISO/IEC Guide 98-3:2008 نیز قابلیت تطبیق و عملیاتی‌شدن برای شمارش داده‌ها را می‌توانند داشته باشند.

اصل دیگر، رویکرد"جعبه سیاه" نام دارد و به‌عنوان رویکرد"بالا - پایین" یا کلی‌نگر[2] نیز شناخته شده است، که بر مبنای آزمون آماری یک سری مشاهدات تکراری نتیجه نهایی آزمون قرار دارد (مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶). در رویکرد کلی‌نگر لزومی به کمی‌کردن و یا حتی شناخت دقیق حضور هریک از عوامل موثر در جعبه سیاه نیست.

طبق فلسفه کلی‌نگر، تخمین عدم قطعیتی که برای یک روش مشخص در یک آزمایشگاه خاص مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، می‌تواند برای نتایج حاصله بعدی که توسط همان آزمایشگاه و با همان روش به‌دست می‌آید نیز قابلیت کاربرد داشته باشد مشروط بر آن که با داده‌های کنترل‌کیفیت مرتبط قابل توجیه باشد (کتاب‌نامه شماره ۱۰). هر نتیجه آزمون به‌دست‌آمده توسط همان روش، می‌تواند همان عدم قطعیت پیش‌بینی‌شده را داشته باشد. این قاعده در آزمون‌های شیمیایی قابل درک و فهم است. در آزمون‌های شیمیایی معمولاً عدم قطعیت روش اجرایی و عدم قطعیت نتیجه نهایی آزمون یکسان هستند. رویکرد کلی‌نگر امکان وجود موارد منحصربه‌فرد در رابطه با عدم قطعیت در آزمون‌های خاص را نادیده می‌گیرد.

در اغلب اوقات "تغییرپذیری بدون علت" غیر قابل کنترل در شمارش‌ها مداخله کرده و سبب تغییر وضعیت در آزمون‌های شمارش میکروبیولوژی می‌گردد. عدم قطعیت کامل نتیجه آزمون فقط بعد از به‌دست‌آوردن کامل نتیجه نهایی قابل تخمین‌زدن است. این امر در هر دو رویکرد مولفه‌ای و کلی‌نگر باید مورد توجه قرار داشته باشد.

---

1 component approach

2 global approach

در مواردی که نتیجه شمارش‌ها مقادیر کوچکی هستند ، تغییرپذیری‌های غیر قابل کنترل در آن‌ها به‌سرعت افزایش می‌یابد، بنابراین رویکرد کلی‌نگر پایه، برای شمارش‌های کم مناسب نیست و هم‌چنین برای روش MPN و سایر روش‌های اعداد کم مانند شمارش‌های بر پایه تایید جزئی کلنی‌های احتمالی کاربر ندارد.
اغلب اوقات لازم و حتی مفید است که بین دو مولفه دقت، اولی عدم قطعیت فنی روش اندازه‌گیری (قابلیت تکرارپذیری عملیاتی) که کم و بیش قابل پیش‌بینی است و دیگری، تغییرپذیری غیرقابل پیش‌بینی ناشی از توزیع ذرات، فرق گذاشته شود. با اصلاح و بهبود اصل کلی‌نگر که به نحوی این دو منبع عدم قطعیت را شامل شود، می‌توان بر محدودیت عدم استفاده از رویکرد کلی‌نگر در شمارش‌های پایین فائق آمد. در این استاندارد چنین مدل کلی‌نگری به صورت مشروح بیان‌گردیده است.
از لحاظ نظری هر دو رویکرد تخمین عدم قطعیت می‌توانند نتایج یکسانی را ارائه دهند. مزیت‌ها و محدودیت‌های هر دو رویکرد در این استاندارد بیان شده است. هر دو رویکرد قابلیت یکسانی دارند و هیچ‌کدام بر دیگری ارجحیت ندارد. برحسب شرایط ممکن است یک رویکرد موثرتر بوده کیفیت عملیاتی بهتری نسبت به دیگری داشته باشد.
با وجود این، هیچ‌کدام از این دو راهبرد قادر به تخمین بدون ابهام عدم قطعیت نیست. همیشه بعضی چیزها مسلم فرض می‌شوند بدون آن‌که امکان تاثیرگذاری آن بر یک موقعیت معین مورد سنجش قرارگرفته باشد. تخمین عدم‌قطعیت، بر اساس نتایج کسب‌شده قبلی (عدم قطعیت استاندارد تجربی) و/یا مفروضات کلی منطقی استوار است.

کیفیت آب-تغییرپذیری نتایج آزمون و عدم قطعیت اندازه‌گیری در روش‌های شمارش میکروبیولوژی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد تعیین دستورالعمل‌هایی برای ارزیابی عدم قطعیت در آزمون‌های کمی میکروبیولوژی بر اساس شمارش ذرات میکروبی به‌وسیله کشت میکروبی است. این دستورالعمل‌ها برای همه روش‌های شمارش کلنی و روش MPN کاربرد دارد .

این استاندارد برای روش‌های آزمون جستجو و شناسایی میکروارگانیسم‌ها (غیرشمارش) کاربرد ندارد.

در این استاندارد رویکردهای مولفه‌ای (معروف به پایین- بالا و قدم به قدم) و رویکرد اصلاح‌شده کلی‌نگر (بالا - پایین) تشریح شده است و چگونگی به‌دست آوردن مقادیر تغییرات کاربردی درون‌آزمایشگاهی و عدم قطعیت مرکب نتایج نهایی آزمون را نشان‌می‌دهد.

یادآوری۱- اکثر پیوست‌ها الزامی هستند، با این حال تنها پیوست‌های مربوط به هر مورد خاص به‌کارگرفته می‌شوند. اگر رویکرد کلی‌نگر انتخاب شود از پیوست‌های الزامی متعلق به رویکرد مولفه‌ای صرف‌نظر می‌شود و برعکس.

یادآوری۲- واریانس نمونه‌برداری از منابع اصلی پیش از آزمون، در دامنه کاربرد این استاندارد قرار ندارد اما لازم‌است در طرح‌های نمونه‌برداری و برنامه‌های پایش مورد بررسی و توجه قرارگیرد.

یادآوری۳- شک یا عدم قطعیت تصمیم‌هایی که عدم قطعیت آن‌ها بر اساس به‌کارگیری نتایج آزمون تخمین زده شده است، خارج از دامنه کاربرد این استاندارد قرار دارد.

یادآوری۴- تغییراتی که در خارج از حوزه مکان آزمون و از طریق شرکت در دوره‌های آزمون‌های مهارت بین آزمایشگاهی و کالیبراسیون داخلی تعیین می‌شوند در این استاندارد تشریح نشده است. اما لازم است که در برنامه‌های کنترل آزمون مورد ملاحظه قرار بگیرند. به‌کارگیری داده‌های کالیبراسیون داخلی سبب می‌شود که عامل اریبی[1] بین آزمایشگاهی در تخمین عدم قطعیت دخالت داده شود (کتاب‌نامه شماره ۱۲).

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده‌است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها مورد نظر است.

استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

1 Bias

۱-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - تخمین عدم قطعیت اندازه‌گیری در آزمون‌های کمی - راهنما

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود:

۳-۱ عدم قطعیت اندازه‌گیری

متغیر مرتبط با نتیجه اندازه‌گیری که نشان‌دهنده میزان پراکندگی مقادیری است که می‌توان به‌طور منطقی به کمیتی که اندازه‌گیری می‌شود (اندازه‌ده) نسبت‌داد. این متغیر معیاری از دقت است و به‌صورت عدم قطعیت استاندارد یا عدم قطعیت استاندارد نسبی بیان می‌شود [کتاب‌نامه شماره ۷].

۳-۲ تخمین عدم قطعیت اندازه‌گیری

نوعی ارزیابی است که به دو روش انجام می‌شود. یک روش که تخمین عدم قطعیت نوع A نام دارد براساس تجزیه و تحلیل یک‌سری از مشاهدات صورت می‌گیرد.

روش دیگر تخمین عدم قطعیت، نوع B نام دارد. مرسوم‌ترین تخمین نوع B در روش‌های میکروبیولوژی، بر اساس توزیع‌های آماری فرض‌شده در رویکرد مولفه‌ای استوار می‌باشد.

ارزیابی نوع A و نوع B را می‌توان بر هر کدام از هر یک از مولفه‌های تشکیل‌دهنده عدم قطعیت کل، و یا عدم قطعیت مرکب نتیجه نهایی اجرا کرد.

ارزیابی نوع A لزوماً از ارزیابی نوع B مطمئن‌تر نیست. در برخی اندازه‌گیری‌ها وقتی‌که تعداد مشاهدات کم است، مولفه‌های حاصل از ارزیابی نوع B بهتر از ارزیابی نوع A در نظرگرفته می‌شود[کتاب‌نامه شماره ۷].

۳-۳ تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی

تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی، به عنوان بیان موجزی از عدم قطعیت، به کرات مورد استفاده قرار می‌گیرد. این اصطلاح هم‌چنین به‌عنوان تجدیدپذیری میانی[1] یا دقت میانی (زمان، تجهیزات، کاربر) شناخته شده است [کتاب‌نامه شماره ۲].

نحوه ارزیابی به این صورت تحلیل می‌شود که نتیجه آزمون یک نمونه هنگامی که توسط کارکنان دیگر همان آزمایشگاه ولی با تجهیزات، محیط‌های کشت، شرایط آزمون و گرم‌خانه‌های مختلف دیگر تحت آزمون قرار می‌گیرد تا چه مقدار ممکن است تحت‌تاثیر قرار گرفته باشد. مقدار تخمین زده شده دقت میانی هرگز وابسته به نتایج آزمون واقعی نیست، اما فرض می‌شود که یک تخمینی کلی از عدم قطعیت منطقی از به‌کارگیری یک روش آزمون در یک آزمایشگاه خاص را ارائه‌می‌دهد.

عدم قطعیت درون آزمایشگاهی یا با ترکیب‌کردن مولفه‌های مجزای عدم قطعیت که در شرایط تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی تخمین زده شده‌اند (رویکرد مولفه‌ای) یا با روش‌های تجربی خاص که در آن شرایط آزمون برحسب نوع طراحی آن تغییر یافته است (رویکرد کلی‌نگر)، تخمین زده می‌شود.

1 intermediate

۳-۴ عدم قطعیت استاندارد مرکب

۳-۴-۱ کلیات

نتایج نهایی آزمون میکروبیولوژی از روی مقادیر مشاهده شده میانی محاسبه می‌شود. مشاهده میانی اصلی، نتایج شمارش است. بیش‌تر مقادیر مشاهده شده دیگر مربوط به اندازه‌گیری‌های حجمی می‌باشد. عدم قطعیت استاندارد مرکب همان عدم قطعیت نتیجه یک اندازه‌گیری است، وقتی که آن نتیجه از ترکیب چندین کمیت دیگر به وجود آمده باشد و مقدار آن مساوی است با مجموع ریشه دوم مثبت عباراتی که آن عبارات، واریانس‌ها و کوواریانس‌های کمیت‌های مزبور می‌باشند و برطبق آن چگونگی انحراف نتیجه اندازه‌گیری با تغییرات در این کمیت‌ها سنجیده می‌شود [کتاب‌نامه شماره ۷].

یادآوری۱- بررسی کوواریانس تنها در شرایطی ضروری است که وابستگی‌های معنی‌داری بین مولفه‌های عدم قطعیت برقرار باشد. در غیر این‌صورت مجموع ریشه دوم واریانس‌ها کافی است (بند ۳-۴-۲ و بند ۳-۵) .

یادآوری۲- در موارد شمارش‌های میکروبیولوژی می‌توان فرض کرد که همه مولفه‌های عدم قطعیت غیر وابسته هستند به این معنا که از لحاظ آماری گسسته می‌باشند. در چنین حالاتی عدم‌قطعیت استاندارد مرکب از جمع‌کردن ریشه دوم مثبت مولفه‌های واریانس یا به عبارتی از مجموع ریشه‌های زوج به‌دست می‌آید (پیوست - ب)، [کتاب‌نامه شماره ۷].

۳-۴-۲ خصوصیات معنی‌دار عدم قطعیت‌های مرکب

برحسب کتاب‌نامه شماره۱۰، مولفه‌های کوچک‌تر از یک‌سوم بزرگ‌ترین مولفه موجود، نیازی به ارزیابی ندارند مگر آن‌که به تعداد زیاد وجود داشته باشند. این قاعده به‌طور ضمنی بر این موضوع دلالت دارد که در موارد تصمیم‌گیری بینابینی، حتی یک مولفه منفرد نیز می‌تواند در تخمین عدم قطعیت مرکب تأثیر کافی بگذارد. برای تصمیم‌گیری در خصوص اهمیت یک مولفه، حد نصاب تقریبی آن در ارتباط با سایر مولفه‌ها مورد شناسایی قرار می‌گیرد. معمولاً حداقل دو مولفه و یا بیش‌تر با اهمیت بوده و در محاسبه وارد می‌شود.

مثال - فرمول محاسبه عدم قطعیت مرکب دو مولفه‌ای، یکی سه‌برابر دیگری به شرح زیر است :

$$u_c(y) = \sqrt{3^2 + 1^2} = \sqrt{10} = 3.16$$

بدون در نظر گرفتن مولفه‌های کوچک‌تر، مقدار تخمین برابر۳٫۰۰ خواهدشد. در چنین حالتی با حذف مولفه‌های کوچک‌تر، مقدار عدم قطعیت مرکب به‌مقدار حدود ٪ ۵ کم‌تر تخمین‌زده می‌شود. برای اطمینان بیش‌تر تفاوت تا حد چهار رقم توصیه می‌شود.

۳-۵ عدم قطعیت استاندارد نسبی

۳-۵-۱ کلیات

فرمول‌های محاسبه نتایج نهایی آزمون‌های میکروبیولوژی فقط شامل ضرب و تقسیم است. تحت چنین شرایطی بهتر است عدم قطعیت استاندارد مرکب برحسب عدم قطعیت استاندارد نسبی محاسبه گردد (پیوست – ب)، [کتاب‌نامه شماره ۷].

در هر دو روش تخمین نوع A و B از علامت u_{rel} جهت معرفی عدم قطعیت استاندارد نسبی استفاده می‌شود.

یادآوری۱- عدم قطعیت استاندارد نسبی اغلب به صورت درصد بیان می‌شود. اصطلاحی که معمولا" برای بیان آن استفاده‌می‌شود ضریب تغییر، CV نام دارد .

یادآوری۲- زمانی‌که بر محاسبه عدم قطعیت با استفاده از فرآیند نوع A تأکید شود، علامت S به‌کار می‌رود.

یادآوری۳- هر تغییر سیستماتیک یا تصادفی که در فرایند قبل از تولید سوسپانسیون نهایی مثلاً" در نمونه‌برداری فرعی، ماتریکس و اثرات رقیق‌سازی اتفاق بیافتد به‌همان نسبت بر غلظت میکروارگانیسم هدف در سوسپانسیون نهایی اثر خواهد گذاشت. بنابراین، واریانس‌های نسبی این مولفه‌ها نیز اضافه می‌شوند. تأثیرات بعد از تلقیح نظیر گرم‌خانه‌گذاری و خواندن نتایج می‌توانند از لحاظ آماری سبب پیچیده‌تر شدن شرایط شده و به اندازه کافی شناسایی نشوند. در حال‌حاضر نسبی‌گرایی بهترین نتیجه نزدیک به صحت را ارائه می‌کند. خطاهای سیستماتیک در این روش معمولاً به‌صورت خطای تصادفی فرض شده و رفع می‌گردد.

۳-۵- ۲ لگاریتم‌ها و عدم قطعیت استاندارد نسبی

تخمین‌های کلی‌نگر عدم قطعیت استاندارد تجربی به‌صورت سنتی با محاسبه لگاریتم‌های اعشاری صورت می‌گیرد. زمانی‌که این سنجش‌ها انجام می‌شود در محاسبات آتی لازم است همه مولفه‌ها با مقیاس‌های مشابهی بیان شوند، یا با تبدیل عدم قطعیت استاندارد نسبی به لگاریتمی و یا تبدیل لگاریتمی به عدم قطعیت استاندارد نسبی. در بیش‌ترین حالات، عدم قطعیت استاندارد مطلق در مقیاس لگاریتم طبیعی و عدم قطعیت استاندارد نسبی در مقیاس بازه‌ای معادل به‌صورت عددی یکسان بیان می‌شوند. مقادیر محاسبه شده برحسب لگاریتم اعشاری با استفاده از ضرایب مناسب به لگاریتم طبیعی تبدیل می‌شود و برعکس. روابط ریاضی میان عدم قطعیت استاندارد و عدم قطعیت استاندارد نسبی در مقیاس‌های مختلف لگاریتمی درپیوست - ب نشان داده شده است.

۳-۶ واریانس نسبی

مربع عدم قطعیت استاندارد نسبی، واریانس نسبی نامیده می‌شود [کتاب‌نامه شماره ۷].

۳-۷ عدم قطعیت گسترده و عدم قطعیت گسترده نسبی

درشرایط خاص هنگامی‌که از نتیجه آزمون برای مطابقت با حدود مجاز در موارد مرتبط با سلامت عمومی و بهداشت استفاده می‌شود، مقتضی است که عدم قطعیتی اعلام شود که مشتمل بر بخش‌های وسیع‌تری از محدوده مقادیر مشاهده شده باشد.

این متغیر عدم قطعیت گسترده نام دارد و علامت آن U است.

مقدار U با ضرب مقدار عدم قطعیت مرکب در فاکتور پوشش، k به‌دست می‌آید :

$$U = ku_{\mathrm{c}}(y)$$

مقدار k بین ۲ تا ۳ است . در مقیاس نسبی فرمول آن به‌صورت زیر است :

$$U_{\mathrm{rel}} = ku_{\mathrm{c,rel}}(y)$$

برای توزیع نرمال، حدود ٪ ۹۵ از نتایج با عدم قطعیت گسترده $\mu \pm U$ پوشش داده می‌شوند که μ همان میانگین است و فاکتور پوششی $k = ۲$ انتخاب شده است. زمانی‌که $k = ۳$ باشد پوشش به حدود ٪ ۹۹ توسعه پیدا می‌کند.

نتایج آزمون‌های میکروبیولوژی هرگز به‌صورت کامل با توزیع نرمال تناسب ندارند. توزیع آن‌ها اغلب مورب و نامتقارن (چوله‌ای) می‌باشد. زمانی‌که دلایل کافی برای پذیرش توزیع‌های غیرنرمال (مثل پواسون یا دوجمله‌ای منفی یا توزیع نرمال لگاریتمی) داشته باشیم و تخمین‌های موجهی از متغیرهای مرتبط دردسترس باشد ، حدود بالاتر و پایین‌تر ٪ ۹۵ می‌تواند بر اساس این توزیع‌ها قرار بگیرد . جزییات بیش‌تر در این رابطه و استفاده از آن‌ها در پیوست- س بیان شده است.

۴ روش‌های آزمون میکروبیولوژی

۴-۱ روش‌های اساسی

روش‌های شمارش میکروبیولوژی بر اساس کشت، از نظر فنی متفاوت هستند ولی از نظر اصولی، اساس یکسانی دارند. روش آزمون اغلب با مخلوط‌کردن قسمتی از ماده مورد آزمایش در محیط کشت مناسب و تهیه یک مخلوط یکنواخت که به آن سوسپانسیون اولیه گفته می‌شود، آغاز می‌گردد. این مخلوط می‌تواند در ادامه باز هم رقیق شده تا به سوسپانسیون نهایی که دارای چگالی مناسبی از شمارش میکروارگانیسم هدف می‌باشد تبدیل گردد. در آزمون آب، نمونه آب سوسپانسیون اولیه است و وقتی‌که رقیق‌کردن لازم نباشد اغلب به‌صورت مستقیم به‌عنوان سوسپانسیون نهایی عمل می‌کند.

۴-۲ وسایل شمارش

بخش‌های اندازه‌گیری سوسپانسیون نهایی به یک ابزار شناساگر برای ارزیابی کمی منتقل می‌شود. وسایل شناساگر در آزمون‌های میکروبیولوژی از یک پتری‌دیش منفرد تا سیستم‌های چند پلیتی موازی در رقت‌های مختلف و سیستم‌های MPN با پیچیدگی‌های گوناگون تشکیل شده است.

۴-۳ ساختار عدم قطعیت

یک روش اجرایی کامل آزمون میکروبیولوژی شامل پنج یا شش مرحله متوالی به شرح زیر است :

الف) نمونه‌برداری فرعی و مخلوط‌سازی؛
ب) رقیق‌سازی (تهیه رقت)؛
پ) انتقال آزمونه(ها) به سیستم شناسایی در محیط‌های کشت مغذی؛
ت) رشد در زمان گرم‌خانه‌گذاری؛
ث) شمارش و شاید تایید ارگانیسم احتمالی هدف.

تغییرپذیری عملیاتی شامل اثرات مراحل فنی مذکور است. این عوامل هر کدام به‌صورت منفرد برای به‌کارگیری در رویکرد مولفه‌ای مورد تخمین قرار می‌گیرند. هنگام تخمین عدم قطعیت نتیجه نهایی، علاوه برآن، عدم قطعیت ناشی از توزیع تصادفی ذرات نیز در محاسبه وارد می‌شود (بند ۶-۲). در رویکرد سنتی کلی‌نگر همه مولفه‌های عملیاتی و توزیع تصادفی ذرات با همدیگر مورد تخمین قرار می‌گیرند.

۴-۴ بیان عدم قطعیت مرکب

۴-۴-۱ مدل دو مولفه‌ای

در بسیاری از اهداف عملی و تشریحی کافی است که عدم قطعیت نتایج آزمون میکروبیولوژی شامل دو گروه از مولفه‌ها باشد. عدم قطعیت اندازه‌گیری مرکب اندازه‌گیری با ترکیب‌کردن تغییرپذیری عملیاتی و تغییرپذیری ذاتی (عدم قطعیت توزیعی) به دست می‌آید.

در متون میکروبیولوژی این دو واریانس برحسب واریانس‌های نسبی (یا لگاریتمی) بیان می‌شود. فرمول مورد استفاده در این ارتباط عبارت‌است از :

$$u_{c,rel}(y) = \sqrt{u_{o,rel}^2 + u_{d,rel}^2} \qquad (۱)$$

که در آن :

$u_{c,rel}(y)$ عدم قطعیت استاندارد نسبی مرکب

$u_{o,rel}$ تغییرپذیری عملیاتی نسبی (عدم قطعیت استاندارد نسبی تجربی)

$u_{d,rel}$ تغییر پذیری ذاتی نسبی (عدم قطعیت توزیع نسبی)، است.

فرمول (۱) هم در رویکرد اصلاح‌شده کلی‌نگر و هم رویکرد مولفه‌ای برای تخمین عدم قطعیت نسبی مرکب اندازه‌گیری نتیجه نهایی به‌کار می‌رود.

یادآوری- از نمادهای پایینی هر علامت می‌توان برای نشان‌دادن شرایط تجربی و یا سطح عدم قطعیت استفاده کرد (r برای تکرارپذیری, 'R برای تکرارپذیری میانی یا درون‌آزمایشگاهی و R برای تکرارپذیری بین‌آزمایشگاهی)

۴-۴-۲ تغییرپذیری عملیاتی (عدم قطعیت فنی)

تغییرپذیری عملیاتی عبارت‌است از ترکیب‌کردن همه عدم قطعیت‌های در ارتباط با مراحل فنی روش اجرای‌آزمون. این متغیر شامل تغییرپذیری نمونه‌برداری فرعی، مخلوط‌کردن و تهیه رقت از نمونه آزمایشگاهی برای آماده‌سازی سوسپانسیون نهایی آزمون است. هم‌چنین شامل اثرات احتمالی گرم‌خانه‌گذاری و عدم قطعیت خواندن نتیجه آزمون نیز می‌باشد. هم‌چنین در این حالت مولفه اریبی نیز درگیر است اما به عنوان بخشی از تغییرپذیری تصادفی.

۴-۴-۳ تغییرپذیری ذاتی (عدم قطعیت توزیعی)

تغییرپذیری ذاتی شامل تغییرات اجتناب‌ناپذیر بدون علت مرتبط با توزیع ذرات درسوسپانسیون نهایی و در ابزار تشخیص است. سوسپانسیون‌های میکروبیولوژیکی معمولاً از توزیع پواسون پیروی می‌کنند. اگر از آزمون‌های تأییدی جزئی استفاده شود یا روش MPN به‌کار رود، تغییرپذیری ذاتی به نحو قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد و کم‌تر از توزیع پواسون پیروی می‌کند (پیوست های ت و ث).

یادآوری- تغییرپذیری ذاتی را می‌توان با استفاده از تکرار پلیت‌ها و در روش MPN با افزایش تعداد لوله‌های موازی کاهش‌داد.

۵ انتخاب رویکرد

۵-۱ کلیات

از ارزیابی، ارائه و استفاده از عدم قطعیت اندازه‌گیری در میکروبیولوژی زمان زیادی نمی‌گذرد. هنوز هم گروه‌های مختلف تفاسیر و درک متفاوتی از معنا و کاربرد عدم قطعیت اندازه‌گیری دارند. به‌دلیل این وضعیت شناور، یک مسیر هموار و یکنواخت برای تعیین، بیان و استفاده از عدم قطعیت اندازه‌گیری وجود ندارد.

این استاندارد به‌صورت مقدماتی دستورالعمل‌هایی برای آزمایشگاه‌ها ارائه داده است تا با کمک آن شروع به انجام عملیات ارزیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری بنمایند. رویکردهای مولفه‌ای و کلی‌نگر به‌صورت پایه‌ای تشریح شده‌اند. اگرچه پیشنهادات مطرح شده رویکردهای معتبری هستند ولی سیستم‌های ارزیابی عدم قطعیت دیگری نیز وجود دارند که دارای کاربردهای محدودتر یا وسیع‌تر از پروتکل‌های ارائه شده در این استاندارد می‌باشند. این سیستم‌ها دارای راه حل‌هایی برای مسائل خاص یا وضعیت‌های کنترل‌کیفی متفاوت هستند، بعضی از آن‌ها در ادامه این بند تشریح می‌شوند.

علاوه بر دو رویکرد پایه‌ای بیان شده در این استاندارد، رویکردهای دیگری برای آزمون و بیان عدم قطعیت اندازه‌گیری وجود دارد. این رویکردها به‌ویژه در کشورهایی که در آن‌ها ابداع شده و توسعه یافته‌اند، بیش‌تر مورد توجه قراردارند. در ادامه به پنج مورد اشاره می‌شود. خصوصیت کلی و معمول آن‌ها این است که بیش‌تر یا همه آن‌ها براساس داده‌های به‌دست‌آمده از فعالیت‌های کنترل‌کیفیت داخلی یا خارجی پایه‌گذاری شده‌اند. همه آن‌ها به‌جای توجه به عدم قطعیت اندازه‌گیری نتایج آزمون به جنبه‌های اعتباربخشی روش آزمون و احراز صلاحیت آزمایشگاه جهت انجام آزمون و عدم قطعیت‌های مرتبط با آن تاکید دارند و اغلب از آنالیز آماری متفاوت و غیر استاندارد استفاده می‌کنند.

روش‌های ارائه‌شده در کتاب‌نامه‌های شماره ۱۱ و ۱۲ بر اساس نمونه‌های مرجع پایدار قرار دارد که در آن‌ها امکان کنترل برخی مولفه‌های اریبی نیز وجود دارد. روش ارائه شده در کتاب‌نامه شماره ۱۱ برای تعیین عدم قطعیت در آزمون‌های کمی میکروبیولوژی در بسیاری از تجزیه و تحلیل‌های مواد غذایی در کشورهای اسکاندیناوی مورد پذیرش واقع شده است. در این روش از داده‌های کنترل‌کیفیت داخلی و نتایج داده‌های حاصل از مطالعات اشتراکی جهت تخمین عدم قطعیت آزمایشگاه‌های مشارکت‌کننده استفاده می‌شود. در کتاب‌نامه شماره ۱۲ به اریبی بین آزمایشگاهی پرداخته شده است.

جامع‌ترین سیستم در زمان انتشار این استاندارد توسط استاندارد فرانسه در دست تهیه می‌باشد (کتاب‌نامه شماره ۹) که شامل ارزیابی سطوح متفاوت عدم قطعیت (تکرارپذیری، تجدیدپذیری میانی و بین‌آزمایشگاهی) از طریق داده‌های کنترل‌کیفیت داخلی و خارجی و به‌کارگیری آمار بایز[1] در تخمین بازه اطمینان، CL[2] می‌باشد.

روشی دیگر در کتاب‌نامه شماره ۸ طراحی شده است که به وسیله آن وجود پراکندگی بالا (اصطلاحاً عدم قطعیت اندازه‌گیری) بین شمارش‌های دوتایی[3] در نمونه‌های آب آشامیدنی طبیعی شناسایی می‌شود.

سیستم مورد استفاده در نیوزیلند (کتاب‌نامه شماره ۱۶) براساس آزمون‌های عملی ویژه در نمونه‌های آب طبیعی طراحی شده است. این سیستم توسعه‌یافته طرح پایه کلی‌نگر است. از داده‌ها به‌دست‌آمده از آزمون

1 Bayesian
2 Confidence Limmit
3 duplicate

نمونه‌های متعدد آب توسط سه کاربر در پنج تکرار برای تخمین عدم قطعیت استفاده می‌شود. در این سیستم، مولفه‌های عملیاتی و ذاتی ازهمدیگر تفکیک نمی‌گردند لذا، شمارش‌های کم و نرمال (حدود ۲۰ کلنی) نیازمند ارزیابی جداگانه هستند.

۵-۲ انتخاب رویکرد ارزیابی

در این استاندارد تخمین عدم قطعیت اندازه‌گیری در شرایط تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی (دقت میانی) صورت می‌گیرد. تحت این شرایط، مولفه‌های عدم قطعیت شناسایی می‌شوند و می‌توان از هر دو رویکرد مولفه‌ای و کلی‌نگر استفاده‌کرد. استفاده از نمونه طبیعی حائز اهمیت می‌باشد.

هر دو رویکرد عدم قطعیت اندازه‌گیری بیان‌شده در این استاندارد، اصولاً باید نتایج یکسانی را ارائه دهند. دلایل عینی زیادی برای ترجیح یک رویکرد نسبت به دیگری وجود دارد. ترجیحات ذهنی یا درخواست مشتریان یا الزام مقام احراز صلاحیت هرکدام می‌توانند دلایل با اهمیتی باشند. اگر هرکدام از رویکردهای دیگر بیان شده در بند ۵-۱ تناسب بیش‌تری با سیستم و داده‌های کنترل‌کیفیت آزمایشگاه داشته باشند، ممکن‌است هیچ‌کدام از این دو رویکرد انتخاب نشود.

هم‌چنین اگر آزمایشگاهی قبلاً یک سیستم کنترل‌کیفی خوبی برای پایش جزئیات روش اجرایی آزمون داشته باشد، احتمالاً دارای مناسب‌ترین داده‌ها برای محاسبه و بررسی عدم قطعیت مولفه‌ای است. در غیر این‌صورت رویکرد کلی‌نگر روش سریع‌تری جهت شروع برای تخمین عدم قطعیت است.

براساس مشاهدات اخیر به نظر می‌رسد که دو مولفه عدم قطعیت عملیاتی بزرگ‌تر از بقیه باشند. یکی از آن‌ها واریانس نمونه‌برداری فرعی (اثر ماتریکس) در مواد جامد است و دیگری تاثیر گرم‌خانه‌گذاری در اکثر روش‌های آزمون است. واریانس نمونه‌برداری فرعی هم‌چنین اثر توزیع ذرات در نمونه‌های جامد را افزایش می‌دهد. در جمعیت‌های میکروبی پیچیده و هنگام استفاده از روش‌های انتخابی ضعیف، اثر گرم‌خانه‌گذاری می‌تواند همان اهمیت تاثیر توزیع ذرات را داشته باشد، و حال آن‌که در صورت وجود روش آزمون انتخابی مناسب، جمعیت میکروبی ساده، و سهولت در شناسایی وضعیت ظاهری کلنی‌ها، اثر گرم‌خانه‌گذاری بی‌اهمیت می‌شود.

تاثیر گرم‌خانه‌گذاری را می‌توان با بررسی امکان توزیع نامتناسب شمارش‌های موازی در سوسپانسیون نهایی ارزیابی کرد. چنین آزمون‌هایی صرف‌نظر از آن‌که کدام رویکرد ارزیابی ترجیح داده شود به حجم داده‌های کنترل‌کیفی آزمایشگاه‌ها بستگی دارد. بنابراین ارزیابی تاثیر مولفه گرم‌خانه‌گذاری معمولاً بدون هیچ ترتیبات خاصی امکان‌پذیر است.

در نمونه‌های آب به نظر نمی‌رسد که واریانس نمونه‌برداری فرعی به صورت معنی‌داری از واریانس توزیع پواسون بیش‌تر باشد. دیگر نمونه‌های مایع و مواد پودری نرم می‌توانند در این دسته قرار بگیرند. در آزمایشگاه‌هایی که کنترل کیفیت براساس جزئیات روش اجرای آزمون پایه‌گذاری شده است، تخمین عدم قطعیت را می‌توان از داده‌های کنترل‌کیفی موجود و معمول ارزیابی‌کرد. در یک چنین حالتی استفاده از رویکرد کلی‌نگر زائد و غیر ضروری می‌باشد.

در نمونه‌های جامد وضعیت متفاوت است. بین نمونه‌های فرعی توزیع نامتناسب و معنی‌داری وجود دارد و این یک اصل است. در این حالات، انتخاب رویکرد کلی‌نگر با مولفه نمونه‌برداری فرعی باید به کمک یک برنامه عملی خاص مورد توجه قرار بگیرد. کارهای عملی اختصاص‌یافته برای ارزیابی واریانس نمونه‌برداری فرعی (پیوست – ح) از لحاظ آماری تا اندازه‌ای طراحی پیچیده‌تری نسبت به کارهای عملی کلی‌نگر (پیوست - ج) دارد. سؤالی که به نظر می‌رسد این است که کدام پارامتر برای ارزیابی مفیدتر است، عدم قطعیت عملیاتی کلی‌نگر یا واریانس نمونه‌برداری فرعی. انتخاب به ترجیحات ذهنی بستگی دارد.

ارزیابی واریانس عملیاتی با رویکرد کلی‌نگر براساس عمل ریاضی تفریق قرار دارد. هرچه مولفه عملیاتی در مقایسه با عدم قطعیت توزیع کوچک‌تر باشد نادرستی نسبی آن بزرگ‌تر است. رویکرد کلی‌نگر در شمارش‌های کم نسبت به رویکرد مولفه‌ای کارآیی کم‌تری دارد. این امر یک وضعیت شاخص در نمونه‌های آب است. با افزایش یکنواختی نمونه‌ها، کارآمدی رویکرد کلی‌نگر به طور افزاینده‌ای بهبود می‌یابد. هر زمان که واریانس عملیاتی از واریانس توزیع بیش‌تر شود، انتخاب رویکرد کلی‌نگر معنی‌دارتر خواهد بود. چنین وضعیتی در نمونه‌های جامد احتمال بروز دارد.

زمانی‌که تخمین عدم قطعیت شامل اریبی بین آزمایشگاهی باشد، ارزیابی آن برمبنای داده‌های کالیبراسیون داخلی توسط کار با نمونه‌های مرجع مشابه برای همه آزمایشگاه‌ها صورت می‌گیرد. درچنین حالاتی آزمون‌ها می‌توانند فقط بر مبنای رویکرد کلی‌نگر پایه‌گذاری شوند. در این حالت مولفه‌های عدم قطعیت به درستی قابل شناسایی نیست. این نحوه ارزیابی در دامنه کاربرد این استاندارد قرار ندارد، برای اطلاع بیش‌تر به کتاب‌نامه شماره ۱۲ مراجعه شود.

۵-۳ انتخاب نحوه بیان و کاربرد عدم قطعیت اندازه‌گیری

مشتریان، ارگان‌های تایید صلاحیت و آزمایشگاه‌ها ممکن است انتظارات متفاوتی از اطلاعات عدم قطعیت اندازه‌گیری داشته باشند. مشاهده چنین الزاماتی تعیین می‌کند که آیا عدم قطعیت بایستی به‌صورت عدم قطعیت عملیاتی، عدم قطعیت مرکب، عدم قطعیت گسترده یا بازه‌ای بر مبنای عدم قطعیت گسترده اندازه‌گیری و در شکل یکی از مقیاس‌های اندازه‌گیری ارائه شود. موارد استفاده و نحوه بیان مرتبط با هر یک از کاربردها در پیوست –س ذکر شده است.

۶ رویکرد مولفه‌ای جهت ارزیابی عدم قطعیت عملیاتی

۶-۱ کلیات

در تخمین مولفه‌ای، عوامل منفرد موثر در عدم قطعیت اندازه‌گیری (نمونه‌برداری فرعی، رقیق‌سازی، تلقیح، گرم‌خانه‌گذاری و خواندن نتایج) به‌صورت جداگانه ارزیابی شده و با استفاده از قانون تعمیم عدم قطعیت با کمک روابط ریاضی ترکیب می‌شوند (کتاب‌نامه شماره ۷). از لحاظ محاسباتی به معنای مجموع ریشه‌های مربعات عدم قطعیت مولفه‌ها است. زمانی‌که مولفه‌ها تحت شرایط تجدیدپذیری در داخل یک آزمایشگاه تعیین می‌گردند، تخمین حاصل را می‌توان تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی نام‌گذاری کرد.

۶-۲ شناسایی مولفه‌های عدم قطعیت

تفکر آماری ساختار عدم قطعیت در شمارش‌های میکروبیولوژی دارای سه لایه است : پیش، هنگام، و بعد از تهیه سوسپانسیون نهایی (بند ۳-۳).
عدم قطعیت پیش از تهیه سوسپانسیون نهایی شامل تغییرات مربوط به نمونه‌برداری فرعی و ماتریکس به‌علاوه رقیق‌سازی است. کمیت‌های اثرگذار پیش از تهیه سوسپانسیون نهایی متناسب با غلظت میانگین، روی عدم قطعیت مرکب اثر می‌گذارند. هر تغییر اضافه‌ای در نمونه‌برداری فرعی یا هنگام رقیق‌سازی اتفاق بیافتد به همان نسبت به میانگین غلظت سوسپانسیون نهایی منتقل می‌شود.
عدم قطعیت هنگام تهیه سوسپانسیون نهایی شامل توزیع تصادفی ذرات در سوسپانسیون است که همراه با توزیع کلنی‌ها در پلیت و مشارکت احتمالی عدم قطعیت آزمون‌های تاییدی جزئی مجموعاً تغییرات ذاتی را تشکیل می‌دهند. تغییرات ذاتی در عدم قطعیت عملیاتی مشارکت ندارند.

تغییرات بعد از تولید سوسپانسیون نهایی شامل عدم قطعیت در ارتباط با خواندن نتایج و اثرات محیط گرم‌خانه‌گذاری و زمان بر روی نتایج است. عدم قطعیت‌ها می‌تواند هم شامل نوع افزوده‌شده (مثل آلودگی ثانوی) و هم عنصر دیگر متناسب با این وضعیت باشد (مثل عدم قطعیت شمارش).
آزمون‌ها و مثال‌ها از تخمین کمی مولفه‌های عدم قطعیت همراه با جزئیات در پیوست‌ها ذکر شده‌اند. مولفه‌های واریانس تاثیرات نمونه‌برداری فرعی و گرم‌خانه‌گذاری نیازمند آزمون‌های ویژه‌ای است. سه مولفه عملیاتی دیگر با روش‌های اجرایی کنترل‌کیفی قابل دست‌یابی هستند.

۳-۶ ارزیابی

زمانی که مولفه‌ها مستقل هستند (از لحاظ آماری گسسته هستند) و کمیت‌ها تاثیرگذاری افزاینده دارند، عدم قطعیت عملیاتی نسبی از روی واریانس نسبی مجموع مربعات واریانس نسبی به دست می‌آید. واریانس عملیاتی نسبی مرکب از مجموع واریانس‌های نسبی مولفه‌ها به کمک فرمول شماره ۲ حاصل می‌شود :

$$u^2_{o,rel} = u^2_{rel,M} + u^2_{rel,F} + u^2_{rel,V} + u^2_{rel,I} + u^2_{rel,L} \qquad (۲)$$

معانی علائم در جدول (۱) ذکر شده‌است. جزئیات دستور کار ارزیابی عملی مولفه‌ها در پیوست‌های بیان شده در همین جدول تشریح شده‌اند.

جدول ۱- معنی نشانه ها (علائم)

مراحل آزمون	مولفه	علامت	چگونگی تعیین آنها
۱	ماتریکس و نمونه‌برداری	$u_{rel,M}$	پیوست ح
۲	فاکتور رقت	$u_{rel,F}$	پیوست ذ
۳	آزمونه	$u_{rel,V}$, $u_{rel,\sum V}$	پیوست‌های خ و د
۴	گرم‌خانه‌گذاری	$u_{rel,I}$	پیوست ز
۵	شمارش	$u_{rel,L}$	پیوست ر

عدم قطعیت مراحل یک تا سه آزمون خیلی به روش‌ها و کاربر وابستگی ندارد اما می‌تواند تحت تأثیر مواد و تجهیزات باشد. با یک بار تخمین‌زدن، مقدار آن‌ها را می‌توان به صورت مکرر و برای روش‌های مختلف آزمون میکروبیولوژی مورد استفاده قرار داد.
در مرحله چهارم، عدم قطعیت وابسته به شرایط گرم‌خانه‌گذاری (دما، اتمسفر و زمان) و ارگانیسم هدف است، اما وابسته به کاربر نیست. این مرحله می‌تواند به محیط کشت مغذی نیز وابسته باشد. این مرحله برای هر روش، اختصاصی است.

در مرحله پنجم، عدم قطعیت وابسته به کاربر یا تجهیزات مورد استفاده برای شناسایی و شمارش است.

۷ رویکرد کلی‌نگر برای تعیین عدم قطعیت عملیاتی

۷-۱ کلیات

اگر همه کمیت‌هایی که نتیجه یک اندازه‌گیری به آن‌ها بستگی دارد با هم متفاوت باشند، عدم قطعیت آن‌ها را می‌توان به شیوه آماری ارزیابی کرد (کتاب‌نامه شماره ۷). این نظریه اساس رویکرد کلی‌نگر است. طراحی یک کار تجربی کلی‌نگر نه‌تنها نیازمند بینش خوب در شناخت کمیت‌های تاثیرگذار است بلکه هم‌چنین یک طرح خوب آن‌ها را به یک مسیر واقعی و موجه سوق می‌دهد.
رویکرد کلی‌نگر ارائه شده در این استاندارد براساس مدل بیان شده در استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶ (کتاب‌نامه شماره ۶) قرار دارد و مفهوم آن این‌است که تمامی فرایند آزمون از مرحله تهیه سوسپانسیون اولیه تا شمارش نهایی در دو مرتبه تکرار می‌شود. در صورت امکان از نمونه‌های با بار میکروبی طبیعی استفاده می‌شود و تنها تغییر ایجاد شده مربوط به نحوه محاسبه است.
دقت میانگین‌ها به تعداد نمونه‌های آزمون شده بستگی دارد. براساس استاندارد ملی شماره ۹۶۰۶، نتایج حاصل از ۱۰ نمونه می‌تواند داده‌های لازم را تأمین نماید. ولی در این استاندارد حداقل ۳۰ نمونه و ترجیحاً بیش‌تر از آن توصیه شده است.
تخمین عدم قطعیت کلی‌نگر باید به‌صورت مجزا برای هر روش آزمون، هر نوع ماتریکس و هر میکروارگانیسم هدف انجام شود. برای به دست‌آوردن یک تخمین واقعی و نشان‌دهنده تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی، عوامل مهم و تاثیرگذار در روند آزمون بایستی متفاوت باشند (بند۴-۳).
در استاندارد ملی شماره ۹۶۰۶ در کل، تخمین عدم قطعیت اعتباربخشی شده تحت شرایطی به دست می‌آید که عدم قطعیت توزیع (ذاتی) ناچیز تصور شده است. در صورتی‌که شمارش‌ها کم باشد یا حتی شمارش بالا بوده ولی واریانس نمونه‌برداری فرعی کم باشد، این شرایط برقرار نیست. به‌همین دلیل رویکرد کلی‌نگر اصلاح نشده برای آب، روش‌های MPN و شمارش در سطح کم در کل مناسب نیست و اصلاح رویکرد اصلی پیشنهاد شده است.
اصلاحات پیشنهادی در محاسبات به این صورت است که بخش‌های پایدارتر یعنی واریانس عملیاتی توسط عمل ریاضی تفریق کردن (بند۷-۲) تخمین زده شود. به این ترتیب محدودیت مربوط به شمارش کم، اصلاح می‌شود. در رویکرد کلی‌نگر تا آنجا که ممکن است بهتر است از موارد شمارش کم و آزمون‌های تأییدی

جزئی اجتناب کرد، زیرا سبب افزایش بی‌دقتی در تخمین عدم قطعیت عملیاتی می‌شوند. اگر این امر غیرقابل اجتناب است اثر آن‌ها بایستی با افزایش نمونه‌های در دست بررسی جبران شود.

۷-۲ ارزیابی

متغیری که در ابتدا تعیین می‌شود، عدم قطعیت استاندارد مرکب است. اگر عملیات تحت شرایط تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی صورت گرفته باشد می‌توان آن را عدم قطعیت استاندارد تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی، $S_{R'}$ (در مقیاس لگاریتم اعشاری) نام‌گذاری کرد. جزئیات طراحی و اجرای این آزمایشات در پیوست -ج بیان شده است.

بعد از تبدیل $S_{R'}$ به مقیاس لگاریتم طبیعی با فرمول $u_{R',rel}$ =۲/۳۰۳$s_{R'}$ و با عمل تفریق مقدار واریانس ذاتی (عدم قطعیت توزیع) $u^2_{o,rel}$ از واریانس تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی $u^2_{d,rel}$ ، واریانس عملیاتی نسبی تخمین زده می‌شود (پیوست ب-۹) :

$$u^2_{o,rel} = u^2_{R',rel} - u^2_{d,rel} \qquad (۳)$$

که در آن :

$u_{d,rel}$ تخمین عدم قطعیت توزیع استاندارد نسبی

$u_{R',rel}$ عدم قطعیت تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی استاندارد نسبی است.

در شمارش کلنی معمولا فرض بر این است که توزیع پواسون یک مدل موجه‌ای برای بیان واریانس توزیع شمارش نهایی است.

یادآوری۱- در استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶ چنین ذکر شده است که عدم قطعیت‌های تجدیدپذیری استاندارد حاصل از روش‌های عملیات کنترل عملکرد بین آزمایشگاهی و آزمون‌های مهارت می‌تواند همان نقش S_R را ایفا نماید. متغیر مذکورکه همان عدم قطعیت تجدیدپذیری بین‌آزمایشگاهی استاندارد است هیچ ارتباطی به هیچ‌کدام از نتایج آزمون آزمایشگاه‌های مشارکت‌کننده ندارد. در کتاب‌نامه شماره ۱۲ مواردی از کاربرد داده‌های برنامه‌های بین آزمایشگاهی در ارزیابی عدم قطعیت پیشنهاد شده است.

بر طبق استاندارد ملی شماره ۹۶۰۶ ، تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی با مقیاس لگاریتم اعشاری محاسبه می‌شود. برای این منظور ابتدا مقدار $s^2_{R'}$ محاسبه شده وسپس طبق فرمول زیر به لگاریتم طبیعی تبدیل می‌شود : $u_{R',rel}$ = ۵/۳۰۱۹ × $s^2_{R'}$

برای اطلاع بیش‌تر به پیوست –ب مراجعه کنید.

محاسبات بدون لگاریتم‌گیری نیز امکان‌پذیر است (پیوست – خ).

در کل رویکرد کلی‌نگر برای هر نوع شمارش میکروبیولوژی امکان‌پذیر است. اگرچه در مورد تخمین عدم قطعیت توزیع از شفافیت برخوردار نیست. بنابراین توصیه می‌شود در مواردی‌که عدم قطعیت توزیع سهم زیادی از عدم قطعیت کل را در رویکرد کلی‌نگر به خود اختصاص می‌دهد از کاربرد این رویکرد اجتناب شود.

در کل شمارش‌های کم، شمارش‌های MPN و شمارش‌های ناشی از آزمون‌های تأییدی جزئی از جمله این موارد هستند. استفاده از عامل ریاضی تفریق در پیوست – ج تشریح شده است.

یادآوری۲- اگر تعداد قابل ملاحظه‌ای از مجموعه تکرار آزمون‌ها با یک رقت موجود، همه محدوده شمارش کلنی‌ها را پوشش دهد می‌توان از رویکرد رگرسیون استفاده‌کرد (کتاب‌نامه شماره ۴).

تخمین واریانس عملیاتی نسبی، K از روی شیب خط رگرسیون در نمودار رسم شده، برحسب نسبت واریانس به میانگین برای میانگین تعداد کلنی‌ها ، n_C توسط فرمول شماره ۴ به‌دست‌می‌آید :

$$K = a + u^2_{\mathrm{o,rel}}\bar{n}_c \qquad (۴)$$

که در آن $u^2_{\mathrm{o,rel}}$ تخمین واریانس عملیاتی نسبی است.

مزیت رویکرد رگرسیون این است که اگر توزیع تعداد نهایی کلنی‌ها بعد از گرم‌خانه‌گذاری با توزیع پواسون هم‌خوانی نداشته باشد، نگران‌کننده نیست. تخمین $u^2_{\mathrm{o,rel}}$ احتمالاً قابل استنادتر از مقدار به‌دست آمده با تفریق است.

۸ عدم قطعیت مرکب در نتایج آزمون

۸-۱ اصل اساسی

تغییرپذیری (عدم قطعیت مرکب) نتیجه نهایی، $u_{c,rel}(y)$ به‌وسیله ترکیب‌کردن تخمین تغییرپذیری عملیاتی با تغییرپذیری ذاتی که به مشاهده نتایج شمارش (شمارش کل، شمارش تایید شده‌ها، یا تخمین MPN) بستگی دارد و با فرمول شماره ۵ به‌دست می‌آید :

$$\mathrm{u_{c,rel}(y)} = \sqrt{u^2_{o,rel} + u^2_{d,rel}} \qquad (۵)$$

که در آن :

$u_{\mathrm{o,rel}}$ عدم قطعیت عملیاتی استاندارد نسبی تحت شرایط تجدیدپذیری میانی

$u_{\mathrm{d,rel}}$ عدم قطعیت استاندارد ذاتی نسبی نتیجه آزمون، است.

این اصل برای هر دو رویکردهای کلی‌نگر و مولفه‌ای ثابت است. هم‌چنین تغییرات ذاتی در هر دو حالت مشابه هستند. اختلاف، در متفاوت بودن نحوه تعیین تغییرپذیری عملیاتی در دو رویکرد می‌باشد. اختلاف دیگر آن است که در رویکرد کلی‌نگر، لگاریتم اعشاری مقیاس بهتری است ولی در رویکرد مولفه‌ای از لگاریتم طبیعی یا مقیاس بازه‌ای استفاده می‌شود.

۸-۲ تغییرپذیری عملیاتی

در رویکرد کلی‌نگر تنها عدم قطعیت عملیاتی به ازاء ترکیبی از ماتریکس و میکروب هدف تخمین‌زده می‌شود. زمانی‌که یک‌بار مقدار آن برای یک روش معین محاسبه شود، می‌توان آن مقدار را برای هر نمونه تحت آزمون دیگر تعمیم داد، مگر آن‌که در آینده تغییرات عمده‌ای در تجهیزات، کاربران یا روش آزمون پیش بیاید. برای تخمین عدم قطعیت عملیاتی به پیوست –ج مراجعه کنید.

جزییات روش‌های اجرایی برای تعیین تک‌تک مولفه‌ها در رویکرد مولفه‌ای در پیوست - ح و پیوست - ز و تخمین عدم قطعیت عملیاتی مرکب در پیوست –چ ذکر شده‌اند.

۸-۳ تغییرپذیری ذاتی

برای اطلاع از مشروح توضیحات نحوه تعیین مولفه ذاتی برای شمارش‌های عادی به پیوست - پ، شمارش کلنی‌های تایید شده به پیوست- ث و سیستم‌های MPN به پیوست-ت مراجعه کنید.

۸-۴ عدم قطعیت مرکب

برای اطلاع از مولفه‌ها، عدم قطعیت مرکب و گسترده و موارد کاربرد عدم قطعیت اندازه‌گیری به پیوست -ژ مراجعه کنید.

۸-۵ حالت های بینابینی

زمانی که مولفه‌ای در عدم قطعیت مرکب غالب باشد، امکان حذف مولفه کوچک‌تر وجود دارد (بند ۳-۴-۲). این امر به ویژه در مواردی که تغییرپذیری عملیاتی مولفه معنی‌داری باشد، دارای اهمیت است. بنابراین، تغییرپذیری ذاتی را می‌توان نشان‌دهنده عدم قطعیت مرکب در نظر گرفت و نیازی به انجام هیچ‌گونه کار تجربی نخواهد بود. این تخمین‌ها از نتایج آزمون‌ها با فرض توزیع پواسون یا دیگر توزیع‌ها (در مورد MPN، یا تایید جزئی کلنی‌ها) به‌دست می‌آید.

در آزمون ارگانیسم‌های شاخص در نمونه‌های آب به روش‌های سنتی شمارش کلنی یا سیستم MPN مشابه چنین حالات بینابینی برقرار می‌باشد (کتاب‌نامه شماره ۳). در بعضی مواد مایع یا پودری نیز بدون شک چنین حالتی وجود دارد به‌ویژه وقتی که شمارش کلنی‌ها اعداد کوچکی باشد.

پیوست الف

(اطلاعاتی)

نمادها و تعاریف

μ میانگین (میانگین حسابی)

F فاکتور رقت سری‌های رقت

f فاکتور رقت در یک مرحله رقت

K نسبت واریانس به میانگین (نسبت Lexis) s^2/μ

k فاکتور پوشش

L تعداد شمارش‌شده

n تعداد تکرار مشاهدات، تعداد موضوع شناسایی

n_+ تعداد لوله‌های مثبت

n_c تعداد کلنی‌ها

n_q تعداد کل قسمت‌ها

n_s تعداد انتخابی قسمت‌ها

n_z شمارش، تعداد ورودی‌های ناپیوسته (سلول‌ها، کلنی‌ها، لوله‌های مثبت و غیره)

s عدم قطعیت استاندارد آزمون براساس سری مشاهدات

s_R عدم قطعیت استاندارد تجدیدپذیری تجربی

s_R' عدم قطعیت استاندارد تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی

T_0 حدود پایین‌تر تخمین بازه‌ای

T_1 حدود بالاتر تخمین بازه‌ای

U عدم قطعیت گسترده، $U = ku_c(y)$

U_{rel} عدم قطعیت استاندارد نسبی گسترده $U_{rel} = ku_{c,rel}(y)$

u عدم قطعیت استاندارد

u_c عدم قطعیت استاندارد مرکب

$u_{c,rel}(y)$ عدم قطعیت استاندارد مرکب نسبی

$u_{d,rel}$ عدم قطعیت توزیع نسبی

$u_{o,rel}$ عدم قطعیت استاندارد مولفه‌ای عملیاتی نسبی، پراکندگی بالا

u_{rel} عدم قطعیت استاندارد نسبی $u_{rel} = s/\bar{x} = u/\mu$

u^2_{rel} واریانس نسبی، مربع عدم قطعیت استاندارد نسبی

$u_{R',rel}$ عدم قطعیت استاندارد نسبی تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی

V حجم

x یک کمیت ورودی، یک مقدار اندازه‌گیری شده، شمارش کلنی تأیید شده

y یک کمیت خروجی، نتیجه نهایی آزمون

پیوست ب

(الزامی)

قواعد کلی ترکیب‌کردن مولفه‌های عدم قطعیت

ب-۱ کلیات

مفهوم غامض "قانون تعمیم عدم قطعیت" بیان‌شده در کتاب‌نامه شماره ۷، با ورود کوواریانس پیچیده‌تر می‌شود. تا هنگامی‌که مولفه‌های عدم قطعیت غیروابسته به یکدیگر هستند (از لحاظ آماری گسسته)، کوواریانس‌ها در حد صفر می‌باشند و محاسبات ساده‌تر است. بیش‌ترین مولفه‌های عدم قطعیت در روش‌های آزمون میکروبیولوژی را می‌توان غیروابسته یا با وابستگی ضعیف قلمداد کرد و ساده‌سازی مسأله، قابل پذیرش است. عدم قطعیت مرکب مولفه‌های غیر وابسته از مجموع ریشه دوم مثبت واریانس‌های هریک از عدم قطعیت‌های تک‌تک مولفه‌ها به دست می‌آید. کمیتی که به آن مجموع ریشه توان دوم‌ها می‌گویند.

عدم قطعیت مجموع‌ها و تفریق‌ها با هم‌دیگر در یک مقیاس بازه‌ای و حاصل‌ضرب و حاصل تقسیم آن‌ها در مقیاس اندازه‌گیری نسبی (یا لگاریتم طبیعی) جمع می‌شود.

تخمین عدم قطعیت در برخی اوقات نیازمند حاصل جمع و حاصل ضرب است. به منظور کاستن از امکان بروز پیچیدگی هنگام کار با این دو مقیاس اندازه‌گیری، از علائم مختلف u و u_{rel} برای عدم قطعیت استفاده می‌شود. ارتباط میان نماد مطلق، u و نماد نسبی، u_{rel} به‌صورت عدم قطعیت X $u_x = u_{\mathrm{rel},x}$ است که X مقدار اندازه‌گیری شده (یا میانگین) کمیت است. علاوه بر این از علامت s برای اشاره به عدم قطعیت استاندارد تجربی به دست آمده براساس یک‌سری از نتایج استفاده می‌شود.

برای دانستن نوع مقیاس اندازه‌گیری به‌کارگرفته شده، ارتباط ریاضی نتایج آزمون با مقادیر کمی ورودی باید به صورت معادلات ریاضی بیان شود.

ب-۲ قوائد اساسی برای ترکیب‌کردن دو مولفه غیر وابسته عدم قطعیت

فرض کنید که مقادیر دو کمیت غیر وابسته A و B و عدم قطعیت‌های استاندارد u_A و u_B یا عدم قطعیت استاندارد نسبی $u_{\mathrm{rel},A}$ و $u_{\mathrm{rel},B}$ آن‌ها معلوم است.

عدم قطعیت مرکب کمیت‌ها با معادلات جبری پایه A + B, A – B, AB و A/B به نحوی که در ادامه شرح داده شده است قابل محاسبه است.

ب-۳ عدم قطعیت استاندارد مجموع، A + B

$$u_{A+B} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} \qquad (ب-۱)$$

عدم قطعیت استاندارد نسبی مجموع

$$u_{\mathrm{rel},A+B} = \frac{u_A + B}{A+B} \qquad (ب-۲)$$

ب-۴ عدم قطعیت استاندارد تفاضل، A - B

عدم قطعیت استاندارد تفاضل مشابه مجموع است

$$u_{A-B} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} \qquad (ب-۳)$$

اما عدم قطعیت استاندارد نسبی متفاوت است

$$u_{rel,A-B} = \frac{u_{A-B}}{A-B} \qquad (ب-۴)$$

ب-۵ عدم قطعیت استاندارد حاصل‌ضرب ، AB

$$u_{AB} = AB\sqrt{\frac{u_A^2}{A^2} + \frac{u_B^2}{B^2}} = AB\sqrt{u_{rel,A}^2 + u_{rel,B}^2} \qquad (ب-۵)$$

عدم قطعیت استاندارد نسبی

$$u_{rel,AB} = \frac{u_{AB}}{AB} = \sqrt{u_{rel,A}^2 + u_{rel,B}^2} \qquad (ب-۶)$$

ب-۶ عدم قطعیت استاندارد تقسیم ، A/B

$$u_{A/B} = \frac{A}{B}\sqrt{\frac{u_A^2}{A^2} + \frac{u_B^2}{B^2}} = \frac{A}{B}\sqrt{u_{rel,A}^2 + u_{rel,B}^2} \qquad (ب-۷)$$

عدم قطعیت استاندارد نسبی تقسیم مشابه حاصل ضرب است

$$u_{rel,A/B} = \frac{u_{A/B}}{A/B} = \sqrt{u_{rel,A}^2 + u_{rel,B}^2} \qquad (ب-۸)$$

ب-۷ بسط معادله‌ها به بیش از دو مولفه

عدم قطعیت مجموع و یا تفاضل بیش از دو مولفه با بسط‌دادن فرمول‌های ب-۳ و ب-۴ به دست می‌آید. به‌عنوان مثال برای مجموع $y = A + B - C$ عدم قطعیت ترکیب شده به صورت زیر است.

$$u_c(y) = \sqrt{u_A^2 + u_B^2 + u_C^2} \qquad (ب-۹)$$

برای حاصل ضرب و تقسیم قانون حاصل از (ب-۵) و (ب-۶) به کار می‌آید. مولفه منفرد به صورت عدم قطعیت نسبی عنوان می‌شود. به عنوان مثال، عدم قطعیت نسبی ترکیب‌شده حاصل‌ضرب $y = AB/C$ به‌صورت فرمول (ب-۱۰) است.

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{rel,A}^2 + u_{rel,B}^2 + u_{rel,C}^2} \qquad (ب-۱۰)$$

زمانی که محاسبه شامل مجموع و حاصل ضرب است باید در ابتدای عملیات مواظب بود که از مقیاس درست استفاده شود.

ب-۸ محاسبه متغیرهای وابسته

زمانی‌که دو متغیر به هم وابسته باشند مقدار عدم قطعیت مرکب آن با متغیرهای غیروابسته تفاوت دارد. مطابق فرمول کلی ب - ۱۱ همبستگی مثبت عدم قطعیت افزایش یافته و همبستگی منفی آن کاهش می‌یابد.

$$u_{A+B} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2 + 2r_{cc}u_A u_B} \qquad (ب-۱۱)$$

که در آن u_A و u_B به ترتیب عدم قطعیت‌های A و B و r_{cc} ضریب همبستگی بین عدم قطعیت‌ها هستند.
در نتایج آزمون میکروبیولوژی همیشه اطلاعات مربوط به همبستگی (یا کوواریانس) دو کمیت تاثیرگذار در دسترس قرار ندارد.

ب-۹ تبدیل‌های ریاضی

در میکروبیولوژی معمول است که نتایج آزمون‌ها یا شمارش‌ها قبل از محاسبات ریاضی به لگاریتم تبدیل شوند. بخش قابل توجه‌ای از اطلاعات علمی مربوط به دقت نتایج آزمون‌های میکروبیولوژی معمولاً در مقیاس لگاریتم اعشاری گزارش می‌شود. در میکروبیولوژی آب معمولاً از لگاریتم استفاده نمی‌شود. عدم قطعیت‌های استاندارد، در مقیاس بازه‌ای یا نسبی و در صورت امکان به صورت درصد بیان می‌شود.
عدم قطعیت نسبی یک کمیت، تقریباً معادل با عدم قطعیت مطلق آن در لگاریتم طبیعی است. بنابراین پیش از محاسبه عدم قطعیت، استفاده از لگاریتم طبیعی یکی از راه‌های تبدیل نتایج به مقیاس نسبی آن است،

$$u_{rel}(y) \approx u(\ln y)$$

چنین نتیجه مشابهی از رابطه $u_{rel}(y) = u(y)/y$ نیز به دست می‌آید. اگرچه تخمین‌های محاسبه شده در مقیاس بازه‌ای معمولاً به صورت دقیق شبیه به محاسبات با استفاده از لگاریتم‌های طبیعی نیستند ولی تفاوت قابل توجه‌ای ندارند.
اغلب هنگام محاسبه و ترکیب‌کردن مولفه‌های عدم قطعیت تبدیل یک مقیاس به مقیاس دیگر ضروری است. تبدیل‌کردن از لگاریتم اعشاری به طبیعی (پایهe) با ضریب تبدیل امکان‌پذیر است. مقدار این ضریب 2.30259 است ولی برای مقاصد تجربی از تقریب ۲٫۳۰۳ یا ۲٫۳ استفاده می‌شود . ضریب تبدیل لگاریتم طبیعی به لگاریتم اعشاری $1/2.30259 = 0.4343$ است.
برای تبدیل واریانس‌ها از یک لگاریتم به لگاریتم دیگر، از توان دوم ضریب تبدیل استفاده می‌شود. تبدیل اعشاری به لگاریتم طبیعی برابر است با $(2.30259)^2 = 5.3019$، تبدیل طبیعی به لگاریتم اعشاری برابر است با $(0.4343)^2 = 0.1886$.

ب-۱۰ محاسبه واریانس نسبی

فراوان‌ترین عملیات ریاضی مورد استفاده در این استاندارد برای تخمین عدم قطعیت‌ها، محاسبه واریانس نسبی بین دو مقدار (x_1 و x_2) است. مقادیر محاسبه شده در مقیاس‌های متفاوت در ادامه بیان شده‌اند.
معادله استاندارد عبارت است از :

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

وقتی $n = ۲$ باشد، واریانس می‌شود :

$$s^2 = \frac{(x_1 - x_2)^2}{2}$$

و واریانس نسبی برابر است با :

$$u^2_{rel} = \frac{s2}{\bar{x}^2}$$

میانگین برابر است با ۲ / $(x_2 + x_1)$، و واریانس نسبی در مقیاس بازه‌ای به صورت زیر است :

$$u^2_{rel} = 2 \times \left(\frac{x_1 - x_2}{x_1 + x_2}\right)^2 \qquad (ب-۱۲)$$

با گرفتن میانگین لگاریتمی به مقیاس نسبی تبدیل می‌شود. از این پس واریانس نسبی با استفاده از لگاریتم طبیعی به‌دست می‌آید :

$$u^2_{rel} = \frac{(\ln x_1 - \ln x_2)^2}{2} \qquad (ب-۱۳)$$

با استفاده از لگاریتم اعشاری :

$$s^2 = \frac{(\lg x_1 - \lg x_2)^2}{2} \qquad (ب-۱۴)$$

نماد s از کتاب‌نامه شماره ۱ در پیوست - الف و استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶ آمده است تبدیل s^2 و u^2_{rel} به یکدیگر با استفاده از رابطه زیر امکان‌پذیر است:

$$u^2_{rel}\,(2.303)^2 = 5.302s^2$$

ب-۱۱ مثال

زمانی که شمارش در بیش از یک پلیت انجام می‌شود، غلظت میکروبی سوسپانسیون نهایی با تقسیم مجموع کلنی‌های شمارش‌شده بر مجموع حجم آزمونه‌ها به‌دست می‌آید.

$$y = \frac{\sum nc}{\sum V} \qquad (ب-۱۵)$$

به منظور تخمین عدم‌قطعیت نتیجه y، عدم قطعیت‌های استاندارد دو جمع $\sum_{nc}$ و $\sum_V$ مورد نیاز هستند. نحوه محاسبه آن‌ها در (ب- ۱) بیان شده است.

تخمین y نتیجه عمل تقسیم است. عدم قطعیت آن از روی عدم قطعیت‌های استاندارد نسبی $\sum_{nc}$ و $\sum_V$ طبق روش ارائه شده در(ب-۶) به دست می‌آید.

فرض کنید نتیجه شمارش دو پلیت موازی تلقیح شده با ۰/۱ ml از سوسپانسیون نهایی برابر $n_{c1} = 45$ و $n_{c2} = 35$ می‌باشد . نتیجه کالیبراسیون نشان می‌دهدکه عدم قطعیت استاندارد نسبی اندازه‌گیری 0.1ml،% 3 است.

با پذیرش توزیع پواسون در سوسپانسیون نهایی، هر شمارش کلنی هم‌زمان، تخمینی از میانگین و واریانس جمعیت میکروبی است (در توزیع پواسون واریانس و میانگین با یکدیگر برابرند). بنابراین، عدم قطعیت استاندارد جمع برابر است با :

$$u_{rel,\Sigma nc} = n_{c1} + n_{c2} = \Sigma n_c = 80$$

$$u_{\Sigma nc} = \sqrt{n_{c1} + n_{c2}} = \sqrt{\sum n_c} = \sqrt{45 + 35} = \sqrt{80} \qquad (ب-۱۶)$$

عدم قطعیت نسبی جمع به‌صورت زیر است :

$$u_{rel,\Sigma nc} = \frac{\sqrt{\Sigma nc}}{\Sigma nc} = \frac{۱}{\sqrt{\Sigma nc}} = \frac{1}{\sqrt{80}} = 0.1118 = 11.2\ \% \qquad (ب-۱۷)$$

به منظور محاسبه عدم قطعیت استاندارد مجموع آزمونه‌ها، عدم قطعیت ۰/۱ ml بایستی به صورت میلی‌لیتر بیان‌شود. ٪ ۳ از ۰/۱ ml برابر ۰/۰۰۳ ml است. مقدار عدم قطعیت ۰/۲ ml ($\sum V$) از رابطه زیر به‌دست می‌آید.

$$u_{\sum V} = \sqrt{0.003^2 + 0.003^2} = 0.0042\text{ml} \qquad (ب-۱۸)$$

و بنا بر این عدم قطعیت نسبی $\sum V$ برابر است با $\sum V\ u_{rel} = 0.0042\ \text{ml}/0.2\text{ml} = 0.021\ (2.1\ \%)$.

با داشتن مقدار عدم قطعیت استاندارد نسبی در مجموع شمارش‌ها (۰/۱۱۲) و عدم قطعیت استاندارد مجموع آزمونه‌ها (۰/۰۲۱)، می‌توان عدم قطعیت استاندارد نسبی تقسیم آن‌ها را به کمک فرمول ب-۶ محاسبه نمود.

$$u_{rel,y} = \sqrt{0.112^2 + 0.021^2} = 0.114 = 11.4\ \% \qquad (ب-۱۹)$$

پیوست پ

(الزامی)

تغییرپذیری ذاتی - عدم قطعیت توزیع نسبی شمارش کلنی‌ها

پ-۱ کلیات

برای تحت پوشش قراردادن تعداد ذرات در نمونه‌های فرعی توسط توزیع پواسون می‌توان فرض‌کرد که سوسپانسیون نهایی به اندازه کافی مخلوط و یکنواخت شده است. تغییرپذیری ذاتی غیر قابل اجتناب که هم‌چنین می‌توان آن را عدم قطعیت توزیع نامید بستگی به میانگین تعداد ذرات یا کلنی‌های شمارش‌شده در آزمونه‌های کشت داده شده دارد. در ادامه مباحث فرض می‌شود که هر تعداد n_c ذرات زنده (واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی) کشت داده شده در پلیت، به‌همان تعداد n_c کلنی‌های قابل مشاهده در پلیت نتیجه می‌دهد.

پ-۲ عدم قطعیت نسبی یک شمارش کلنی منفرد

در یک سوسپانسیون ایده‌آل به‌خوبی مخلوط شده، میانگین و واریانس تعداد ذرات با هم برابرند. این قاعده در توزیع‌هایی کاربرد دارد که آزمایه یک بخش کوچکی از حجم کل را تشکیل می‌دهد. به‌دلیل مساوی بودن میانگین و واریانس توزیع "پواسون نامحدود"، واریانس نسبی یک شمارش کلنی n_c از فرمول پ-۱ به دست می‌آید.

$$u^2_{d,rel} = \frac{1}{n_c} \qquad \text{(پ-۱)}$$

با تبدیل آن به مقیاس لگاریتم اعشاری به صورت زیر در می‌آید :

$$u^2_{d(lg)} = 0.1886 \times u^2_{d,rel} = \frac{0.1886}{n_c}$$

مثال: فرض‌کنید n_c = ۳۶ کلنی قابل مشاهده در یک پلیت باشد.

براساس فرمول پ-۱، واریانس توزیع نسبی به صورت زیر محاسبه می‌شود :

$$u^2_{d,rel} = \frac{1}{36} = 0.0278 \qquad \text{(پ-۲)}$$

مقدار تبدیل‌شده به لگاریتم اعشاری آن معادل ۰٫۰۰۵۲ = ۰٫۰۲۷۸ × ۰٫۱۸۸۶ است .

چنانچه آزمونه بخش بزرگی (بیش از ٪ ۵ تا ٪۱۰) از نمونه‌های آزمایشگاهی (غیر از بخش رقت نهایی) باشد، واریانس توزیع نسبی بایستی در فاکتور تصحیح محدود نمونه همانند فرمول پ- ۳ ضرب شود (کتاب‌نامه شماره ۱۵).

$$u^2_{d,rel} = \frac{1}{n_c}\left(\frac{V - V_{tp}}{V}\right) \qquad \text{(پ-۳)}$$

که در آن :

n_c تعداد کلنی‌های مشاهده شده؛

V_{tp} حجم آزمونه برحسب نمونه آزمایشگاهی؛

V حجم نمونه آزمایشگاهی است.

در نمونه‌های آب و روش‌های فیلتراسیون غشایی، استفاده‌از حجم‌های بزرگ نمونه فرعی عادی و معمول است.

یادآوری- برخی اوقات کل نمونه آزمایشگاهی در آزمون مصرف می‌شود (Vtp = V). در چنین حالاتی ضریب اصلاح نمونه محدود، صفر شده و از لحاظ نظری واریانس توزیع وجود ندارد.

پ-۳ عدم قطعیت نسبی مجموع شمارش‌ها

زمانی که چند آزمونه (مانند پلیت‌های موازی) از سوسپانسیون نهایی یکسانی مشتق شوند، تخمین کمی چگالی باکتریایی با تقسیم مجموع همه کلنی‌ها بر مجموع حجم آزمونه‌ها محاسبه می‌شود.

به‌دلیل اضافه‌شدن توزیع پواسون، تغییرپذیری ذاتی به‌صورت معکوس متناسب با مجموع شمارش‌ها است. واریانس نسبی توسط فرمول پ-۴ به دست می‌آید.

$$u^2_{d,rel} = \frac{1}{\sum n_{ci}} \qquad \text{(پ-۴)}$$

که $\sum n_{ci}$ مجموع تعداد کلنی‌های مشاهده شده است.

مجموع حجم آزمونه‌ها می‌تواند بخش بزرگی از نمونه آزمایشگاهی باشد. بهتر است ضریب تصحیح نمونه محدود بر $u^2_{d,rel}$ تاثیر داده شود (کتاب‌نامه شماره ۱۴). در این حالت فاکتور تصحیح برابر است با :

$$u^2_{d,rel} = \frac{1}{\Sigma n_{ci}} \left(\frac{V - \Sigma V_{tp}}{V}\right) \qquad \text{(پ-۵)}$$

که $\sum V_{tp}$ مجموع حجم آزمونه‌ها برحسب نمونه آزمایشگاهی است.

مثال- شمارش‌های انجام‌شده از چهار پلیت به‌صورت دوتایی از دو رقت متوالی به دست آمده است. حجم آزمونه تلقیح‌شده در هر پلیت ۱ ml است . حجم کل رقت نهایی ۱۰۰ ml می‌باشد و تصحیح نمونه محدود لازم نیست.

رقت	شمارش	مجموع
$۱۰^{-۴}$	۱۸۵/۱۵۶	۳۴۱
$۱۰^{-۵}$	۱۷/۲۲	۳۹
جمع کل n_c =	۳۸۰	

واریانس توزیع پواسون نسبی $u^2_{d,rel} = \frac{1}{380} = 0.0026$ است.

و مقدار آن در مقیاس لگاریتم اعشاری معادل با $0.1886 \times 0.0026 = 0.00049$ است.

پیوست ت

(الزامی)

تغییرپذیری ذاتی تخمین‌های MPN

ت-۱ کلیات

حتی اگر بپذیریم که توزیع پواسون در همه سوسپانسیون‌های روش MPN غالب می‌باشد، به‌دلیل اضافه‌شدن عنصر احتمال دو جمله‌ای، تغییرپذیری ذاتی مقدار MPN افزایش پیدا می‌کند.

جدول‌های معمول MPN مستقیماً قادر به تخمین عدم قطعیت نیستند. این جداول معمولاً تخمین‌هایی از حدود بالاتر و پایین‌تر از ٪۹۵ اطمینان را ارائه می‌نمایند که از روی آن‌ها می‌توان عدم قطعیت را محاسبه کرد. برخی از برنامه‌های کامپیوتری می‌توانند علاوه بر حدود اطمینان ٪ ۹۵، عدم قطعیت استاندارد MPN را نیز برحسب لگاریتم اعشاری به دست آورند. این مقدار با ضرب در ۲٫۳۰۳ (پیوست ب) تبدیل به تخمین عدم قطعیت استاندارد نسبی، u_{rel} می‌شود.

برای روش‌های MPN تک‌رقتی بدون کمک گرفتن از برنامه‌های کامپیوتری امکان محاسبه عدم قطعیت توسط معادله ارائه شده در کتاب‌نامه شماره (۱۷) وجود دارد.

ت-۲ محاسبه عدم‌قطعیت از روی حدود اطمینان

مقدار عدم قطعیت توزیع نسبی را می‌توان توسط سطح بالاتر، T_1 و پایین‌تر، T_0 حدود اطمینان به‌کمک فرمول ت-۱ محاسبه کرد.

$$u^2_{d,rel} = \frac{lnT1 - lnT0}{2 \times 1.96} = \frac{lnT1 - lnT0}{3.92} \qquad (ت-۱)$$

فرمول تعیین عدم قطعیت استاندارد در مقیاس لگاریتم اعشاری به صورت زیر است :

$$u_{d(lg)} = \frac{lgT1 - lgT0}{3.92} \qquad (ت-۲)$$

که در آن :

$u_{d,rel}, u_{d(lg)}$ به ترتیب ریشه دوم واریانس‌های مورد جستجوی $u^2_{d,rel}, u^2_{d(lg)}$ ؛

T_0 محدوده پایین‌تر حدود اطمینان ٪ ۹۵ ؛

T_1 محدوده بالاتر حدود اطمینان ٪ ۹۵ است.

ت-۳ محاسبه توسط فرمول در حالت تک‌رقتی

در این حالت از فرمولی که منطبق با کتاب‌نامه شماره ۱۷ است ، برای محاسبه عدم قطعیت استاندارد تخمین لگاریتمی MPN استفاده می‌شود :

$$u(\ln M) = \frac{1-\exp(-MV)}{MV\sqrt{n+\exp(-MV)}}$$ (ت-۳)

که در آن :

M مقدار MPN به ازاء هر میلی‌لیتر؛

V حجم نمونه در هر لوله بر حسب میلی‌لیتر؛

n_+ تعداد لوله‌های مثبت است .

اگر علامت بیش‌ترین احتمال، M با فرمول آن در محاسبه بیش‌ترین تعداد احتمالی جایگزین شود، محاسبات ساده‌تر می‌شوند:

$$u(\ln M) = \frac{n_+}{\ln[n/n-n_+]\sqrt{nn_+(n-n_+)}}$$ (ت-۴)

که در آن :

n تعداد کل لوله‌ها؛

$u_{d,rel} = u(\ln M)$ عدم قطعیت توزیع نسبی است .

اگر عدم قطعیت در لگاریتم اعشاری مورد نیاز باشد می‌تواند به صورت زیر به‌دست آید:

$$u_{d(lg)} = \frac{u(\ln M)}{2.303} = 0.4343\ u(\ln M)$$

ت-۴ مثال

ت-۴-۱ مقدمه

فرض‌کنید سیستم MPN، یک سیستم تجاری تک‌رقتی و ۵۰ چاهکی باشد. ۱۰۰ ml از نمونه کشت داده شده است و در ۲۳ چاهک بعد از انکوباسیون حالت مثبت دیده شود. با مراجعه به جدول MPN مرتبط اطلاعات زیر به‌دست می‌آید :

لوله‌های مثبت	MPN /۱۰۰ ml	حد پایین‌تراطمینان ٪۹۵	حد بالاتر اطمینان ٪۹۵
۲۳	۳۱	۲۰	۴۷

ت-۴-۲ محاسبه با فرمول

برای به‌کارگیری فرمول ت-۴ داده‌های ورودی لازم عبارتند از : n = ۵۰ ، n_+ = ۲۳

$$u(\ln M) = \frac{23}{\ln[\,50/(50-23)]\sqrt{50\times(50-23)}} = 0.2118 \approx 0.21$$ (ت-۵)

ت-۴-۳ محاسبه از روی حدود اطمینان

تخمین عدم قطعیت توزیع نسبی از روی حدود اطمینان به صورت زیر است:

$$u_{d,rel} = \frac{\ln 47 - \ln 20}{3.92} = 0.218 \approx 0.22$$

خروجی حاصل از برنامه کامپیوتری (کتاب‌نامه شماره ۱۸) در چنین حالتی برابر است با:

لوله‌های مثبت	MPN /۱۰۰ ml	حد پایین‌تراطمینان٪۹۵	حد بالا تر اطمینان٪۹۵	انحراف استاندارد lg(MPN)
۲۳	۳۰/۸	۲۰/۳	۴۶/۷	۰/۰۹۱۹۹

از این اعداد داریم:

$$u_{\mathrm{d,rel}} = \frac{\ln 46.7 - \ln 20.3}{3.92} = 0.2125 \approx 0.21$$

با تبدیل عدم قطعیت استاندارد درمقیاس لگاریتم اعشاری MPN به لگاریتم طبیعی مقادیر مشابهی به‌دست می‌آید :

$$2.303 \times 0.09199 = 0.2119 \approx 0.21$$

یادآوری- واریانس نسبی نظری توزیع پواسون با میانگین ۳۰/۸ عبارت‌است از، $1/30.8 = 0.0325$ ، که ریشه دوم آن ۰/۱۸ می‌باشد. مقایسه آن با مقادیر ۰/۲۱... ۰/۲۲ محاسبه شده در بندهای ت-۴-۲ و ت-۴-۳ نشان می‌دهد که توزیع پواسون همیشه یک مدل مناسبی برای تعیین مقادیر عدم قطعیت در روش MPN نیست.

پیوست ث

(الزامی)

تغییرپذیری ذاتی (عدم قطعیت استاندارد) در شمارش‌های تأییدی

ث-۱ کلیات

برخی از روش‌های آزمون انتخابی، به صورت مطلوب اختصاصی نیستند. زمانی‌که اعلام نتیجه از وضوح و صراحت برخوردار نیست (کم‌تر از٪۸۰)، نتایج احتمالی باید با آزمون‌های دیگر تایید شود. در روش کنترل عملکرد و مطالعات مشترک بین آزمایشگاهی، تأیید تک‌تک کلنی‌ها ممکن است الزامی باشد. در کارهای روزمره و تکراری، آزمایشگاه‌ها ترجیح می‌دهند که از تأیید جزئی یا خلاصه شده استفاده‌کنند که بر اساس آن تعداد کمی از کلنی‌های احتمالی به‌صورت تصادفی برای تأیید برداشته می‌شود.

فرض کنید تعداد n_z کلنی از کل n_c کلنی احتمالی، آزمون شده‌اند و تعداد n_k از آن‌ها دارای نتایج تأییدی مثبت است. از روی تعداد نسبی حاصل از رابطه n_z/n_k با ضرب در n_c تعداد کلنی‌های تأییدشده به‌دست می‌آید.

ث-۲ تأیید کل کلنی‌ها

در تأیید کل کلنی‌ها، تعداد کلنی‌های لازم برای تأیید مستقیماً به‌دست می‌آید:

$$x = \frac{n_k}{n_c} n_c = n_k$$

در این وضعیت، تغییرپذیری ذاتی (عدم قطعیت استاندارد) در شمارش تایید شده را می‌توان به صورت شمارش معمول کلنی‌ها با استفاده از تابع توزیع پواسون (ث-۱) برای جمعیت‌های نامحدود محاسبه کرد.

$$u_{\mathrm{rel,x}} = \sqrt{\frac{1}{n_k}} \qquad \text{(ث-۱)}$$

اگر آزمونه بخش معنی‌داری از نمونه‌ی آزمایشگاهی را تشکیل می‌دهد، می‌توان ضریب جمعیت‌های محدود را همانند روش بیان شده در پیوست پ در محاسبه وارد نمود.

ث-۳ تأیید جزئی از کلنی‌ها

ث-۳-۱ کلیات

وقتی که تعداد زیادی کلنی احتمالی وجود داشته باشد، پیشنهادات و عملیات متفاوتی برای انتخاب تصادفی زیرمجموعه n_z از مجموعه n_c، ($n_z > n_c$) وجود دارد. در روش MPN درصورت امکان، تأیید جزئی انجام نمی‌شود.

ث-۳-۲ انتخاب تعداد ثابت یا نسبی

از معمول‌ترین روش‌های تأیید جزئی، انتخاب تصادفی تعداد n_z کلنی ازپیش انتخاب‌شده برای آزمایش است ($n_z > n_c$). انتخاب‌کردن یک بخش از کلنی‌ها یا ریشه دوم تعداد کلنی‌های احتمالی توصیه نمی‌شود.

نتیجه نهایی که تخمینی از کلنی‌های تأییدشده ارگانیسم هدف در هر پلیت، x می‌باشد، از فرمول ث-۲ به‌دست می‌آید:

$$x = \frac{n_k}{n_c} n_c \qquad \text{(ث-۲)}$$

که در آن :

n_c تعداد کلنی‌های احتمالی

n_z تعداد کلنی‌های برداشت شده جهت تایید

n_k تعداد تأیید شده مثبت است.

تعداد کلنی‌های احتمالی، n_c به غلظت احتمالی ارگانیسم هدف در نمونه‌های آزمایشگاهی بستگی‌دارد که با عدم قطعیت توزیع پواسون قابل‌توجیه است. نتیجه عملیات تأییدی، n_z/n_k که تخمینی از کلنی‌های مثبت است با عدم قطعیت توزیع دو جمله‌ای یا هندسی قابل توجیه می‌باشد. از مرکب‌کردن عدم قطعیت‌های مذکور، عدم قطعیت شمارش تایید شده ارگانیسم هدف حاصل می‌شود.

فرمول ث-۳ نشان می‌دهد که واریانس نسبی توزیع پواسون شمارش احتمالی و واریانس‌نسبی دوجمله‌ای حاصل از آزمون تاییدی، با هم ادغام شده و عدم قطعیت استاندارد نسبی تقریبی در شمارش نهایی تخمین‌زده می‌شود.

$$u_{\text{rel,x}} = \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{n_z - n_k}{n_k n_z}} \qquad \text{(ث-۳)}$$

یادآوری- بیشتر نظریه‌های موشکافانه آماری در رابطه با تأیید جزئی، فرمول اصلاح شده‌ای را برای حالت توزیع دوجمله‌ای واریانس نسبی n_k/n_z ارائه داده‌اند (کتاب‌نامه شماره ۱۳ و ۱۵). با این فرمول تخمین عدم قطعیت استاندارد نسبی کلنی‌های تأیید شده در بیشتر حالات تا اندازه‌ای کم‌تر از مقدار به دست‌آمده از فرمول ث-۳ خواهد شد.

$$u_{\text{rel,x}} = \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{(n_k+0.5)(n_z-n_k+0.5)n_z^2}{(n_z+1)^2(n_z+2)n_k^2}} \qquad \text{(ث-۴)}$$

ث-۳-۳ روش قطاعی تصادفی

در این روش تأییدی جایگزین، با تقسیم سطح پلیت به قطاع‌های مساوی، n_q از حجم کار کاسته می‌شود. همه کلنی‌های یک یا تعداد بیشتری از قطاع‌های انتخاب شده تصادفی در معرض آزمون تأییدی قرار می‌گیرند. تعداد قطاع‌ها، n_s به اندازه‌ای انتخاب می‌شود که میانگین تعداد کلنی‌های احتمالی در مجموع قطاع‌ها معنی‌دار باشد. لازم نیست که تعداد واقعی همه کلنی‌های احتمالی پلیت شمرده شود. اگرچه با غفلت از این عمل، عدم قطعیت شمارش‌های تأیید شده تا حدی افزایش می‌یابد.

توسط روش قطاعی تصادفی جایگزین، همه کلنی‌های یک آزمایه که در محدوده n_s/n_q آزمونه اصلی قراردارند، تایید کامل می‌شوند. تعداد کل کلنی‌های برداشت شده (n_s) متفاوت است و از قبل نمی‌توان درباره آن تصمیم‌گیری کرد. آن را می‌توان یک نمونه تصادفی از سوسپانسیون نهایی مشابه همان n_c دانست، اما اصل آن آزمایه‌ای است که n_s/n_q بار کوچک‌تر از n_c است.

در نتیجه، تخمین شمارش نهایی ارگانیسم هدف به‌ازاء هر پلیت، x با استفاده از فرمول ث-۵ محاسبه می‌شود.

$$x = \frac{n_k}{(n_s V/n_q)} = \frac{n_k n_q}{n_s V} \qquad (ث-۵)$$

که در آن :

n_q تعداد قطاع‌های تقسیم شده سطح پلیت؛

n_s تعداد قطاع‌های انتخاب شده؛

n_k مجموع کلنی‌های تأیید شده در قطاع‌های n_s؛

V حجم آزمونه برحسب میلی‌لیتر است.

فرمول محاسبه نتیجه نهایی شامل هیچ‌کدام از تعداد اولیه کلنی‌های احتمالی، n_c و تعداد جداسازی شده برای تایید، n_z نیست. همه اطلاعات مرتبط با عدم قطعیت تخمینی در تعداد کلنی‌های تأیید شده، n_k وجوددارد. عدم قطعیت توزیع نسبی با روشی مشابه تأیید کامل (ث-۱) محاسبه می‌شود.

$$u_{rel,x} = \sqrt{\frac{1}{n_k}} \qquad (ث-۶)$$

که در آن ، n_k تعداد کلنی‌های تایید شده است.

اگر کاربر در دانستن تعداد کل کلنی‌های احتمالی، n_c و تعداد برداشت شده جهت تأیید، n_z دچار دردسر گردیده است، روش قطاعی تصادفی فقط با دانستن مقدار n_k انتخاب مناسبی است (بند ث-۳-۱). در حالت عادی محاسبه تعداد تأیید شده نهایی با استفاده از همه اطلاعات و توسط فرمول $x = n_k n_c / n_z$ مناسب‌تر است. اطلاعات بیش‌تر، سبب تخمین عدم قطعیت کم‌تر می‌شود. در این خصوص فرمول‌های ث-۳ و ث-۴ را می‌توان به‌کار گرفت.

ث-۳-۴ اصلاح نمونه محدود

اگر آزمونه بیشتر از ٪۱۰ نمونه آزمایشگاهی را تشکیل می‌دهد، نتیجه تخمین $u^2_{rel,x}$ را می‌توان در فاکتور اصلاح نمونه محدود ضرب کرد (بند پ-۲).

ث-۴ مثال

تعداد پنج کلنی، n_z به صورت تصادفی از کل n_c = ۵۰ کلنی‌های احتمالی مشاهده‌شده انتخاب شد. چهارکلنی، n_k به صورت مثبت تأیید شدند. تخمین و شمارش نهایی $x = 50\ (4/5) = 40$ انجام شد.

عدم قطعیت توزیع نسبی در شمارش تاییدشده‌ها به صورت زیر است:

$$u_{rel,x} = \sqrt{\frac{1}{50} + \frac{5-4}{4\times 5}} = \sqrt{\frac{1}{50} + \frac{1}{20}} = \sqrt{0.02 + 0.05} = 0.26 \qquad (ث-۷)$$

با استفاده از فرمول پیشرفته ث-۴، عدم قطعیت توزیع نسبی در شمارش تایید شده به صورت زیر است :

(ث-۸)

$$u_{rel,x} = \sqrt{\frac{1}{50} + \frac{(4+0.5)(5-4+0.5)\times 5^2}{(5+1)^2(5+2)\times 4^2}} = \sqrt{\frac{1}{50} + \frac{168.75}{4032}} = \sqrt{0.02 + 0.0419 = 0.25}$$

البته مقدار آن اندکی کم‌تر به دست‌می‌آید.

بیش‌ترین سهم عدم قطعیت ٪۲۶ را عدم قطعیت تأیید تشکیل‌می‌دهد. اگر تک‌تک کلنی‌ها با نتایج k = ۴۰ تایید شده بودند، عدم قطعیت تأیید آن صفر شده و عدم قطعیت نسبی نتایج، $\sqrt{(1/40)} = 0.16$ خواهد بود.

پیوست ج

(الزامی)

رویکرد کلی‌نگر برای تعیین عدم قطعیت‌های عملیاتی و مرکب

ج-۱ کلیات

اصلی‌ترین ایده رویکرد کلی‌نگر در استاندارد ملی شماره ۹۶۰۶، تخمین عدم قطعیت نتایج نهایی آزمون با انجام دادن کل فرایند آزمون در دو تکرار می‌باشد. چندین نمونه مشابه مورد مطالعه و بررسی قرار می‌گیرند. برای به دست‌آوردن میانگین قابل اطمینان نتایج، بهتر است که حداقل ۳۰ نمونه در طول زمان بررسی‌شوند. اولین تخمین عدم قطعیت عملیاتی را بعد از بررسی ۱۰ نمونه می‌توان انجام داد. پروتکل آزمون و محاسبات برای دست‌یابی تدریجی به داده‌ها مناسب می‌باشد.

با جایگزینی درست کاربران، تجهیزات، و شرایط گرم‌خانه‌گذاری در روش کار اصلی می‌توان به تخمینی دست یافت که نمایان‌گر عدم قطعیت استاندارد تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی (تجهیزات + زمان + اپراتور متفاوت) باشد (کتاب‌نامه شماره ۲). با یک‌بار تخمین عدم قطعیت، مقدار آن به عنوان یک تخمین معتبر برای همه آزمون‌های یک میکروارگانیسم هدف در نوع خاصی از ماتریکس و با همان روش آزمون مورد پذیرش است. هنگامی‌که تغییری در عوامل مؤثر اتفاق بیافتد ارزیابی مجدد موردنیاز خواهد بود.

رویکرد کلی‌نگر اصلی دارای مشکلاتی در آزمون‌های میکروبیولوژی است، زیرا عدم قطعیت توزیع که از مولفه‌های غیر قابل اغماض واریانس است در این حالت مورد ارزیابی قرار نمی‌گیرد. در نتیجه طرح کلی‌نگر اصلی به‌طورکلی برای شمارش‌های کم به‌ویژه در روش‌های MPN و تأیید جزئی چندان مناسب نمی‌باشد.

مشکل کم بودن تعداد شمارش را می‌توان با اصلاح رویکرد کلی‌نگر حل‌کرد. مولفه پایدارتر عدم قطعیت عملیاتی از عدم قطعیت استاندارد تجدیدپذیری هر نمونه در ضمن کار عملی استخراج می‌شود. به‌نظرمی‌رسد که متوسط (ریشه دوم میانگین) عدم قطعیت عملیاتی محاسبه شده از چندین آزمایه تهیه شده از یک نوع نمونه مشابه، به اندازه کافی پایدار باشد که بتواند تجزیه و تحلیل‌های لازم را ارائه نماید. چون ارزیابی براساس تفریق است، این تخمین‌ها دقیق نیستند. در نتیجه مقادیر به دست‌آمده با شمارش‌های کم می‌توانند تا حد زیادی نادقیق باشند. بنابراین توصیه شده است که از این رویکرد برای شمارش‌های کم، سیستم‌های MPN و شمارش‌های تاییدشده جزئی استفاده نشود. اگر تخمین عدم قطعیت عملیاتی در دسترس باشد، شمارش کم یا روش MPN مسأله‌ای نیستند. در استفاده روزمره از تخمین حاصل از رویکردهای مولفه‌ای و کلی‌نگر هیچ تفاوتی وجودندارد. هر دو رویکرد در تأیید جزئی کلنی‌های احتمالی کاربرد دارند.

هر گاه در آینده عدم قطعیت استاندارد در نتایج آزمون مورد نیاز باشد، عدم قطعیت عملیاتی با عدم قطعیت توزیع مرتبط، u_d ترکیب شده طبق فرمول ج-۱ و به صورت عدم قطعیت مرکب به نتیجه آزمون، y نسبت‌داده می‌شود.

$$u^2_c(y) = u^2_o + u^2_d \qquad (ج-۱)$$

که درآن :

u_o عدم قطعیت عملیاتی استاندارد؛

u_d توزیع عدم قطعیت توزیع پذیرفته شده است.

از تجربه کلی‌نگر یک تخمین منطقی و موجه از عدم قطعیت عملیاتی به دست می‌آید.

ج-۲ تفاهم‌نامه[1] تجربی

طرح تعیین عدم قطعیت استاندارد تجدیدپذیری در نتایج نهایی آزمون‌های میکروبیولوژی توسط رویکرد کلی‌نگر در استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶ تعیین شده است. این مدل مشابه با مدل‌های شیمی است. در میکروبیولوژی مرسوم است که محاسبات با استفاده از لگاریتم اعشاری انجام شود.

به دلایل عملی و جهت ساده نمودن محاسبات، کار تجربی پیشنهادی فقط مرکب از دو آزمون مستقل در هر نمونه است. تعداد زیادی از نمونه‌های مشابه بایستی مورد مطالعه قرار بگیرند. چالش موجود، برپایی نوعی شرایط تجربی است که تخمین حاصله بتواند از نقطه‌نظر لگاریتمی، عدم قطعیت استاندارد تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی را مورد رسیدگی قرارداده باشد.

براساس استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶، شرایط آزمون در دو تکرار بهتر است تا حد امکان متفاوت بوده و به صورت ایده‌آل دربرگیرنده کلیه تفاوت‌هایی باشد که در روزهای مختلف از نظر کاربران، بهرهای محیط کشت‌ها و محلول‌ها، تجهیزات و زمان آزمون در آزمایشگاه اتفاق می‌افتد. وجود تفاوت احتمالی بهتر است به این نحو تفسیر شود که "هر تعداد کمیت فنی تاثیرگذار" که امکان دارد. برای هر نمونه دو کاربر متفاوت، یک آزمونه (نمونه‌های فرعی از نمونه آزمایشگاهی یکسان) را برداشته و از آن یک سوسپانسیون اولیه تهیه می‌کنند و یک‌بار مورد آزمون قرار می‌دهند. لازم نیست که همین دو کاربر همه نمونه‌ها را آزمون‌کنند. بهتر است که دو کاربر از تجهیزات و مواد مختلف برای آزمون استفاده کنند.

با حداقل پنج مولفه عدم قطعیت عملیاتی، طراحی یک عملیات تجربی بر پایه دو تکرار، نمی‌تواند همه مولفه‌های متفاوت را در یک شرایط متعادل آماری دربر داشته باشد. تغییرکمیت‌های اثرگذار نظیر تجهیزات یکنواخت‌کردن سوسپانسیون اولیه، موقعیت درون گرم‌خانه و زمان گرم‌خانه‌گذاری، بهرهای مختلف محیط‌های کشت مغذی و محلول‌ها را می‌توان تنها به صورت تقریبی با انتخاب‌هایی آرایش داد. با وجود این هیچ اطمینانی به دستیابی به شبیه‌سازی تغییر وجود ندارد. برای اطلاع بیش‌تر به پیوست – ز مراجعه شود.

ج-۳ محاسبات

ج-۳-۱ عدم قطعیت استاندارد تجدیدپذیری مرکب

در این پیوست محاسبات در مقیاس لگاریتم اعشاری صورت‌می‌گیرد. برای هر نمونه، دو نتیجه آزمایش به‌دست می‌آید. یعنی به ازاء هرکاربر، یک نتیجه. واریانس تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی را می‌توان از روی نتایج حاصل، محاسبه و تخمین‌زد. محاسبات در مقیاس لگاریتمی، این اطمینان را می‌دهند که مقدار

1 Protocol

پارامترها به غلظت ارگانیسم هدف (رقت‌ها) حساس نیستند. علاوه بر این می‌توان آن‌را از روی شمارش‌های اصلی محاسبه کرد.

مقیاس لگاریتم اعشاری نوعی مقیاس نسبی است. با این‌وجود در این پیوست از زیرنویس[1] ''rel'' در ارتباط با تخمین عدم قطعیت استفاده نمی‌شود. این امر به‌منظور جلوگیری از سردرگمی با بخش‌های دیگر این استاندارد است، زیرا زیر نویس ''rel'' نشان‌دهنده انحراف استانداردها در مقیاس لگاریتم طبیعی است. برای تغییر نتایج نهایی از مقیاس لگاریتم اعشاری به عدم قطعیت استاندارد نسبی، امکان تبدیل آن به لگاریتم طبیعی وجود دارد. برای این‌منظور به مثال ج-۵-۱ و ج-۵-۲ مراجعه‌کنید.

از روی نتایج تجارب کلی‌نگر پایه و با استفاده از فرمول ج-۲ می‌توان عدم قطعیت تجدیدپذیری استاندارد را برای هر مثال، محاسبه کرد:

$$u^2_{\acute{R}} = \frac{(lgn_{c1} - lgn_{c2})^2}{2} \qquad (ج-۲)$$

که در آن :

n_{c1} تعداد کلنی‌ها در اولین تکرار؛

n_{c2} تعداد کلنی‌ها در دومین تکرار، است.

پارامترهای تعیین‌شده برای هر نمونه به عنوان تخمین واریانس تجدیدپذیری استاندارد نسبی پذیرفته می‌شود. برای استفاده در محاسبات آتی، هم‌چنان که در مثال زیر آمده است مواظب باشید که عدم قطعیت‌های مرتبط (عملیاتی، توزیعی و مرکب) را در مقیاس لگاریتمی مشابه بیان‌کنید.

ج-۳-۲ عدم قطعیت توزیع

تغییرپذیری ذاتی اندازه‌گیری ناشی از توزیع ذرات برای هرنمونه، i در مقیاس لگاریتم اعشاری به‌کمک فرمول ج-۱ تخمین‌زده می‌شود.

$$u^2_{d_i} = \frac{0.1886 \times 2}{n_{c1i} + n_{c2i}} = \frac{0.1886}{\bar{n}_{ci}} \qquad (ج-۳)$$

که $\bar{n}_{ci}$ میانگین شمارش کلنی‌ها به ازای هر پلیت در نمونه i است.

میانگین حسابی در واریانس توزیع در نمونه‌ها از فرمول ج-۴ به دست‌می‌آید.

$$u^2_d = \frac{\sum_{i=1}^{n} u^2_{di}}{n} \qquad (ج-۴)$$

که n تعداد نمونه‌ها است.

ج-۳-۳ میانگین عدم قطعیت عملیاتی

عدم قطعیت عملیاتی با تفریق میانگین واریانس توزیعی از میانگین واریانس تجدیدپذیری طبق فرمول ج-۵ تخمین زده می‌شود. توجه داشته باشید که هر دو در مقیاس لگاریتم طبیعی بیان می‌شوند.

$$u^2_o = u^2_{\acute{R}} - u^2_d \qquad (ج-۵)$$

عمل تفریق برای هر نمونه به تنهایی می‌تواند اعمال شود و تفاوت میانگین به‌عنوان آخرین مرحله، محاسبه

1 Subscript

می‌شود. در روشی دیگر، جهت محاسبه می‌توان ابتدا به تعیین میانگین u^2_d و $u^2_{Ŕ}$ پرداخت و سپس آن‌ها را از یکدیگر تفریق کرد. هر دو انتخاب در مثال بعدی تشریح شده‌اند.

یادآوری- زمانی‌که از رویکرد کلی‌نگر در روش MPN استفاده می‌شود، متوسط واریانس توزیع برحسب میانگین واریانس‌های نسبی دو تکرار تخمین MPN، همانند روش تعیین‌شده در پیوست – ت محاسبه می‌شود.

ج-۴ عدم قطعیت استاندارد مرکب نتیجه آزمون

هرگاه تخمین کلی‌نگر عدم قطعیت عملیاتی برای یک نوع نمونه معین در دسترس باشد، می‌تواند برای دست‌یابی به تخمین عدم قطعیت مرکب برای هر نتیجه آزمون جدید دارای روش کار یکسان، مورد استفاده قرار بگیرد. عدم قطعیت نسبی مرکب از نتیجه نهایی آزمون توسط فرمول ج-۶ زیر محاسبه می‌شود .

$$u_c(y) = \sqrt{u^2_d + u^2_o} \qquad (ج-۶)$$

که در آن :

u_o میانگین عدم قطعیت عملیاتی نسبی برای نوع نمونه معین و متغیر؛

u_d عدم قطعیت توزیع نسبی (تغییر ذاتی) شمارش، است.

لازم است u_o و u_d با مقیاس‌های یکسانی بیان شوند.

عدم قطعیت توزیع بدون انجام هیچ نوع کار تجربی و فقط از طریق توزیع آماری حاصل می‌شود. در روش‌های میکروبیولوژی مقدار این متغیرها وابسته به شمارش‌های مشاهده شده است و برای هرکدام از روش‌های شمارش کلنی و MPN متفاوت است (پیوست‌های پ و ت).

یادآوری- برخی اوقات نتایج میکروبیولوژی با آزمون تعداد محدودی از مجموعه کلنی‌های احتمالی تأیید می‌شوند که اصطلاحاً به آن تأیید جزئی می‌گویند. در چنین حالاتی عدم قطعیت تأیید، یک مولفه اضافه‌شده عمده‌ای است که از نوع تغییرات ذاتی می‌باشد و به مقدار قابل ملاحظه‌ای دقت تخمین عدم قطعیت مرکب را کاهش می‌دهد (پیوست ث).

ج-۵ مثال ها

ج-۵-۱ مثال ۱ : روش شمارش کلنی – محاسبه با لگاریتم‌های اعشاری

چندین نمونه به‌صورت مستقل توسط دو کاربر مورد آزمون قرارگرفتند. برای هر نمونه هر کاربر یک آزمونه را برداشته و یک سوسپانسیون اولیه از آن تهیه می‌کند و یک‌بار مورد آزمون قرار می‌دهد.

هر کاربر رقت‌های شاهد پلیت‌های محیط‌کشت از هر بهر را به‌صورت تصادفی انتخاب‌کرده و پلیت‌ها به‌صورت تصادفی در موقعیت‌های انتخاب‌شده درون گرم‌خانه‌ها قرار داده‌می‌شوند. پلیت‌ها پس از پایان زمان گرم‌خانه‌گذاری که آن‌هم به‌صورت تصادفی تعیین‌شده است، برای شمارش خارج می‌شوند. هر کاربر نتیجه شمارش پلیت‌ها را خوانده و یادداشت می‌کند. نتایج (شمارش کلنی‌ها) شش نمونه در جدول ج-۱ نشان داده‌شده‌است.

جدول ج-۱ محاسبه با لگاریتم اعشاری

شماره نمونه	رقت[۱]	n_{c1}	n_{c2}	$lg\ n_{c1}$	$lg\ n_{c2}$	$u^2_{R'}$	U^2_d	u^2_o

۱	-۴	۵	۸	۰٫۶۹۹۰	۰٫۹۰۳۱	۰٫۰۲۰۸	۰٫۰۲۹۰	-۰٫۰۰۸۲
۲	-۳	۱۵	۱۱	۱٫۱۷۶۱	۱٫۰۴۱۴	۰٫۰۰۹۱	۰٫۰۱۴۵	-۰٫۰۰۵۴
۳	-۴	۱۱	۱۹	۱٫۰۴۱۴	۱٫۲۷۸۸	۰٫۰۲۸۲	۰٫۰۱۲۶	۰٫۰۱۵۶
۴	-۶	۲۱	۳۹	۱٫۳۲۲۲	۱٫۵۹۱۱	۰٫۰۳۶۱	۰٫۰۰۶۳	۰٫۰۲۹۸
۵	-۵	۶۸	۴۵	۱٫۸۳۲۵	۱٫۶۵۳۲	۰٫۰۱۶۱	۰٫۰۰۳۳	۰٫۰۱۲۸
۶	-۴	۱۵۱	۲۰۳	۲٫۱۷۹۰	۲٫۳۰۷۵	۰٫۰۰۸۳	۰٫۰۰۱۱	۰٫۰۰۷۲
میانگین						۰٫۰۱۹۸	۰٫۰۱۱	۰٫۰۰۸۶

۱- وقتی مقیاس لگاریتم است، نیازی به نوشتن رقت‌ها نیست.

یادآوری- از لحاظ نظری، واریانس هرگز منفی نیست. اگرچه وقتی‌که تخمین واریانس از راه تفریق به دست می‌آید و بررسی واریانس تجربی بر اساس تکرارهای کم صورت‌گرفته باشد، امکان دارد که واریانس منفی شود.

فرمول محاسبه واریانس عملیاتی نسبی در مقیاس لگاریتم اعشاری به‌صورت زیر است:

$$u^2_o = u^2_{R'} - u^2_d$$

نتیجه نهایی، یعنی تخمین میانگین عدم قطعیت عملیاتی را می‌توان از دو طریق به‌شرح زیر به دست آورد:

الف- از میانگین مقادیر : $u^2_o = u^2_{R'} - u^2_d = 0.0198 - 0.0111 = 0.0087$

(با این نوع محاسبه ستون آخر جدول لازم نیست)

ب) از میانگین مقادیر منفرد (ستون آخر) : میانگین $u_o{}^2 = 0.0086$

تفاوت کوچک میان دو تخمین می‌تواند ناشی از اثرات گردکردن دستی محاسبات باشد.

لگاریتم‌های اعشاری در رویکرد مولفه‌ای کاربرد ندارند. تخمین عدم قطعیت‌ها به صورت عدم قطعیت استاندارد نسبی یا درصدی بیان می‌شوند. اگر مقایسه با تخمین عدم قطعیت‌ها به صورت نسبی یا لگاریتم طبیعی بیان شود، نتیجه آزمون‌های کلی‌نگر، u^2_o می‌تواند با ضرب در۵٫۳۰۲ به مقیاس نسبی تبدیل شود. در این مثال : $u^2_{o,rel} = 5.302 \times 0.0086 = 0.0456$

بنابراین متوسط عدم قطعیت عملیاتی نسبی از مجموع شش نمونه عبارت‌است از :

$$u_{o,rel} = \sqrt{0.0456} = 0.208 \approx 21\%$$

ج-۵-۲ مثال ۲ : روش MPN – محاسبه با لگاریتم اعشاری

دو کاربر به صورت مستقل برای آزمون کلی‌فرم در نمونه آب از یک سیستم تجاری MPN بهره گرفتند. سینی[1]های تلقیح‌شده در موقعیت‌های اختصاص‌یافته تصادفی در طبقاتی از گرم‌خانه که آن‌هم تصادفی انتخاب شده است و در ردیف‌های مختلف گرم‌خانه‌گذاری شدند. حداکثر ارتفاع سینی‌ها ۲۰ عدد بود. مقادیر MPN، x_1 و x_2 و محدوده اطمینان آن‌ها، T_0 و $T1$ از جداول ارائه‌شده توسط تولیدکننده سیستم به‌دست آمد. نتایج حاصله از ۵ نمونه در جدول ج-۲ نشان داده شده است.

تخمین واریانس‌های تجدیدپذیری نسبی از فرمول ج-۷ به دست‌می‌آید.

$$u^2_{\acute{R}} = \frac{(lgx_1 - lgx_2)^2}{2} \qquad (ج-۷)$$

1 Stacks

که در آن x_1 و x_2 مقادیر تخمینی MPN است.

جدول ج-۲ محاسبه با لگاریتم معمولی

نمونه	x_1	$T_{0,1}$	$T_{1,1}$	x_2	$T_{0,2}$	$T_{1,2}$	$u^2{}_{R'}$	$u^2{}_{d1}$	$u^2{}_{d2}$	$u^2{}_d$	$u^2{}_o$
۱	۴۲٫۹	۲۹٫۷	۶۲٫۵	۵۳٫۱	۳۷٫۵	۷۶٫۲	۰٫۰۰۴۳	۰٫۰۰۶۸	۰٫۰۰۶۲	۰٫۰۰۶۵	۰٫۰۰۲۲
۲	۲۲٫۲	۱۴٫۱	۳۵٫۲	۲۸٫۸	۰٫۱۹	۴۳٫۹	۰٫۰۰۶۴	۰٫۰۱۰۳	۰٫۰۰۸۶	۰٫۰۰۹۴	۰٫۰۰۳۱
۳	۲۵٫۴	۱۶٫۵	۳۹٫۴	۲۷٫۱	۱۷٫۷	۴۱٫۶	۰٫۰۰۰۴	۰٫۰۰۹۳	۰٫۰۰۹۰	۰٫۰۰۹۱	۰٫۰۰۸۷
۴	۲۳٫۸	۱۵٫۳	۳۷٫۳	۴۵٫۳	۳۱٫۵	۶۵٫۶	۰٫۰۳۹۱	۰٫۰۰۹۷	۰٫۰۰۶۶	۰٫۰۰۸۲	۰٫۰۳۰۹
۵	۶۵٫۹	۴۷٫۲	۹۳٫۷	۵۰٫۴	۳۵٫۴	۷۲٫۵	۰٫۰۰۶۸	۰٫۰۰۵۸	۰٫۰۰۶۳	۰٫۰۰۶۱	۰٫۰۰۰۷
			میانگین				۰٫۰۱۱۴			۰٫۰۰۷۹	۰٫۰۰۳۵

$$u_{d1}^2 = \left[\frac{\log T_{0.1} - \log T_{1.1}}{3.92}\right]^2$$

$$u_{d2}^2 = \left[\frac{\log T_{0.2} - \log T_{1.2}}{3.92}\right]^2 \quad ;u_d^2 = \frac{u_{d1}^2 + u_{d2}^2}{2};\ u_o^2 = u_R^2 - u_d^2 \qquad (ج-۸)$$

واریانس عملیاتی نسبی بر حسب لگاریتم اعشاری عبارت‌است از تفاوت میان میانگین‌های $u^2{}_{R'}$ و $u^2{}_d$:

$u_o^2 = 0.0114 - 0.0079 = 0.0035$

روش جایگزین دیگر، محاسبه میانگین تفاوت هر کدام (ستون آخر) است. ریشه دوم آن تخمین کلی‌نگر عدم قطعیت عملیاتی نسبی است: $u_o = \sqrt{0.0035} = 0.0592$

تبدیل عدم قطعیت عملیاتی استاندارد به مقیاس لگاریتمی طبیعی آن‌را گویاتر می‌کند:

$0.059 \times 2.303 = 0.136 = 13.6\%$

ج-۶ محاسبه عدم قطعیت مرکب یک نتیجه آزمون جدید

برای نتیجه شمارش کلنی، n_c عدم قطعیت استاندارد نسبی مرکب در مقیاس لگاریتم اعشاری از فرمول ج-۹ به‌دست‌می‌آید :

$$u_c(y) = \sqrt{\frac{0.1886}{n_c} + u_o^2} \qquad (ج-۹)$$

برای نتایج MPN با حدود بالاتر و پایین‌تر سطح اطمینان ٪۹۵، T_0 و T_1، عدم قطعیت استاندارد نسبی مرکب در مقیاس لگاریتم اعشاری از فرمول ج-۱۰ به دست‌می‌آید:

$$u_c(y) = \sqrt{\left(\frac{lgT_1 - lgT_0}{3.92}\right)^2 + u_o^2} \qquad (ج-۱۰)$$

پیوست چ
(الزامی)
رویکرد مولفه‌ای برای ارزیابی عدم قطعیت نسبی مرکب در شرایط تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی

چ-۱ کلیات

تخمین مولفه‌ای عدم قطعیت مرکب از روی مولفه‌های عملیاتی از پیش‌تعیین‌شده که توسط آزمون‌ها ارزیابی‌می‌شوند، به اضافه عدم قطعیت توزیع ذاتی که وابسته به شمارش‌های مشاهده شده است، شکل می‌گیرد. در حالت عادی کافی است که پنج مولفه عملیاتی و یک یا دو مولفه عدم قطعیت توزیع (ذاتی) مورد توجه قرار بگیرد. همه مولفه‌ها باید برحسب عدم قطعیت‌های استاندارد نسبی یا به اشکال اعشاری یا درصد بیان شوند زیرا ارتباط ریاضی بین کمیت‌های تاثیرگذار اصلی (رقت، شمارش و حجم) به صورت حاصل‌ضرب است.

مقادیر عدم قطعیت استاندارد برحسب لگاریتم طبیعی معادل با عدم قطعیت‌های استاندارد نسبی بررسی می‌شوند. اگر عدم قطعیت‌های استاندارد به صورت لگاریتم اعشاری (پایه ۱۰) دردسترس باشند، بهتر است آن‌ها را قبل از محاسبات بعدی به لگاریتم طبیعی تبدیل‌کرد.

چ-۲ عدم قطعیت عملیاتی نسبی

سه کمیت تاثیرگذار عملیاتی مداخله‌گر در فرایند آزمون برای نتیجه نهایی، y توسط فرمول چ-۱ قابل تعیین است :

$$y = F\,\frac{\Sigma\, n_c}{\Sigma V} \qquad \text{(چ-۱)}$$

که در آن :

F فاکتور رقت از نمونه تا رقت نهایی $(F \geq 1)$

$\sum n_c$ مجموع کلنی‌های شمارش‌شده

$\sum V$ مجموع حجم آزمونه‌ها بر حسب میلی‌لیتر در سوسپانسیون نهایی

فرمول چ-۱ نشان می‌دهد که لازم است تا عدم قطعیت‌های عملیاتی نسبی فاکتور رقت، شمارش تعداد کلنی‌ها و اندازه‌گیری آزمونه‌ها را در اختیار داشته باشید. این مولفه‌ها از طریق عملیات کالیبراسیون و دیگر آزمون‌ها که باید بخشی از فعالیت کنترل‌کیفی عادی مراحل آزمون در آزمایشگاه باشد، قابل دسترسی است.

علاوه بر این‌ها، ممکن‌است حالاتی مخفی از عدم قطعیت وجود داشته باشد که در فرمول چ- ۱ به آن پرداخته نشده است. مهم‌ترین آن‌ها شامل: تغییر نمونه فرعی تهیه شده از نمونه آزمایشگاهی (اثرات ماتریکس) و عدم قطعیت حاصله درطی گرم‌خانه‌گذاری هستند. کارهای عملی خاصی برای ارزیابی این مولفه‌ها مورد نیاز می‌باشد. مقادیری که تنها برای یک‌مرتبه تعیین می‌شوند برای آزمون‌های مشابه در آینده نیز معتبر می‌باشند (پیوست‌های ح و ز).

چ-۳ عدم قطعیت نسبی مرکب نتیجه آزمون

عدم قطعیت نسبی مرکب در نتایج نهایی آزمون مشابه مدل کلی‌نگر توسط فرمول چ-۲ به‌دست می‌آید :

$$u_{c,rel}(y) = \sqrt{u^2_{o,rel} + u^2_{d,rel}} \qquad (چ-۲)$$

که در آن :

$u_{o,rel}$ عدم قطعیت عملیاتی مرکب (عدم قطعیت استاندارد نسبی)؛

$u_{d,rel}$ عدم قطعیت توزیع (تغییر ذاتی نسبی)؛

در روش اجرایی مولفه‌ای، عدم قطعیت عملیاتی برحسب مجموع پنج واریانس نسبی کمیت‌های تاثیرگذار مطابق فرمول چ-۳ به دست می‌آید :

$$u^2_{o,rel} + u^2_{rel,M} + u^2_{rel,F} + u^2_{rel,V} + u^2_{rel,L} + u^2_{rel,I} \qquad (چ-۳)$$

معنای این علائم در جدول چ-۱ شرح داده شده است.

عدم قطعیت توزیع بدون نیاز به کار عملی از توزیع‌های آماری مورد قبول به دست می‌آید. در روش‌های آزمون میکروبیولوژی مقدار این متغیر وابسته به تعداد کلنی‌های قابل مشاهده است و در روش‌های شمارش‌کلنی و MPN متفاوت می‌باشد (پیوست‌های پ و ت). در عدم قطعیت توزیع بایستی امکان تأیید جزئی کلنی‌های احتمالی لحاظ شود (پیوست ث).

برای ردیابی مولفه‌های عدم قطعیت، طراحی جدول ثبت داده‌ها مفید است. لیست کاملی از مولفه‌ها در جدول چ-۱ ارائه شده است. اگر مولفه‌ای حضور نداشته باشد یا اثر آن بسیار ناچیز باشد، خانه مربوط به آن را می‌توان خالی گذاشت.

جدول چ-۱ معانی علامت ها

مولفه	علامت	عدم قطعیت استاندارد نسبی	نحوه تعیین
ماتریکس و نمونه‌برداری فرعی	M	$u_{rel,M}$	پیوست –ح
فاکتور رقت	F	$u_{rel,F}$	پیوست- ذ
آزمونه	V , $\sum V$	$u_{rel,V}$ ، $u_{rel,\sum V}$	پیوست های- خ ،- د
گرم‌خانه‌گذاری	I	$u_{rel,I}$	پیوست- ز
شمارش	L	$u_{rel,M}$	پیوست- ر
توزیع و تأیید	d	$u_{d,rel}$	پیوست های- پ ،-ت ،- ث

عدم قطعیت مرکب از مجموع واریانس همه مولفه‌ها (مربع عدم قطعیت‌های نسبی) حاصل می‌شود. به‌آگاهی می‌رساند که مولفه‌های ذاتی و عملیاتی را به صورت جداگانه جمع کنید.

چ-۴ مثال ها

چ-۴-۱ مثال ۱

چ-۴-۱-۱ کلیات

بار میکروبی مزوفیل هوازی یک نمونه شمارش و تعیین شد.

مراحل اصلی تفاهم‌نامه آزمون به صورت زیر است:

االف- یک نمونه فرعی ۲۵ g در ۲۲۵ g رقیق‌کننده وارد شده و به کمک مخلوط‌کن مکانیکی یکنواخت می‌شود تا سوسپانسیون اولیه ($۱۰^{-۱}$) به دست‌آید.

ب- رقت اعشاری بعدی تهیه می‌شود که به صورت (۹ml +۱ml) است.

پ- دو پلیت موازی با ۱ml از آزمونه‌ها از رقت $۱۰^{-۵}$ تعداد قابل شمارش کلنی‌ها را ارائه می‌دهد.

ت- تعداد کلنی‌های شمارش‌شده ۴۱ و ۴۵ می‌باشد.

این کار جهت گزارش تعداد تخمینی مزوفیل‌ها در نمونه، همراه با عدم قطعیت گسترده انجام شد.

نتیجه نهایی برابر است با:

$$y = F_{\sum nc}/\sum V = 10^5 * (41 + 45)/(1 + 1) = 3.4 * 10^6 g^{-1}$$

عدم قطعیت مرکب نسبی از مجموع ریشه دوم واریانس‌های نسبی (مربع عدم قطعیت‌های نسبی) مولفه‌های مرتبط به دست‌می‌آید. جدول چ-۲ برای بررسی محاسبات مفید است (بیش‌تر مقادیر از پیوست‌های دیگر اخذ شده‌اند).

جدول چ- ۲ - ترتیب محاسبات

مولفه	عدم قطعیت نسبی		واریانس نسبی
	علائم	مقادیر	
ماتریکس و نمونه‌برداری فرعی	$u_{rel,M}$	۰/۱۵۲	۰/۰۲۳۱۰۴
فاکتور رقت	$u_{rel,F}$	۰/۰۳۹	۰/۰۰۱۲۹۶
آزمونه	$u_{rel,\sum V}$	۰/۰۱۱	۰/۰۰۰۱۲۱
گرم‌خانه‌گذاری	$u_{rel,I}$	۰/۲۳۷	۰/۰۵۶۱۶۹
شمارش	$u_{rel,L}$	۰/۰۹۷	۰/۰۰۹۴۰۹
		جمع جزء	۰/۰۹۰۰۹۹
توزیع	$u_{d,rel}$	۰/۱۰۸	۰/۰۱۱۶۲۸
تأیید	مجموع		۰/۱۰۱۷۲۷

چ-۴-۱-۲ ماتریکس

عدم قطعیت نمونه فرعی تهیه شده از ماتریکس طبق روش خاصی که در پیوست– ح بیان می‌شود، به دست می‌آید. مقدار متوسط آن در این آزمایشگاه بر مبنای ۱۰ نمونه، برابر $u_{rel,M} = 0.152$ می‌باشد.

یادآوری- اگر آزمایشگاهی دارای داده‌های تجربی در رابطه با نمونه‌برداری فرعی نباشد، می‌توان اطلاعات لازم را در منابع و مراجع پیدا کرد. به عنوان مثال جداول پیوست استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶ شامل عدم قطعیت‌های استاندارد تجربی سوسپانسیون اولیه (ماتریکس و نمونه‌برداری فرعی) در تعداد زیادی از انواع مواد غذایی برحسب لگاریتم اعشاری هستند. داده‌های مربوط به انواع نمونه‌های محیطی (خاک و لجن و ....) تا زمان انتشار این استاندارد یافت نشد.

چ-۴-۱-۳ فاکتور رقت

تخمین این مولفه بر اساس اصول و مقادیر موجود در پیوست - ذ از روی مقادیر پایه عدم قطعیت حجم و جرم صورت می‌گیرد. عدم قطعیت وزن ۲۵g برابر ۱٪ و عدم قطعیت نسبی حجم (جرم واقعی) ۲۲۵ml برابر ۰٫۰۲۵ است (۲٫۵٪). بنابراین عدم قطعیت ناشی از رقت اولیه ۰٫۲۴۲ می‌شود. چهار مرحله رقیق‌سازی بعد از رقت اولیه ($۱۰^{-۱}$) نیز دارای عدم قطعیت‌های یکسان می‌باشند که توسط V_{1ml} = 1.6% و 0.5% = V_{9ml} محاسبه می شوند. عدم قطعیت یک مرحله رقیق‌سازی، $u_{rel,f}$ =0.015 است.

عدم قطعیت رقت تهیه شده بعد از چهار مرحله رقیق‌سازی مجموعاً برابر ۰٫۰۳۸۷ می‌باشد.

$$\sqrt{0.0242^2 + 4 \times 0.015^2} = u_{rel,f} = 0.387$$

چ-۴-۱-۴ آزمونه

حجم کل آزمونه ml (۱×۲) است. عدم قطعیت مرکب براساس روش تعیین شده در بند (د-۲) از اطلاعات عدم قطعیت استاندارد نسبی ۱ ml که برابر با $u_{rel,V}$ =0.016(1.6%) است، محاسبه می‌شود. با دو تکرار و حجم مساوی، مجموع عدم قطعیت استاندارد نسبی برابر با $u_{\sum V}$ =0.016/$\sqrt{2}$ =0.0113 است.

چ-۴-۱-۵ گرم‌خانه‌گذاری

پراکندگی بالای نسبت داده شده به گرم‌خانه‌گذاری، درباره شمارش‌کلنی‌های باکتری‌های هتروتروف با روش‌های تجربی خاص مطابق اصول بیان شده در پیوست - ز تعیین می‌شود. مقداری‌که در یک‌بار تعیین‌می‌شود، معتبر باقی می‌ماند. مقدار به دست‌آمده از کار با هفت نمونه و شش تکرار برابر $u_{rel,I}$ =0.237 است.

چ-۴-۱-۶ شمارش

تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی شمارش، به‌عنوان بخشی از فعالیت‌های کنترل‌کیفیت قبلاً تعیین می‌شود (پیوست -ر). مقدار تخمینی برابر $u_{rel,L}$ =0.097 است.

چ-۴-۱-۷ توزیع ذرات

عدم قطعیت توزیع نسبی براساس مجموع کلنی‌ها شمارش‌شده، n_c به‌دست می‌آید. بنابراین عدم قطعیت‌ها ناشی از عامل توزیع ذرات پواسون در سوسپانسیون نهایی برابر است با:

$$u_{d,rel} = 1/\sqrt{\sum nc} = 1/\sqrt{45 + 41} = \sqrt{1/86} = 0.108$$

چ-۴-۱-۸ تخمین و کاربرد عدم قطعیت مرکب

مجموع ریشه دوم در پنج مولفه عملیاتی، $u_{o,rel}$=$\sqrt{0.090099}$ =0.300 است. مولفه کوچک ناشی از اندازه‌گیری‌های حجمی (فاکتور رقیق‌سازی و آزمونه) به‌دلیل تأثیر ناچیز آن می‌تواند حذف شود. بدون این دو مولفه، عدم قطعیت عملیاتی بقیه مولفه‌ها ۰٫۲۹۸ خواهد شد.

عدم قطعیت (واریانس) نسبی مرکب با تجمیع واریانس‌های عملیاتی و ذاتی می‌شود:

$$u_{c,rel}^2(y) = 0.0090099 + 0.011628 = 0.101727$$

و در نتیجه مقدار، $u_{c,rel}(y)$ به‌دست‌می‌آید:

$$u_{c,rel}(y) = 0.319 = 31.9\ \%$$

عدم قطعیت نسبی گسترده دو برابر عدم قطعیت مرکب است، لذا می‌شود: $U_{rel} = 0.638$. برای بیان عدم قطعیت گسترده نتیجه نهایی بر مبنای بازه‌ای، اصل مقدار y را بایستی یک‌بار بر $\exp(U)$ ضرب‌کرده و بار دیگر بر آن تقسیم‌کرد و به شکل اعشاری بیان نمود (طبق پیوست ژ).

در این مثال : $y = 4.3 \times 10^6$ و $\exp(U) = \exp(0.638) = 1.893$

حد بالاتر: $(4.3 \times 10^6) \times 1.893 = 8.1 \times 10^6$ و حد پایین‌تر: $(4.3 \times 10^6)/1.893 = 2.3 \times 10^6$ است.

چ-۴-۲ مثال ۲

غلظت اشرشیاکلی در نمونه آب با استفاده از سیستم MPN تجاری تخمین‌زده شده است. برمبنای تعداد چاهک‌های مثبت و با استفاده از جداول ارائه‌شده توسط تولیدکننده سیستم، تعداد آن ۸٫۷ در هر ۱۰۰ ml با حدود اطمینان بالاتر ٪ ۹۵ و پایین‌تر آن به تعداد ۴٫۵ و ۱۷٫۱ ارزیابی شد.

آزمایشگاه با انجام آزمون‌های خاص قبلاً مقدار تجدیدپذیری نسبی این روش شمارش را، ۰٫۰۶۷ (٪ ۶٫۷) و تأثیر گرم‌خانه‌گذاری را، ۰٫۱۰(٪۱۰) به دست‌آورده است. متوسط تجدیدپذیری نسبی (چند کاربر) درخصوص اندازه‌گیری‌های آزمونه ۱۰۰ ml با عملیات کالیبراسیون حدود ۰٫۰۵ (٪ ۵) شده‌است. درباره نمونه‌های آب، غیر از عدم قطعیت‌ها آزمونه‌ها می‌توان از واریانس نمونه فرعی صرف‌نظرکرد. در این مثال هیچ رقتی وجود ندارد.

تخمین عدم قطعیت‌های توزیع نسبی با حدود اطمینان ٪۹۵ به‌شرح زیر محاسبه‌می‌شود :

$$u_{d,rel} = (\ln 17.1 - \ln 4.5)/3.92 = 0.34 = 34.0\ \%$$

یادآوری- محاسبه با لگاریتم اعشاری برابر است با : $u_{d(lg)} = (\lg 17.1 - \lg 4.5)/3.92 = 0.148$

با تبدیل آن به لگاریتم طبیعی می‌شود : $u_{d,rel} = 2.3 \times 0.148 = 0.34 = 34\ \%$

عدم قطعیت مرکب با جمع‌کردن مجذور مربعات مولفه‌های شناخته‌شده عدم قطعیت طبق فرمول (چ-۴) تخمین‌زده می‌شود :

$$u_{c,rel\,(y)} = \sqrt{0.067^2 + 0.1^2 + 0.05^2 + 0.34^2} = \sqrt{0.132589} = 0.364 \qquad (\text{چ-۴})$$

بهتر است که مقدار عدم قطعیت مرکب با تقسیم بر عدد ۲٫۳۰۳ برحسب لگاریتم اعشاری گزارش شود:

$$u_{c(y)} = 0.364/2.303 = 0.158$$

پیوست ح

(الزامی)

ارزیابی تجربی واریانس نمونه‌برداری فرعی

ح-۱ کلیات

طرح کلی‌نگر معمولی توانایی ارزیابی جزئی تک‌تک مولفه‌های عدم قطعیت را ندارد. تغییرات در طی نمونه‌برداری فرعی از نمونه آزمایشگاهی را که اثر ماتریکس نیز نام دارد، می‌توان با انجام آزمون‌های دو بار تکرار بر روی دو سوسپانسیون اولیه یا بیش‌تر (ترجیحاً سه یا چهار) توسط نمونه‌های فرعی یکسان و برداشت‌شده از یک نمونه آزمایشگاهی، ارزیابی کرد.

طراحی آماری آن پیچیده‌تر از نوع عملیات کلی‌نگر است که عدم قطعیت کل فرایند آزمون را ارزیابی می‌کند. از این‌رو درصورتی نسبت به ارزیابی جداگانه این مولفه اقدام می‌شود که اطلاعات کمی مربوط به نمونه‌برداری فرعی از اهمیت کافی برخوردار باشد. چنین اطلاعاتی در هنگام بررسی دلایل بالا بودن مقدار یک عدم قطعیت مرکب مشاهده شده یا مفروض هیچ اعتباری ندارد.

شبیه‌سازی در سطوح پایین‌تر برای بررسی و تخمین مولفه واریانس مرتبط با نمونه‌برداری فرعی از نمونه‌های آزمایشگاهی لازم است. در آب و دیگر مایعات واریانس نمونه‌برداری فرعی مهم نبوده و ارزیابی تجربی واریانس نمونه‌برداری فرعی لازم نیست. مثال ارائه شده در این پیوست نشان‌دهنده آزمون یک نمونه است. حداقل ۱۰ آزمونه از یک نوع نمونه مورد آزمایش باید آزمون شود تا مقدار میانگین واقعی کافی برای محاسبه واریانس نمونه‌برداری فرعی به دست‌آید. استفاده از کاربران مختلف برای آزمون نمونه‌ها مجاز است، اما توصیه می‌شود که آزمون‌ها در شرایط تکرارپذیری انجام شود. تنها یک نفر بایستی به خواندن نتایج بپردازد.

ح-۲ تجزیه و تحلیل واریانس

روش استاندارد برای تجزیه و تحلیل عبارت‌است از مشابه‌سازی و تکرار چندباره یک سری نمونه‌های فرعی و رقت‌سازی به منظور تعیین دقت (بی‌دقتی) نمونه‌های فرعی است. نمونه آزمایشگاهی تا حد امکان در چنین شرایطی مخلوط شده و به صورت تصادفی به تعداد k مرتبه نمونه فرعی از آن گرفته شده و n مرتبه تکرار آزمون روی نمونه فرعی انجام می‌شود. حداقل مقدار n و k به‌میزان ۲ است. تخمین واریانس نمونه‌برداری فرعی از داده‌های حاصل انجام می‌شود.

توصیه می‌شود که داده‌ها به لگاریتم تبدیل شوند. دلیل اصلی آن، کاهش اثرات تغییر ناشی از سطوح مختلف آلودگی در نمونه‌های متفاوت است. هم‌چنین نرمال بودن توزیع داده‌ها بهبود می‌یابد. لگاریتم طبیعی تا اندازه‌ای معمول‌تر از لگاریتم‌های اعشاری است چون نتایج مستقیماً با واریانس نسبی تفسیر و تعبیر می‌شوند. اگر بیان نتیجه به‌صورت درصد یا نسبی ارجحیت دارد، لگاریتم اعشاری نیازمند ضرب شدن در یک ضریب ثابت است.

مثال- یک نمونه آزمایشگاهی حاوی مواد جامد تا حد امکان به‌خوبی مخلوط شده است. شش نمونه فرعی مستقل (k = ۶) وزن شده و در رقیق‌کننده سترون قرار می‌گیرند و به دقت یکنواخت می‌شوند. دو سری رقت (n = ۲) از هر سوسپانسیون اولیه ساخته شده و یک پلیت ازسوسپانسیون نهایی هر سری تلقیح می‌شود. شمارش کلنی‌های هدف بعد از پایان زمان خاص گرم‌خانه‌گذاری انجام می‌شود. نتایج در جدول ح-۱ نشان داده شده است.

جدول (ح-۱) – تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه، با استفاده از لگاریتم طبیعی، نتایج شش نمونه فرعی از یک نمونه آزمایشگاهی برای استخراج واریانس نمونه‌برداری فرعی

نمونه فرعی	سری‌های رقت	شمارش مشاهده‌شده، n_c	$\ln n_c$	$(\ln n_c)^۲$	مجموع نمونه‌های فرعی برحسب $\ln n_c$	مجموع مربعات نمونه‌های فرعی برحسب $\ln n_c$
۱	۱	۳۴	۳٫۵۲۶۴	۱۲٫۴۳۵		
	۲	۴۵	۳٫۸۰۶۷	۱۴٫۴۹۱	۷٫۳۳۳۰	۵۳٫۷۷۲۹
۲	۱	۵۰	۳٫۹۱۲۰	۱۵٫۳۰۴		
	۲	۶۱	۴٫۱۱۰۹	۱۶٫۸۹۹	۸٫۰۲۹۹	۶۴٫۳۶۶۹
۳	۱	۶۰	۴٫۰۹۴۳	۱۶٫۷۶۴		
	۲	۷۲	۴٫۲۷۶۷	۱۸٫۲۹۰	۸٫۳۷۱۰	۷۰٫۰۷۳۶
۴	۱	۸۲	۴٫۴۰۶۷	۱۹٫۴۱۹		
	۲	۷۰	۴٫۲۴۸۵	۱۸٫۰۵۰	۸٫۶۵۵۲	۷۴٫۹۱۲۵
۵	۱	۵۸	۴٫۰۶۰۴	۱۶٫۴۸۷		
	۲	۶۴	۴٫۱۵۸۹	۱۷٫۲۹۶	۸٫۲۱۹۳	۶۷٫۵۵۶۹
۶	۱	۴۰	۳٫۶۸۸۹	۱۳٫۶۰۸		
	۲	۵۹	۴٫۰۷۷۵	۱۶٫۶۲۶	۷٫۷۶۶۴	۶۰٫۳۱۷۰
		مجموع	۴۸٫۳۶۷۹	۱۹۵٫۶۹۹		۳۹۱٫۰۰۰

نتایج شمارش‌ها به مقیاس لگاریتم طبیعی تبدیل‌شده و تجزیه وتحلیل واریانس یک‌طرفه صورت می‌گیرد. نتایج در جدول (ح-۲) قابل مشاهده‌است. نحوه انجام محاسبات به‌شرح زیر است:

الف - محاسبه مجموع همه مقادیر برحسب لگاریتم طبیعی (48.3679)

ب - محاسبه جمله تصحیح (CT)، $t_{\text{corr}} = (48.3679)^2/nk = 2339.4538/12 = 194.9545$

پ - محاسبه مجموع توان دوم مقادیر برحسب لگاریتم طبیعی (195.699)

ت - جمع‌کردن نتایج موازی هر نمونه فرعی

(3,5264 + 3,8067 = 7,333 0, 3,9120 + 4,1109 = 8,0229, etc.).

ث – محاسبه مربع مقادیر و جمع‌کردن آن (391,000)

ج - به‌دست‌آوردن مجموع کل مربعات از رابطه زیر:

195,669 - *t*corr = 195,669 - 194,9545 = 0,7145.

چ - محاسبه مجموع مربعات بین نمونه‌های فرعی

(391.000/*n*) - *t*corr = (391.0/2) - *t*corr = 195.500 0 -194.9545 = 0.5455.

ح - به‌دست‌آوردن مجموع مربعات درون نمونه‌های فرعی $0.7145 - 0.5455 = 0.1690.$

خ - محاسبه واریانس (مربع میانگین) با تقسیم مجموع مربعات بر درجه آزادی مناسب

جدول ح-۲ تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس (مربع میانگین)	تخمین	F_{stat}	P
بین نمونه‌های فرعی	$(k-۱) = ۵$	۰/۵۴۵۵	۰/۱۰۹۱	$s^2 + ns^2_B$	۳/۸۷	۰/۰۶۴
درون آن‌ها	$k(n-۱) = ۶$	۰/۱۶۹۰	۰/۰۲۸۲	s^2		
کل	$(kn-۱) = ۱۱$	۰/۷۱۴۵				

نتایج جدول (ح-۲) به‌صورت دستی محاسبه‌شده‌اند. اگر داده‌ها در برنامه رایانه‌ای وارد شوند، تفاوت نتایج کم می‌شود چون دقت در پردازش و محاسبه بیش‌تر است.

ستون تخمین نشان می‌دهد که چگونه هر مربع میانگین به دست می‌آید. واریانس درون نمونه‌های فرعی، s^2 شامل اندازه‌گیری متوسط تغییر بین سری رقت‌های دوتایی از یک سوسپانسیون اولیه، با عدم قطعیت توزیع و دیگر مولفه‌های عملیاتی عدم قطعیت غیر از نمونه‌برداری فرعی می‌باشد.

جهت اطلاع یادآوری می‌شود که واریانس بین نمونه‌های فرعی (در سطح ٪ ۵) در مقایسه با واریانس درون نمونه‌های فرعی از نظر آماری معنی‌دار نیست ($F_{stat} = 0.1091/0.0282 = 3.87, P = 0.064$).

حتی اگر از لحاظ آماری معنی‌دار نباشد، ولی دارای اطلاعات لازم برای محاسبه واریانس نمونه‌برداری فرعی، s_B^2 می‌باشد. تخمین واریانس نمونه‌برداری فرعی می‌تواند به‌صورت زیر محاسبه شود:

$$s_B^2 = \frac{0.1091-0.0282}{2} = 0.0405$$

چون از لگاریتم طبیعی استفاده شده است، s_B همان تخمین عدم قطعیت نسبی نمونه‌برداری فرعی می‌باشد.

$$u_{rel,M} = 0.20 = 20\% \qquad (ح-۱)$$

نتیجه حاصل، تخمینی از عدم قطعیت نمونه‌برداری فرعی در ماده مورد آزمایش است، یا به عبارت واقعی‌تر در یک نمونه آزمایشگاهی خاص به خوبی مخلوط شده با استفاده از تجهیزات و امکانات همان آزمایشگاه.

استفاده از یک نمونه برای تعیین عدم قطعیت نمونه‌برداری فرعی کافی نیست. بهتر است که چندین نمونه از انواع مشابه بررسی شده تا متوسط واریانس‌های نمونه‌برداری فرعی به دست‌آید.

در این مثال از ۱۰ نمونه مشابه استفاده شده است. مقدار میانگین آزمون‌ها ٪۱۵/۲ است.

یادآوری- تجزیه و تحلیل مشابهی با استفاده از لگاریتم اعشاری در ابتدا واریانس نمونه‌برداری فرعی را $(0.0206 - 0.0053) / 2 = 0.00765$ نشان‌داد که مربع آن 0.875 است. با تبدیل آن به لگاریتم طبیعی

$u_{rel,M} = 2.303 \times 0.0875 = 0.2015 = 20\ \%,$ حاصل می‌شود که تقریباً مشابه نتیجه به دست‌آمده از فرمول (ح-۱) است.

پیوست خ

(الزامی)

تکرارپذیری و تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی نسبی در اندازه‌گیری‌های حجمی

خ-۱ اصول

در روش‌های روزمره آزمایشگاهی عمل توزین درست‌تر از اندازه‌گیری‌های معمول حجمی است. دقت وسایل حجم‌سنجی را می‌توان با توزین حجم‌هایی از آب مقطر یا آب بدون یون تعیین‌کرد. میانگین عدم قطعیت استاندارد با محاسبه آماری استاندارد از روی مجموعه اندازه‌گیری‌ها به دست‌می‌آید.

برای کالیبره‌کردن ابزارهای سنجش‌حجمی (پی‌پت، مزور و غیره) بایستی حداقل ۲۰ اندازه‌گیری توسط وسیله موردنظر انجام‌شود. به‌منظور شبیه‌سازی شرایط کار اسپتیک، در هر نوبت باید از یک پی‌پت یا نوک جداگانه استفاده شود.

با مجموعه نتایج به‌دست‌آمده توسط یک کاربر می‌توان عدم قطعیت تکرارپذیری را محاسبه‌کرد. با تجزیه‌وتحلیل نتایج دو یا تعداد بیش‌تری از کاربران با همدیگر، تخمین عدم قطعیت حاصل را اصطلاحاً تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی می‌نامند. در روش‌های کلی تخمین عدم قطعیت، اریبی احتمالی بین کاربران نیز در محاسبه دخالت داده می‌شود.

عدم قطعیت استاندارد نسبی مناسب‌ترین متغیر برای استفاده در موارد بعد است. مقدار آن با تقسیم عدم قطعیت استاندارد بر میانگین یا به کمک لگاریتم‌های طبیعی (یا اعشاری) طبق پیوست ب به دست‌می‌آید (هم‌چنین مطابق پیوست خ-۳، یادآوری ۲).

خ-۲ عدم قطعیت استاندارد تکرارپذیری کاربران

دقت اندازه‌گیری ۰٫۱ ml آزمونه با استفاده از پی‌پت شیشه‌ای به روش توزین مورد بررسی قرارگرفته است. هر یک از کاربران (A و B) مجموعه‌ای از ۲۰ اندازه‌گیری را انجام دادند. به منظور تشریح محاسبات، تعداد کمی از داده‌ها (شش اندازه‌گیری برای هر کاربر) در جدول خ-۱ نشان‌داده شده است.

جدول خ-۱ نتایج کالیبراسیون حجم‌های ۰/۱ ml آزمونه

	مقیاس بازه‌ای		مقیاس لگاریتم طبیعی		مقیاس لگاریتم اعشاری	
	V_A	V_B	$\ln V_A$	$\ln V_B$	$\lg V_A$	$\lg V_B$
	۰/۱۰۵	۰/۱۰۷	-۲/۲۵۳۸	-۲/۲۳۴۹	-۰/۹۷۸۸	-۰/۹۷۰۶
	۰/۱۱۳	۰/۱۱۶	-۲/۱۸۰۴	-۲/۱۵۴۲	-۰/۹۴۶۹	-۰/۹۳۵۵
	۰/۱۰۹	۰/۰۹۷	-۲/۲۱۶۴	-۲/۳۳۳۰	-۰/۹۶۲۶	-۰/۰۱۳۲
	۰/۱۰۳	۰/۰۹۷	-۲/۲۷۳۰	-۲/۳۳۳۰	-۰/۹۸۷۲	-۰/۰۱۳۲
	۰/۱۱۵	۰/۰۸۳	-۲/۱۶۲۸	-۲/۴۸۸۹	-۰/۹۳۹۳	-۱/۰۸۰۹
	۰/۱۲۳	۰/۰۸۵	-۲/۰۹۵۶	-۲/۴۶۵۱	-۰/۹۱۰۱	-۱/۰۷۰۶
میانگین	۰/۱۱۱۳	۰/۰۹۷۵	-	-	-	-
عدم قطعیت استاندارد	۰/۰۰۷۳	۰/۰۱۲۶	۰/۰۶۵	۰/۱۲۹	۰/۰۲۸۲	۰/۰۵۶۱
عدم قطعیت استاندارد نسبی	۰/۰۶۶	۰/۱۲۹	۰/۰۶۵	۰/۱۲۹	۰/۰۶۵ [a]	۰/۱۲۹ [a]

a با ضرب عدم قطعیت استاندارد در ۲/۳۰۳ به دست‌می‌آید.

یادآوری- در جدول خ-۱ ، شش اندازه‌گیری حجمی مستقل توسط دو کاربر (A و B) نشان داده شده است. عدم قطعیت استاندارد نسبی با هر سه مسیر انتخابی، طبق پیوست - ب ارزیابی شده است (هم‌چنین به بند ح-۳ یادآوری۲ مراجعه کنید).

عدم قطعیت استاندارد کاربران، نشان‌دهنده تکرارپذیری حجم‌های اندازه‌گیری‌شده با دو کاربر مجزا است. آزمایشگاه احتمالاً از آن‌ها برای کنترل‌کیفیت داخلی و آموزش افراد استفاده می‌کند. زمانی‌که عدم قطعیت مرکب یک نتیجه آزمون برای مشتریان محاسبه می‌شود، تخمین تجدیدپذیری کلی برای آزمایشگاه بیش‌تر ارجحیت دارد.

خ-۳ تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی نسبی

عدم قطعیت تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی استاندارد اندازه‌گیری‌های حجمی بهتر است که شامل همه‌گونه اریبی احتمالی بین کاربران باشد. اریبی درصورتی در تخمین وارد می‌شود که محاسبه عدم قطعیت، قبل از به دست‌آوردن مقدار میانگین و عدم قطعیت استاندارد، در یک فایل داده یکسان صورت بگیرد. این مورد با وارد کردن ۱۲ مقدار در جدول خ-۱ با استفاده از هر سه روش تخمین بیان شده در پیوست- ب، یادآوری ۲ انجام شده است. نتایج آن‌را در جدول خ-۲ مشاهده‌کنید.

جدول خ-۲ تجزیه و تحلیل تغییرپذیری اندازه‌گیری‌های حجمی

	V	lnV	lgV
N	۱۲	۱۲	۱۲
میانگین	۰/۱۰۴۴	-	-
عدم قطعیت استاندارد	۰/۰۱۲۲	۰/۱۲۱۲	۰/۰۵۲۶
میزان نسبی	۰/۱۱۶۹	۰/۱۲۱۲	۰/۱۲۱۱ [۱]
میزان درصدی	۱۱/۷	۱۲/۱	۱۲/۱ [۱]

N حجم

V تعداد مشاهدات

۱ با ضرب عدم قطعیت استاندارد لگاریتم طبیعی در ۲/۳۰۳ به‌دست‌می‌آید.

یادآوری ۱- داده‌های جدول خ-۲ ، ادغام شده داده‌های دو کاربر می‌باشد.

میانگین حسابی ۰/۱۰۴۴ تفاوت معنی‌داری با حجم اسمی ۰/۱ ml ندارد. هم‌چنین محاسبه عدم قطعیت استاندارد نسبی از طریق عملیات (0.122= 0.0122/0.1) قابل توجیه است.

در زمان محاسبه عدم قطعیت مرکب بایستی از تخمین تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی همانند عدم قطعیت آزمونه استفاده شود.

یادآوری ۲- در زمان مطالعه بر روی عدم قطعیت شاهد، احتمالاً به‌کارگیری چند کاربر برای ارزیابی تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی اهمیتی ندارد و مشاهدات روی نوبت‌های مختلف اتوکلاوکردن یا توزیع‌های متفاوت می‌تواند جایگزین آن شود. رقت‌های شاهد باید پس از اتوکلاوکردن توزین شوند.

پیوست د

(الزامی)

عدم قطعیت نسبی مجموع آزمونه‌ها

د-۱ کلیات

وقتی که سیستم شناسایی آزمون مشتمل بر مجموعه‌ای از پلیت‌ها از یک یا چند رقت می‌باشد، نیاز است تا عدم قطعیت مجموع آزمونه‌ها، در محاسبات عدم قطعیت غلظت عامل تحت آزمون در سوسپانسیون نهایی برآورد شود.

زمانی‌که مقادیر عدم قطعیت مولفه حجم‌ها در شرایط تجدیدپذیری تخمین‌زده می‌شود، عدم قطعیت مجموع، همان عدم قطعیت درون آزمایشگاهی است (بند خ-۲).

د-۲ یک رقت، حالت کلی

د-۲-۱ کلیات

هنگامی‌که از یک سوسپانسیون نهایی یک‌سری پلیت کشت داده‌شود، عدم قطعیت کل حجم‌ها با به‌کارگیری مستقیم قوانین عدم قطعیت مرکب به‌دست‌می‌آید. مطابق شرایط اعلام‌شده در پیوست-ب، عدم قطعیت مجموع $\sum V = V_1 + V_2 + \ldots + V_n$ با فرمول (د-۱) محاسبه می‌شود.

$$u_{\Sigma V} = \sqrt{u^2{}_1 + u^2{}_2 + \ldots + u^2{}_n} \qquad (د-۱)$$

که u_1 و u_2 و... تخمین عدم قطعیت استاندارد حجم‌های V_1،V_2 و... هستند (میلی‌لیتر).

برای استفاده بعدی در محاسبات عدم قطعیت، معمولاً بهتر است نتایج به‌صورت عدم قطعیت نسبی $u_{rel,\Sigma V} = u_{\Sigma V}/\sum V$ بیان شوند.

د-۲-۲ مثال

چهار پلیت از یک سوسپانسیون تهیه شده است. دو پلیت با ۱ ml آزمونه و دو پلیت دیگر با ۰٫۱ ml آزمونه، مجموعاً ۲٫۲ ml حجم کل سوسپانسیون نهایی برآورد می‌شود.

1 ml + 1 ml + 0.1 ml + 0.1 ml = 2.2 ml.

عدم قطعیت حجم کل بهتر است محاسبه‌شود.

عدم قطعیت نسبی (تجدیدپذیری) حجم‌های انتقال‌یافته با پی‌پت که قبلاً محاسبه شده است، برای ۰٫۱ ml حجم پی‌پت‌شده، به‌مقدار ٪۸ و برای ۱ ml برابر ٪۲ می‌باشد.

عدم قطعیت‌های نسبی باید در واحد حجمی بیان شوند:

$u_1$ml = 0.02 × 1 ml = 0.02 ml و $u_{0.1}$ml = 0.08 × 0.1 ml = 0.008 ml.

عدم قطعیت مجموع طبق فرمول (د-۲) به صورت زیر است :

$$u_{\Sigma v} = \sqrt{0.02^2 + 0.008^2 + 0.02^2 + 0.008^2} = \sqrt{0.000928} = 0.0305 \text{ ml} \qquad (د-۲)$$

و عدم قطعیت نسبی آن به‌صورت زیر است:

$u_{\mathrm{rel},\ \sum V} = \ u_{\sum V}/\sum V = = 0.030\ 5/2.2 = 0.014 = 1.4\ \%.$

د-۲-۳ یک رقت، حجم آزمونه یکسان

معمولاً در یک سری از پلیت‌های موازی حجم آزمونه‌ها مساوی است. اگر عدم قطعیت وسایل اندازه‌گیری حجمی در مقیاس نسبی داده شده باشد به عنوان مثال به صورت درصدی، عدم قطعیت نسبی مجموع به صورت درصدی می‌تواند آسان‌تر از موارد بالا به دست‌آید. عدم قطعیت نسبی مجموع برابر است با عدم قطعیت نسبی در یک اندازه‌گیری تقسیم بر ریشه دوم تعداد پلیت‌های موازی طبق فرمول (د-۳):

$$u_{\mathrm{rel},\Sigma V} = \frac{u_{\mathrm{rel},V}}{\sqrt{n}} \qquad (\text{د-۳})$$

که در آن :

n تعداد پلیت‌های موازی؛

$u_{\mathrm{rel,V}}$ عدم قطعیت نسبی یک آزمونه، است.

د-۳ دو رقت

د-۳-۱ کلیات

فرض‌کنید نتیجه نهایی بر اساس شمارش کلنی‌ها از n_0 پلیت سوسپانسیون نهایی و n_1 پلیت از دومین رقت حاصله از یک مرحله رقیق‌سازی سوسپانسیون نهایی یا چند مرحله بیش‌تر با فاکتور رقت f در میان رقت‌ها به دست آمده باشد.

مجموع حجم آزمونه‌های کشت داده شده برحسب سوسپانسیون نهایی مطابق فرمول (د-۴) حاصل می‌شود :

$$\Sigma V = n_0 V_0 + \frac{1}{f} n_1 V_1 \qquad (\text{د-۴})$$

که در آن :

n_0 تعداد پلیت‌های موازی تهیه‌شده از سوسپانسیون نهایی

V_0 حجم آزمونه اندازه‌گیری‌شده از سوسپانسیون نهایی

n_1 تعداد پلیت‌های موازی حاصل از رقت دوم

f فاکتور رقت

V_1 حجم آزمونه اندازه‌گیری‌شده از رقت دوم

معمولا تعداد تکرارها و حجم‌های تلقیح‌شده در هر دو رقت با هم برابرند یعنی :

$n_0 = n_1 = n$ و $V_0 = V_1 = V$ است.

محاسبه عدم قطعیت نسبی مجموع حجم‌های آزمونه‌ها طبق فرمول (د-۵) به‌صورت زیر است :

$$u^2_{\mathrm{rel},\Sigma V} = \frac{1}{(\mathrm{f}+1)^2}\left[\frac{u^2_{\mathrm{rel},V}}{\mathrm{n}}(\mathrm{f}^2 + 1) + u^2_{\mathrm{rel},f}\right] \qquad (\text{د-۵})$$

که در آن :

f فاکتور رقت بین دو سطح درون سیستم شناسایی؛

n تعداد پلیت‌های موازی در هر رقت؛

V حجم تلقیح به ازاء هر پلیت؛

$u_{rel,V}$ عدم قطعیت نسبی حجم تلقیح؛

$u_{rel,f}$ عدم قطعیت نسبی فاکتور رقت (طبق پیوست- ذ، از روی عدم قطعیت‌های نسبی حجم منتقل‌شده و حجم رقت شاهد)، است.

یادآوری- مشارکت رقت دوم در عدم قطعیت مجموع حجم‌ها زمانی معنی‌دار است که فاکتور رقت، f میان دو رقت بالا (پنج یا بیش‌تر) باشد. عدم قطعیت رقت و عدم قطعیت اندازه‌گیری‌ها در رقت دوم می‌تواند نادیده‌گرفته شود. فقط با درنظرگرفتن اولین رقت و با استفاده از فرمول زیر مطابق پیوست (د-۳-۲) می‌توان به عدم قطعیت قابل قبول دست یافت.

$$u^2_{rel,\Sigma V} \approx \frac{u^2_{rel,V}}{n}$$

برخی اوقات ممکن است پلیت یک رقت از دست برود، یا حجم تلقیح‌های متفاوت مورد استفاده قرارگیرد.

در این‌حالت فرمول کلی (د-۶) را می‌توان برای تعیین واریانس حجم کل آزمونه‌ها به‌کار برد:

$$u^2_{rel,\Sigma V} = \frac{1}{(f n_0 V_0 + n_1 V_1)^2}\left[n_0 f^2 V_0^2 u^2_{V_0} + n_1^2 V_1^2 \left(\frac{u^2_{rel,V_1}}{n_1} + u^2_{rel,f}\right)\right] \qquad (\text{د-۶})$$

که در آن :

f فاکتور رقت بین دو رقت؛

n_0 تعداد پلیت‌های موازی در سوسپانسیون نهایی؛

V_0 حجم سوسپانسیون تلقیح‌شده به ازاء هر پلیت در سوسپانسیون نهایی؛

n_1 تعداد پلیت‌های موازی در رقت دوم؛

V_1 حجم سوسپانسیون تلقیح‌شده به‌ازاء هر پلیت در رقت دوم؛

$u_{rel,V0}$ عدم قطعیت نسبی حجمی V_0؛

$u_{rel,V1}$ عدم قطعیت نسبی حجمی V_1؛

$u_{rel,f}$ عدم قطعیت نسبی فاکتور رقت f ؛

فرمول (د-۶) پیچیده ولی کامل است، زیرا تعداد متفاوت پلیت‌های موازی (n_0 و n_1) در دو رقت و حجم‌های مایع تلقیح (V_0 و V_1) در رقت‌های مختلف را در بر می‌گیرد.

د-۳-۲ مثال

یک نمونه با ساخت سوسپانسیون اولیه از همگن‌سازی ۲۵ g گرم نمونه با ۲۲۵ ml رقیق‌کننده مورد مطالعه قرارگرفت. این ترکیب رقت اولیه ($۱۰^{-۱}$) یا سوسپانسیون اولیه نامیده می‌شود. سوسپانسیون اولیه در چندین مرحله رقیق‌تر می‌شود (۱ml + ۹ml). دو پلیت موازی از هر رقت با حجم ۱ml از آزمونه تلقیح می‌شوند. پلیت‌های با تعداد مناسب از کلنی‌ها برای شمارش در رقت‌های $۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۵}$ قرار دارند.

سابقه رقیق‌سازی تا مرحله سوسپانسیون نهایی (اولین رقت قابل‌شمارش) در این مثال اهمیتی ندارد.

حجم کلی آزمونه‌ها در سوسپانسیون نهایی ($\sum V$ = 1 ml + 1 ml + 0.1 ml + 0.1 ml = 2.2 ml) است.

برای محاسبه عدم قطعیت نسبی (درصد) مجموع آزمونه‌ها، اطلاعاتی راجع به عدم قطعیت اندازه‌گیری حجم‌های مختلف مورد نیاز است. این اطلاعات درجدول (د-۱) جمع‌آوری شده است.

جدول د-۱ عدم قطعیت نسبی اندازه‌گیری‌های حجمی

سنجش	عدم قطعیت استاندارد نسبی
ml	$u_{rel,V}$
۱	۰/۰۰۵
۹	۰/۰۲

عدم قطعیت نسبی مرحله رقیق‌سازی همانند روش ارائه‌شده در پیوست- ذ محاسبه می‌شود :

$$u^2_{rel,f} = \left(\frac{9^2}{10^1}\right)(0.005^2 + 0.02^2) = 0.000344 \qquad (د-۷)$$

اطلاعات مرتبط با محاسبه عدم قطعیت نسبی، $\sum V$ در ادامه آمده‌است :

$$V = 1ml,\ f = 10,\ n = 2,\ u^2_{rel,f} = 0.000344,\ u^2_{rel,V} = 0.000025 \qquad (د-۸)$$

مقادیر در فرمول (د-۶) جایگزین می‌شوند :

$$u^2_{rel,\Sigma V} = \frac{۱}{(10+1)^2} = \left[\frac{0.000025}{2}(100+1) + 0.000344\right] = 0.000013 \qquad (د-۹)$$

واریانس نسبی مجموع آزمونه‌ها (0.000013) است. بنابراین تخمین عدم قطعیت نسبی مجموع حجم‌ها ($u_{rel,\sum V} = \sqrt{0.000013} = 0.0036$) است.

با استفاده از راه‌حل تقریب ارائه شده در یادآوری، فرمول به صورت زیر ساده‌سازی می‌شود:

$$u^2_{rel,\Sigma V} = \frac{u^2_{rel,V}}{n} = \frac{0.000025}{2} = 0.0000125$$

ریشه دوم عدد (0.0000125) مقدار (0.0035) است که همان عدم قطعیت نسبی است. تفاوت میان (0.0035 و 0.0036) ناچیز و قابل چشم‌پوشی است.

د-۴ روش MPN

برخی از سیستم‌های MPN با حجم بزرگی از آزمونه (مثلاً ۱۰۰ml) که در تعدادی از چاهک‌ها توزیع شده است، تلقیح می‌شوند. عدم قطعیت حجم کل، با کالیبراسیون ابزارهای حجم‌سنجی که در پیوست- خ شرح داده شده است، تعیین‌می‌گردد.

در برخی از دیگر سیستم‌های MPN، آزمونه در داخل چاهک‌های یا لوله‌ها در یک زمان ریخته‌می‌شود. عدم قطعیت مجموع مطابق پیوست (د-۲) تعیین می‌شود. عدم قطعیت حجم کل در این مثال قابل چشم‌پوشی است.

پیوست ذ

(الزامی)

عدم قطعیت نسبی فاکتور رقت F

فاکتور رقت می‌تواند شامل مراحل متوالی مختلفی باشد.

$$F = f1\ f2...fk \qquad (ذ-۱)$$

عدم قطعیت نسبی (واریانس) در هر مرحله منفرد مطابق فرمول (ذ-۲) تخمین‌زده می‌شود:

$$u^2_{rel,f} = \left(\frac{Vb}{Vb + Va}\right)\left(u^2_{rel,a} + u^2_{rel,b}\right) \qquad (ذ-۲)$$

که در آن :

V_a حجم سوسپانسیون میکروبی انتقال‌یافته؛

V_b حجم رقت شاهد؛

$u_{rel,a}$ عدم قطعیت نسبی در حجم انتقالی؛

$u_{rel,b}$ عدم قطعیت نسبی حجم رقت شاهد؛

واریانس نسبی کل فاکتور رقت عبارت است از مجموع ریشه دوم عدم قطعیت‌های نسبی منفرد به‌شرح زیر:

$$u^2_{\mathrm{rel,F}} = \mathrm{u}^2_{\mathrm{rel},f1} + \mathrm{u}^2_{\mathrm{rel},f2} + \cdots + \mathrm{u}^2_{\mathrm{rel},fk} \qquad (ذ-۳)$$

مثال: سوسپانسیون اولیه با همگن نمودن ۲۵g از نمونه با ۲۲۵ ml رقیق‌کننده حاصل می‌شود. ترکیب حاصل، رقت اولیه ($۱۰^{-۱}$) است و سوسپانسیون اولیه نام دارد. سوسپانسیون اولیه در چندین مرحله (۱ml + ۹ml) رقیق‌تر شد. رقت‌های با تعداد مناسب کلنی برای شمارش عبارتند از ($۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۵}$). اولین رقت با کلنی‌های قابل‌شمارش، ($۱۰^{-۴}$) سوسپانسیون نهایی خواهدبود.

تکلیف آن است که عدم قطعیت استاندارد نسبی فاکتور رقت، رقت نهایی ($F = 1/10^{-4}$) محاسبه‌شود. این متغیر نشان‌دهنده عدم قطعیت نسبی درست اما ناشناخته میانگین غلظت عامل مورد آزمایش در سوسپانسیون نهایی است.

داده‌های مربوط به عدم قطعیت اندازه‌گیری‌های مختلف جرم و حجم موردنیاز است. این اطلاعات در جدول (ذ-۱) وارد شده‌اند (بهتر است مقادیر از روی مشاهدات برنامه‌های تضمین‌کیفیت آزمایشگاه قابل‌دسترسی باشند).

جدول ذ-۱ داده‌های مربوط به عدم قطعیت نسبی اندازه‌گیری‌های متفاوت جرم و حجم

اندازه‌گیری	عدم قطعیت نسبی	مربع عدم قطعیت
۲۵ g	۰/۰۱	۰/۰۰۰۱
۲۲۵ ml	۰/۰۲۵	۰/۰۰۰۶۲۵
۱ ml	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰۲۵۶
۹ ml	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۰۲۵

عدم قطعیت‌های نسبی مراحل مختلف رقیق‌سازی با فرمول (ذ-۲) به دست می‌آیند. مراحل رقت $f_۲$ ، $f_۳$ و $f_۴$ مشابه هستند. بنابراین:

برای رقت اولیه $u^2_{rel,f1} = (\frac{225}{250})^2 \times (0.025^2 + 0.01^2) = 0.000587$

دیگر مراحل رقیق‌سازی $u^2_{rel,f2} = (\frac{9}{10})^2 \times (0.016^2 + 0.005^2) = 0.000228$

درنتیجه $u^2_{rel,f} = 0.000587 + 0.000228 + 0.000228 + 0.000228 + 20.00028 = 10.00499$

و عدم قطعیت نسبی فاکتور رقت $u_{rel,F} = \sqrt{0.001499} = 0.0387 \approx 3.9\ \%$، می‌شود.

پیوست ر

(الزامی)

تکرار پذیری و تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی شمارش

ر-۱ کلیات

عدم قطعیت خواندن تعداد کلنی‌ها در پلیت اغلب یکی از عمده‌ترین مولفه‌های عدم قطعیت در میکروبیولوژی کمی است. هر شخصی معمولاً می‌تواند نتیجه خواندن خود را با دقت چند درصد تکرار کند. شمارش‌های اشخاص متفاوت توافق اندکی با یکدیگر دارند، که درنتیجه منجر به عدم قطعیت درون آزمایشگاهی معنی‌دار شمارش می‌گردد.

مقادیر این متغیر با خواندن پلیت‌های مشابه توسط کاربرهای متفاوت یا با تکرار خواندن توسط یک کاربر مورد مطالعه و بررسی قرار می‌گیرد. این کار بهتر است به‌عنوان بخشی از برنامه‌های عادی تضمین‌کیفیت آزمایشگاه انجام شود. بهتر است که پلیت‌ها بعد از شمارش اول برای شمارش دوم به صورت تصادفی انتخاب شوند. موردهای مسأله‌دار درصورتی شامل می‌شوند که فقط درحدودی‌که به‌صورت تصادفی انتخاب شده‌اند قرار داشته باشند.

تفاوت فردی به‌ویژه وقتی بارز می‌شود که کلنی‌های هدف بایستی با مشخصات ظاهری خود (شکل، اندازه و رنگ) از بقیه کلنی‌ها قابل تشخیص باشند. به همین‌دلیل، عدم قطعیت نه‌تنها فقط مربوط به کاربران نیست بلکه هم‌چنین به اختصاصات روش و احتمالاً به اختصاصات نوع نمونه نیز بستگی پیدا می‌کند.

تکرارپذیری و تجدیدپذیری شمارش هر دو متغیرهای معنی‌داری هستند. تکرارپذیری می‌تواند در تضمین کیفیت داخلی به‌کار گرفته شود و تجدیدپذیری برای تخمین مقادیر عدم قطعیت مرکب با روش اجرایی مولفه‌ای موردنیاز می‌باشند.

خواندن واکنش‌های مثبت در روش MPN، از خواندن کلنی‌ها قابلیت تجدیدپذیری بیش‌تری دارد. اگرچه اثرات حتی اندک تفاوت خواندن، در مقادیر MPN تاثیر بزرگ می‌گذارد. مشاهدات اخیر نشان داده که تجدیدپذیری خواندن با روش MPN، می‌تواند مورد توجه بیشتری قرار بگیرد.

ر-۲ عدم قطعیت خواندن کاربران

ر-۲-۱ کلیات

تخمین عدم قطعیت خواندن کاربران برخی مقادیر ذاتی دارد، اما این اطلاعات هم‌چنین وقتی موردنیاز است که مولفه‌های عدم قطعیت مثل اثرات گرم‌خانه‌گذاری با آزمایش‌های متفاوت ارزیابی شده باشد. توصیه می‌شود که ارزیابی با هر روش و در هر ارگانیسم هدف به صورت مجزا بررسی شود.

داده‌ها در طول روزها و هفته‌ها جمع‌آوری می‌شوند تا زمانی‌که تعداد کافی (حداقل ۳۰ و یا ترجیحاً بیش‌تر) از پلیت‌ها خوانده شوند.

تنها مشکل عملی آن‌است که چگونه از تاثیر شمارش اول بر دومی اجتناب‌شود. محاسبات نشان‌داده شده در مثال، نحوه پایه‌گذاری تدریجی داده‌ها را تشریح کرده است.

ر-۲-۲ مثال ۱

یکی از کاربران نتایج حاصل از تکرارخواندن نتایج (L_1 , L_2) چندین پلیت را یادداشت‌برداری کرده است. پلیت‌ها به‌صورت تصادفی درطی کارهای روزمره انتخاب شده‌اند. بخش کمی از نتایج در جدول (ر-۱) نشان‌داده شده است.

واریانس نسبی هر جفت با استفاده از فرمول زیر محاسبه شده است.

$$u^2_{\mathrm{rel,L}} = 2\left(\frac{L_1-L_2}{L_1+L_2}\right)$$

جدول ر-۱ نتایج حاصل از تکرارخواندن (L_1 , L_2) چندین پلیت

پلیت	L_1	L_2	$L_1 + L_2$	$L_1 - L_2$	$U^2_{rel,L}$
۱	۳۴۳	۳۳۷	-۶	۶۸۰	۰/۰۰۰۱۵۶
۲	۴۰	۳۹	۱	۷۹	۰/۰۰۰۳۲۰
۳	۵۷	۶۲	-۵	۱۱۹	۰/۰۰۳۵۳۱
۴	۳۹۹	۳۹۷	۲	۷۹۶	۰/۰۰۰۰۱۳
۵	۱۱۲	۱۳۰	-۱۸	۲۴۲	۰/۰۱۱۰۶۴
۶	۳۴۹	۳۲۵	۲۴	۶۷۴	۰/۰۰۲۵۳۶
۷	۸۵	۸۴	۱	۱۶۹	۰/۰۰۰۰۷۰
۸	۱۲۹	۱۲۲	۷	۲۵۱	۰/۰۰۱۵۵۶
۹	۱۶	۱۷	-۱	۳۳	۰/۰۰۱۸۳۷
۱۰	۲۷	۲۷	۰	۵۴	۰/۰۰۰۰۰۰
مجموع	۱۵۵۷	۱۵۴۰			۰/۰۲۱۰۸۳

مقدار میانگین حاصل، همان متوسط تخمین واریانس نسبی خواندن کاربران است:

$$u^2_{\mathrm{rel},L1} = \frac{0.021083}{10} = 0.0021083$$

ریشه دوم آن ۰/۰۴۵۹ است، بنابراین عدم قطعیت استاندارد نسبی تکرارپذیری در شمارش‌های انجام شده توسط این کاربر ٪۴/۶ می‌باشد.

ر-۳ تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی شمارش کلنی‌ها

ر-۳-۱ کلیات

عدم قطعیت درون‌آزمایشگاهی را می‌توان با درگیرکردن همه یا چندین کاربر آزمایشگاه در خواندن پلیت‌های مشابه ارزیابی‌کرد. هر تفاوت سیستماتیک (اریبی‌ها) میان افراد در تخمین عدم قطعیت وارد شده و به عنوان تغییر تصادفی لحاظ می‌شود.

ر-۳-۲ مثال

چهار کاربر (A,B,C,D) درگیر در کار روزمره آزمون‌های میکروبیولوژی نتایج هشت پلیت منتخب تصادفی را به‌صورت مستقل از هم بررسی‌کردند. نتایج در جدول (ر-۲) نمایش داده شده است.

جدول ر-۲ پلیت‌های منتخب تصادفی

پلیت	L_A	L_B	L_C	L_D	میانگین	s_i	$u_{rel,Li}$
۱	۲۱	۲۳	۲۴	۲۶	۲۳/۵	۲/۰۸	۰/۰۸۹
۲	۳۸	۳۸	۴۲	۴۰	۳۹/۵	۱/۹۱	۰/۰۴۸
۳	۲۷	۲۹	۳۴	۳۰	۳۰/۰	۲/۹۴	۰/۰۹۸
۴	۱۶	۲۲	۱۹	۲۱	۱۹/۵	۲/۶۵	۰/۱۳۶
۵	۳۳	۲۵	۳۳	۳۸	۲۳/۳	۵/۳۸	۰/۱۶۷
۶	۶۷	۶۵	۷۴	۶۶	۶۸/۰	۴/۰۸	۰/۰۶۰
۷	۱۶۰	۱۶۶	۱۷۶	۱۷۴	۱۶۹/۰	۷/۳۹	۰/۰۴۴
۸	۸۹	۸۱	۹۴	۹۲	۸۹/۰	۵/۷۲	۰/۰۶۴
مجموع	۴۵۱	۴۴۹	۴۹۶	۴۸۷			

s_i عدم قطعیت استاندارد

$u_{rel,Li}$ عدم قطعیت نسبی استاندارد در شمارش پلیت i ام

حاصل‌جمع‌های پایین جدول (ر-۲) نشان می‌دهد که متوسط نتایج شمارش می‌تواند بین کاربران از A تا D متفاوت باشد که سبب دو دسته تفسیر شود. مجموعه داده‌ها برای نتیجه‌گیری قاطع بسیار کوچک است. تفاوت‌های سیستماتیک احتمالی می‌تواند سزاوار بررسی باشد، اما به زودی در عدم قطعیت استاندارد ادغام می‌شود.

مجموع مربعات $u_{rel,Li}$ (مجموع واریانس‌های نسبی)، $0.089^2 + 0.048^2 + ... + 0.064^2 = 0.075846$

و میانگین آن‌ها ۰/۰۰۹۴۸۰۷۵ می‌باشد. این مقدار تخمین مطلوب، متوسط واریانس تجدیدپذیری نسبی خواندن نتایج در آزمایشگاه به صورت یکپارچه می‌باشد. ریشه دوم آن به‌مقدار ۰/۰۹۷۴، عبارت از متوسط عدم قطعیت درون آزمایشگاهی نسبی شمارش با همان روش و گروه کاربران است (٪ ۹/۷).

این تخمین به‌صورت سخت‌گیرانه تنها در موقعیت‌های مشابه (نوع نمونه یکسان، روش یکسان، گروه کاربران یکسان) کاربرد دارد.

ر-۴ تجدیدپذیری درون‌آزمایشگاهی ناشی از عدم قطعیت خواندن نتایج MPN

ر-۴-۱ کلیات

عدم قطعیت درون آزمایشگاهی خواندن نتایج MPN را می‌توان به کمک کاربران مختلف جهت خواندن سری‌های روزمره MPN مورد بررسی قرارداد و هیچ آزمایش خاصی موردنیاز نیست.

ممکن‌است در ثبت متوسط اختلاف‌ها و عدم قطعیت‌های چاهک‌ها یا لوله‌های مثبت مزایای چندی وجود داشته باشد، اما اثر واقعی عدم قطعیت، در تخمین‌های MPN دیده شده است. محاسبات عدم قطعیت با مقادیر MPN انجام می‌شود.

ر-۴-۲ مثال

آزمون *E.coli* در آب با استفاده از سیستم MPN تجاری انجام شد. نتایج در بسیاری از نمونه‌های روزمره توسط دو کاربر خوانده شد و مقادیر MPN از جداول به دست‌آمد. نتایج هفت نمونه ابتدایی مجموعه در جدول ر-۳ نشان داده شده است. عددها نشان‌دهنده مقادیر MPN در ۱۰۰ ml آب است .

جدول ر-۳ مجموعه نتایج

نمونه	x_1	x_2	واریانس نسبی	لگاریتم اعشاری واریانس
۱	۳۴۵۰	۳۵۰۰	۰٫۰۰۰۱	۰٫۰۰۰۰۲
۲	۴	۴	۰٫۰۰۰۰	۰٫۰۰۰۰۰
۳	۱۲	۱۴	۰٫۰۱۱۹	۰٫۰۰۲۲۴
۴	۱۲۶	۱۳۰	۰٫۰۰۰۵	۰٫۰۰۰۰۹
۵	۱۴	۱۴	۰٫۰۰۰۰	۰٫۰۰۰۰۰
۶	۱۳	۱۷	۰٫۰۳۶۰	۰٫۰۰۶۷۹
۷	۳	۴	۰٫۰۴۱۴	۰٫۰۰۷۸۰
	میانگین		۰٫۰۱۲۸	۰٫۰۰۲۴۲

واریانس نسبی طبق فرمول (ر-۱) محاسبه می‌شود :

$$u_{rel}^2 = \frac{(\ln x_1 - \ln x_2)^2}{2} \qquad (ر-۱)$$

و مقدار واریانس برحسب لگاریتم اعشاری مطابق فرمول (ر-۲) به دست می‌آید :

$$\frac{(lg_{x1} - lg_{x2})^2}{2} \qquad (ر-۲)$$

ریشه دوم میانگین واریانس نسبی، همان متوسط مقدار عدم‌قطعیت‌نسبی MPN ناشی از عدم قطعیت خواندن نتایج توسط کاربرهای متفاوت است. آن‌را می‌توان عدم‌قطعیت تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی خواندن نتایج نامید. مقدار آن براساس همین مجموعه محدود داده‌ها برابر $\sqrt{0.128} = 0.113 = 11.3\ \%$ است.

با استفاده از لگاریتم اعشاری، ابتدا متوسط عدم قطعیت به‌مقدار ریشه دوم ۰٫۰۰۲۴۲ یعنی مقدار ۰٫۰۴۹۲ خواهدشد و با تبدیل آن به لگاریتم طبیعی می‌شود : $u_{rel} = 2.303 \times 0.049\,2 = 0.113\,3 \approx 11.3$ با افزایش تعداد نمونه‌ها، مقدار میانگین به واقعیت نزدیک‌تر می‌شود.

ر-۵ عدم قطعیت نسبی خواندن مجموعه‌ای از شمارش‌ها

حاصل‌جمع شمارش کلنی‌های چند پلیت از جمله عناصر محاسبه نتایج نهایی در زمانی است که از شیوه چند پلیتی استفاده می‌شود. هیچ داده تجربی کافی وجود ندارد که بر اساس آن بتوان تصمیم‌گیری‌کرد که

عدم قطعیت خواندن یک حاصل جمع به‌تعداد بخش‌هایی که آن‌را تشکیل داده است، بستگی دارد. اگرچه مشخص شده‌است که هر زمان تعداد کلنی‌ها در پلیت‌های مشابه افزایش یابد، عدم قطعیت نسبی خواندن چندان تغییری نمی‌کند.

درحال‌حاضر پیشنهاد می‌شود که از عدم قطعیت نسبی خواندن مشابه، هم برای شمارش‌های منفرد و هم مجموع شمارش‌ها استفاده شود. مقدار عدم قطعیت تخمین زده شده در تجربه‌های عملی که قبلاً در پیوست‌های (ر-۲) و پیوست (ر-۳) تشریح شده است، به همان ترتیب برای مجموعه کلنی‌ها نیز کاربرد دارد.

پیوست ز

(الزامی)

اثرات گرم‌خانه‌گذاری – عدم قطعیت ناشی از موقعیت و زمان

ز-۱ کلیات

هنگام گرم‌خانه‌گذاری ممکن‌است مواردی رخ‌دهد که منجر به تغییر تعداد کلنی‌ها در پلیت‌ها شود. کلنی‌ها ممکن‌است رشد نکنند یا در سطح محیط‌کشت پخش‌شوند. ممکن‌است به کلنی‌های مجاور نفوذ کرده و یا با آن‌ها ادغام شوند و در کل ظاهر عجیبی به خود بگیرند. آلودگی می‌تواند تعداد کلنی‌ها را افزایش‌دهد. در نتیجه تعداد کلنی‌های مشاهده‌شده بعد از گرم‌خانه‌گذاری می‌تواند نسبت به تعداد ذرات زنده (ناشناخته) تشکیل شده کلنی که از ابتدا در هر پلیت قرار گرفته بودند، متفاوت باشد. زمانی‌که شرایط گرم‌خانه‌گذاری به حدود رواداری برخی از اعضاء در جمعیت هدف نزدیک باشد، تغییرات جزئی در شرایط (دما، رطوبت، اتمسفر) سبب می‌شود که نقاط مختلف گرم‌خانه اثرات متفاوتی برجای بگذارند.

حتی اگر تعداد ذرات تشکیل‌دهنده کلنی در یک مجموعه از پلیت‌ها، از سوسپانسیونی تهیه شده باشد که احتمالاً از قانون پواسون پیروی می‌کند، اثرات شرایط گرم‌خانه‌گذاری منجر به پراکندگی بالا در پلیت‌های موازی خواهد شد. اثرات در طول گرم‌خانه‌گذاری بروز می‌کند. آن را می‌توان اثرات گرم‌خانه‌گذاری نامید، اگرچه احتمالاً علت اصلی آن کم‌تر مربوط به تجهیز گرم‌خانه‌گذاری (انکوباتور) است و احتمالاً بیش‌تر به کنش و واکنش میان اعضاء متفاوت در جمعیت میکروبی درون پلیت‌ها بستگی دارد.

برای هر روش آزمون یک دوره زمانی استاندارد شده برای خواندن نتایج آزمون وجود دارد. توصیه می‌شود آزمایشگاه‌ها در کارهای روزمره خود تعیین‌کنند که چه مقدار از عدم قطعیت کل نتایج آن‌ها ممکن است بر اثر متفاوت بودن زمان گرم‌خانه‌گذاری، نسبت به شرایط واقعی به وجود آمده باشد. این متغیر را می‌توان به راحتی با طراحی عملیات تجربی و با خارج‌کردن پلیت‌ها از گرم‌خانه در زمان‌هایی زودتر از زمان استانداردشده هر روش، که به صورت تصادفی تعیین شده‌اند و خواندن نتایج آن‌ها شناسایی‌کرد.

عواملی که بر اثر نقص در محیط‌کشت از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کنند به یک نسبت در کلیه پلیت‌ها تاثیر می‌گذارند. سایر اثرات می‌تواند ثانوی بوده و مثلاً محدود به یک پلیت باشد. آلوده‌شدن یکی از بارزترین مثال‌ها می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرات هم‌افزایی بین کلنی‌ها از مثال‌های دیگرند. برخی خطاهای دیگر می‌تواند اتفاق بیافتد. به این دلایل برای مدل‌سازی تعیین پراکندگی بالای ناشی از گرم‌خانه‌گذاری، شانس نسبتاً کمی وجود دارد. می‌توان با رویکرد تجربی بر مبنای پلیت‌های موازی عمل کرد، اما تشریح ریاضی صحیح آن از منطق محکمی برخوردار نخواهد بود. در نتیجه، با فرض متناسب دانستن میانگین با اثرات شرایط گرم‌خانه‌گذاری می‌توان از مدل توزیع دوجمله‌ای منفی در این خصوص استفاده کرد. این شیوه تا حد امکان به نتیجه تقریباً درست، ساده و واقعی‌تری منتهی می‌شود.

ز-۲ طرح تجربی

تجربه برپایه سوسپانسیون‌های آزمون به خوبی مخلوط‌شده قرار دارد. تنها الزام این است که سوسپانسیون‌های آزمون دارای آن مقدار از غلظت جمعیت میکروبی باشند که بتوانند مستقیماً کشت داده شوند. نمونه‌های روزمره معمولی یا رقت‌های آن‌ها بهترین هستند. برای کاستن از تأثیرات دیگر غیر از اثرات گرم‌خانه‌گذاری، بهتر است شرایط تکرارپذیری در طول آماده‌سازی برقرار باشد. مجموعه‌ای از شش تا ده پلیت موازی از هر سوسپانسیون آزمون تهیه می‌شود. مجموع حجم آزمونه‌های واردشده در پلیت‌ها نباید بیش‌تر از ٪۱۰ حجم سوسپانسیون باشد تا از به‌کارگیری فاکتور اصلاح نمونه محدود (پیوست پ) پیش‌گیری شود.

بهتر است پلیت‌ها در موقعیت تصادفی مناسب در گرم‌خانه قرارگیرند. هم‌چنین بهتر است که بعد از گرم‌خانه‌گذاری همه پلیت‌ها توسط فقط یکی از کاربران خوانده شود. واریانس کل بین پلیت‌های موازی محاسبه شده و مولفه واریانس ذاتی (پواسون) از آن کم می‌شود. اگر دلایلی مبنی بر حضور معنی‌دار عدم قطعیت شمارش و/یا عدم قطعیت حجم آزمونه وجود داشته باشد، بهتر است آن‌ها نیز از واریانس کل تفریق شوند. باقی‌مانده همان عدم قطعیت ناشی از گرم‌خانه‌گذاری است. طراحی کامل ترتیبات تصادفی کمیت‌های اثرگذار در گرم‌خانه‌گذاری آسان نیست. طرح تجربی مناسب‌تر آن است که فضای گرم‌خانه به طبقات، ناحیه‌ها و ردیف‌هایی به شرح زیر تقسیم‌بندی شود:

الف- طبقات ۱ ، ۲ و ۳ در گرم‌خانه

ب- ۶ ناحیه در هر طبقه شامل : جلو و عقب سمت چپ (LF,LB)، جلو و عقب سمت وسط (MF,MB)، جلو و عقب سمت راست (RF,RB)

ج- چینش چند ردیف پلیت روی همدیگر

هر پلیت از سری‌های موازی به‌صورت تصادفی در یک طبقه، یک ناحیه و در ردیف‌هایی خاص که از طریق قرعه‌کشی انتخاب شده‌اند، درون گرم‌خانه قرار می‌گیرند. پلیت‌ها در موقعیت‌های خود در میان سایر پلیت‌های روزمره معمول جای می‌گیرند. به‌منظور تسهیل جداسازی پلیت‌ها بعد از تکمیل گرم‌خانه‌گذاری، توصیه می‌شود از علامت مشخصی با رنگ‌های خاص روی پتری‌دیش‌ها استفاده شود. اگر بیش‌تر از یک گرم‌خانه استفاده می‌شود، گرم‌خانه‌ای که در آن همه پلیت‌های موازی جای‌گذاری می‌شوند، می‌تواند با قرعه‌کشی انتخاب شود. انتخاب تصادفی گرم‌خانه برای هر پلیت به صورت مجزا از لحاظ تئوری بهترین جایگزین است اما از نظر عملی سخت می‌باشد.

جدول ز-۱ مثالی از موقعیت انتخاب‌شده تصادفی و زمان گرم‌خانه‌گذاری یک مجموعه شش پلیتی

پلیت	طبقه	ناحیه	ردیف	زمان
۱	۲	۳	۵	t_{min} + ۳٫۵ ساعت
۲	۲	۳	۳	t_{min} + ۳ ساعت
۳	۳	۲	۲	t_{min} + ۴ ساعت
۴	۲	۵	۲	t_{min} + ۲٫۵ ساعت
۵	۳	۲	۵	t_{min} + ۱ ساعت
۶	۱	۴	۴	t_{min} + ۰٫۵ ساعت

t_{min} کوتاه‌ترین زمان مجاز گرم‌خانه‌گذاری است. افزایش زمان به t_{min} به‌صورت تصادفی از صفر تا هشت دوره نیم‌ساعته انجام‌شد. یک‌چنین ترتیب تصادفی می‌تواند به‌صورت جداگانه برای هر سری پلیت‌های هر سوسپانسیون آزمون طراحی‌گردد.

ز-۳ مثال ۱ – روش شمارش کلنی

شش مقدار ۱۰ml از یک نمونه آب ۱۰۰۰ml با روش فیلترکردن غشایی کشت داده شد. موقعیت گرم‌خانه‌گذاری شامل سه طبقه و شش ناحیه به ازاء هر طبقه و شش ردیف با قرعه‌کشی به‌صورت تصادفی انتخاب می‌شود. ردیف پلیت‌ها از پایین به بالا، دارای شماره یک تا شماره شش است. این پلیت‌ها در میان پلیت‌های روزمره قرار داده شدند. مجموعه پلیت‌های مشابه با دیگر نمونه‌ها در روزهای دیگری بررسی شدند. جدول (ز-۲) و جدول (ز-۳) موقعیت اختصاص داده شده تصادفی و تعداد کلنی‌های مشاهده‌شده، n_c در این تجربه را نشان می‌دهد.

جدول ز-۲ نمونه ۱

پلیت	طبقه	ناحیه	ردیف	زمان	n_c
۱	۲	۵	۵	۱۹٫۵	۲۵
۲	۱	۴	۴	۱۸٫۰	۴۰
۳	۱	۳	۱	۲۲٫۰	۵۴
۴	۳	۶	۱	۲۱٫۵	۳۲
۵	۳	۴	۶	۱۹٫۵	۲۰
۶	۱	۱	۴	۲۱٫۰	۳۵

جدول ز-۳ نمونه ۲

پلیت	طبقه	ناحیه	ردیف	زمان	n_c
۱	۱	۳	۲	۲۱٫۰	۱۱۴
۲	۳	۲	۲	۲۲٫۰	۱۶۲
۳	۱	۴	۶	۲۱٫۰	۶۱
۴	۳	۴	۱	۲۱٫۰	۱۴۲
۵	۲	۶	۵	۲۰٫۰	۱۰۵
۶	۱	۶	۳	۲۰٫۵	۱۵۵

در اولین نمونه میانگین برابر ۳۴٫۳۳۳۳، عدم قطعیت استاندارد برابر ۱۱٫۹۷۷۸، عدم قطعیت استاندارد نسبی برابر ۴۳٫۳۳۳۳ /۱۱٫۹۷۷۸ = ۰٫۳۴۸۹ و واریانس نسبی ۰٫۱۲۱۷ = $۰٫۳۴۸۹^۲$ است.

در نمونه دوم میانگین برابر ۱۲۳٫۱۶۶۷، عدم قطعیت استاندارد برابر ۳۷٫۸۲۸، عدم قطعیت استاندارد نسبی برابر ۰٫۳۰۷۱ و واریانس نسبی برابر ۰٫۰۹۴۳ = $۰٫۳۰۷۱^۲$ می‌باشد.

تخمین عدم قطعیت‌های استاندارد نسبی شامل عدم قطعیت پواسون، عدم قطعیت کاربران در شمارش، و عدم قطعیت اندازه‌گیری حجم آزمونه‌ها نیز می‌باشد. توصیه می‌شود که واریانس‌ها ابتدا از این مولفه‌ها پاک‌سازی‌شوند. مولفه نمونه‌برداری، $6 \times 10\ ml / 1000\ ml = 0.060$ به قدرکافی کوچک و قابل اغماض است.

میانگین نمونه اول 34.3333 است. واریانس نسبی یک توزیع پواسون نامحدود (پیوست- پ) این میانگین $1/34.3333 = 0.0291$ می‌باشد.

با فرض پذیرش تخمین عدم قطعیت شمارش‌ها و عدم قطعیت اندازه‌گیری آزمونه در حدود ٪ ۵ (مقادیر حاصل از برنامه‌های تضمین کیفیت آزمایشگاه) مقدار آن، $0.05^2 = 0.0025$ دو بار کسر می‌گردد.

تخمین خالص واریانس نسبی اثرات گرم‌خانه‌گذاری در نمونه اول به صورت زیر است:

$$0.3489^2 - (0.0291 + 0.0025 + 0.0025) = 0.1217 - 0.0341 = 0.,0876.$$

و در نمونه دوم تخمین زیر حاصل می‌شود:

$$0.3071^2 - (0.0081 + 0.0025 + 0.0025) = 0.0943 - 0.0131 = 0.0812.$$

میانگین دو واریانس نسبی برابر ۰٫۰۸۴۴، و ریشه دوم آن ۰٫۲۹ یا ٪۲۹ است که همان عدم قطیت اضافه‌شده (پراکندگی بالا)، ناشی از اثرات گرم‌خانه‌گذاری می‌باشد.

ز-۴ مثال ۲ روش MPN

ز-۴-۱ طراح تجربی

پنج سری اثرات تجربی گرم‌خانه‌گذاری با تدارک شش آزمون موازی بر پنج نمونه آب متفاوت در دو نوبت A و B انجام شد. روش مورد استفاده یک سیستم تجاری برای *E. coli* به روش MPN بود. سینی‌ها در موقعیت‌های تصادفی آن‌چنان که در قبل شرح داده شده، گرم‌خانه‌گذاری شدند. برخی از داده‌ها (نتایج دو سری) همراه با موقعیت‌های تعیین شده تصادفی در جدول (ز-۴) نشان داده شده است. اثرات زمان مطالعه نشده‌اند. همه سینی‌ها در یک زمان خاص (۱۸ ساعت) از گرم‌خانه برداشته شدند.

شناسه‌های هر موقعیت عبارتند از : L = چپ، M = وسط، R = راست، F = جلو، B = عقب. چیدن حداکثر ده ردیف سینی روی یکدیگر مجاز بود.

تعاریف علامت‌های مورد استفاده در جدول ز-۴ به شرح زیر است :

n_+ تعداد چاهک‌های مثبت

n_{MP} مقدار MPN

T_0 حدود پایین‌تر ضریب اطمینان ٪۹۵

T_1 حدود بالاتر ضریب اطمینان ٪۹۵

واریانس توزیع نسبی از فرمول $u^2_{d,rel} = \left(\frac{\ln T1 - \ln T0}{3.92}\right)^2$ مطابق پیوست ت محاسبه می‌شود.

جدول ز-۴ نتایج تجربه عملی بررسی اثرات گرم‌خانه‌گذاری

نمونه	سینی	طبقه	ناحیه	ردیف	چاهک مثبت	مقدار MPN	T_0	T_1	$\ln n_{MP}$	$u^2_{d,rel}$
A	۱	۲	RB	۶	۳۶	۶۲٫۴	۴۴٫۶	۸۸٫۸	۴٫۱۳۳۶	۰٫۰۳۰۹
	۲	۱	LF	۳	۴۱	۸۳٫۱	۵۹٫۹	۱۱۸٫۳	۴٫۴۲۰۰	۰٫۰۳۰۱
	۳	۲	RF	۳	۳۵	۵۹٫۱	۴۲٫۰	۸۴٫۴	۴٫۰۷۹۲	۰٫۰۳۱۷
	۴	۲	MF	۷	۳۷	۶۵٫۹	۴۷٫۲	۹۳٫۷	۴٫۱۸۸۱	۰٫۰۳۰۶
	۵	۲	LF	۱	۳۶	۶۲٫۴	۴۴٫۶	۸۸٫۸	۴٫۱۳۳۶	۰٫۰۳۰۹
	۶	۱	RB	۱	۴۲	۸۸٫۵	۶۳٫۹	۱۲۶٫۲	۴٫۴۸۳۰	۰٫۰۳۰۱
								s(ln nMP)	۰٫۱۶۸۹	
								میانگین		۰٫۰۳۰۷
B	۱	۳	MF	۵	۳۷	۶۵٫۹	۴۷٫۲	۹۳٫۷	۴٫۱۸۸۱	۰٫۰۳۰۶
	۲	۲	LF	۴	۳۹	۷۳٫۸	۵۳٫۱	۱۰۴٫۸	۴٫۳۰۱۴	۰٫۰۳۰۱
	۳	۲	LF	۹	۴۲	۸۸٫۵	۶۳٫۹	۱۲۶٫۲	۴٫۴۸۳۰	۰٫۰۳۰۱
	۴	۱	RF	۸	۲۷	۳۸٫۴	۲۶٫۴	۵۶٫۶	۳٫۶۴۸۱	۰٫۰۳۷۹
	۵	۳	RB	۱	۳۷	۶۵٫۹	۴۷٫۲	۹۳٫۷	۴٫۱۸۸۱	۰٫۰۳۰۶
	۶	۳	RF	۹	۳۲	۵۰٫۴	۳۵٫۴	۷۵٫۲	۳٫۹۲۰۰	۰٫۰۳۶۹
								s(ln nMP)	۰٫۲۹۵۵	
								میانگین		۰٫۰۳۲۷

ز-۴-۲ محاسبات

برای محاسبه مراحل زیر را دنبال‌کنید :

الف- عدم قطعیت استاندارد در شش مقدار موازی یک نمونه مستقیماً با محاسبه عدم قطعیت استاندارد مقادیر MPN در مقیاس لگاریتمی طبیعی به دست می‌آید.

نمونه A : عدم قطعیت استاندارد $\ln n_{MP} = s(\ln n_{MP}) = u_{rel} =$ ۰٫۱۶۸۹

نمونه B : عدم قطعیت استاندارد $\ln n_{MP} = s(\ln n_{MP}) = u_{rel} =$ ۰٫۲۹۵۵

یادآوری- اگر لگاریتم اعشاری ارجح باشد، مقدار حاصل را در ۲/۳۰۳ ضرب کنید.

نمونه A : عدم قطعیت استاندارد $u_{rel} = 2.303 \times 0.0734 = 0.1690$ ، $\lg n_{MP} = 0.0734$

نمونه B : عدم قطعیت استاندارد $urel = 2.303 \times 0.1283 =$ ، $\lg nMP = 0.128\ 3$

0.2955

ب واریانس نسبی، مربع عدم قطعیت‌های استاندارد نسبی است که به صورت زیر محاسبه می‌شود :

نمونه A : $0.1689^2 = 0.0285$

نمونه B : $0.2955^2 = 0.0873$

پ- واریانس ذاتی توزیع، $u^2_{d,rel}$ به صورت مجزا برای هر تخمین MPN با حدود اطمینان ۹۵٪ بر اساس لگاریتم‌های طبیعی طبق پیوست- ت به دست می‌آید. مقدار میانگین واریانس ذاتی نسبی عبارت است از : داخلی به صورت زیر به دست آمد:

میانگین نمونه A $u^2_{d,rel} = 0.0307$ ، میانگین نمونه B $u^2_{d,rel} = 0.0327$

ت- تفریق کردن میانگین واریانس توزیع از واریانس نسبی اثرات گرم‌خانه‌گذاری :

نمونه A : $u^2_{rel,I} = 0.028\ 5 - 0.0307 = \mathbf{-\ 0.0022}$

نمونه B : $u^2_{rel,I} = 0.0873 - 0.,0327 = \mathbf{0.0546}$.

یادآوری- از لحاظ نظری واریانس هرگز منفی نیست. با وجود این، زمانی‌که تخمین واریانس به‌کمک تفریق محاسبه می‌شود و واریانس‌های تجربی حاصل با تعداد تکرار کم به‌دست آمده‌باشد، چنین حالتی اتفاق می‌افتد.

ث- میانگین واریانس اثرات گرم‌خانه‌گذاری، همان تخمین اثرات گرم‌خانه‌گذاری است. میانگین آن در دو نمونه A و B عبارت است از :. $(-0.0022 + 0.0546)/2 = 0.0262$

ج- ریشه دوم واریانس میانگین عبارت‌است از تخمین عدم‌قطعیت استاندارد مولفه اثرات گرم‌خانه‌گذاری که همچنین می‌توان آن‌را به صورت درصد نیز بیان‌کرد. ریشه دوم 0.0262 مساوی‌است با 0.162 یا $0{,}16 \approx$ $= 16\ \%$.

با تغییر فاحش مشاهده‌شده میان دو سری از نمونه A و B، بدیهی است که برای به دست‌آوردن یک تخمین واقعی، نمونه‌های قابل ملاحظه بیش‌تری باید مورد بررسی قرار بگیرند.

یادآوری- بهتر است که تخصیص تصادفی موقعیت‌های مکانی و زمان گرم‌خانه‌گذاری، در طراحی رویکرد کلی‌نگر تخمین عدم قطعیت مورد استفاده قرار بگیرد.

پیوست ژ

(اطلاعاتی)

نحوه بیان وکاربرد عدم قطعیت اندازه‌گیری

ژ-۱ کلیات

استاندارد ملی ایران ایزو-آی‌ای‌سی شماره ۱۷۰۲۵ آزمایشگاه‌ها را ملزم می‌کند تا عدم قطعیت نتایج آزمون خود را تعیین‌نمایند. مشتری نیازمند تخمین عدم قطعیت به همراه نتایج آزمون است تا بتواند تصمیمات درستی اتخاذ کند. نهادهای تأیید صلاحیت ممکن است بخواهند که مقدار تخمین چقدر است و نحوه محاسبه آن چگونه است. آزمایشگاه می‌تواند از این اطلاعات جهت بهبود عملیات خود استفاده‌کند.

وقتی‌که آزمایشگاه از دستورالعمل‌های این استاندارد استفاده‌کند، قادر خواهد بود که تخمین عدم قطعیت عملیاتی u_o را برای هر روش آزمون مرتبط و هر نوع نمونه تحت شرایط تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی (دقت میانی) به دست‌آورد. در رویکرد مولفه‌ای عدم قطعیت اندازه‌گیری به صورت عدم قطعیت استاندارد نسبی بیان می‌شود. در رویکرد کلی‌نگر، مقادیر در مقیاس لگاریتمی اعشاری بیان‌می‌شوند.

تمایل آزمایشگاه و عوامل تأیید صلاحیت ممکن است به مقدار زیاد معطوف به تأمین مقادیر عدم قطعیت عملیاتی و/یا مولفه‌های موجود آن باشد. همچنین عدم قطعیت اندازه‌گیری مرکب نیز می‌تواند از جمله علایق باشد. احتمال دیگر این است که مشتری می‌تواند درخواست تخمین عدم قطعیت اندازه‌گیری گسترده با حدود اطمینان ٪۹۵ و یا حدود سایر بازه‌های تخمینی را داشته باشد.

بر اساس دستورالعمل بیان شده در کتاب‌نامه شماره (۷) اعلام عدم قطعیت اندازه‌گیری به صورت محدوده‌ای از مقادیر که مقدار واقعی اندازه‌ده در بین آن‌ها قرار داشته باشد، تناقضی با سایر مفاهیم عدم قطعیت ندارد. چون‌که توجه این استاندارد معطوف به‌دقت (بی‌دقتی) نتیجه آزمون است، سایر مفاهیمی که بر تخمین دلالت دارند، مثل نظریه بایز[1] و محدوده میانگین جمعیت‌ها، همین منظور را ارائه می‌دهند.

ژ-۲ عدم قطعیت اندازه‌گیری مرکب

ژ-۲-۱ کلیات

در صورت درخواست مشتریان یا عوامل تأیید صلاحیت، عدم قطعیت اندازه‌گیری مرکب، با استفاده از نتیجه آزمون، n_z، و عدم قطعیت عملیاتی نسبی، $u_{o,rel}$ ، محاسبه می‌شود.

ژ-۲-۲ عدم قطعیت مرکب شمارش کلنی‌ها

مقیاس اندازه‌گیری متناسب با هدف استفاده از عدم قطعیت مرکب طبق فرمول‌های ژ-۱ تا ژ-۳ انتخاب می‌شود :

الف- مقیاس بازه‌ای

1 Bayes

$$u_c = \sqrt{n_z + u_{o,rel}^2 n_z^2}$$ (ژ-۱)

که در آن :

$u_{o,rel}$ مولفه عدم قطعیت عملیاتی نسبی؛

n_z تعداد کلنی‌های مشاهده‌شده است.

ب- مقیاس لگاریتم طبیعی و نسبی

$$u_{c,rel} = \sqrt{\frac{1}{n_z} + u_{o,rel}^2}$$ (ژ-۲)

پ) مقیاس لگاریتم اعشاری

$$uc(lg) = \sqrt{\frac{0.1886}{n_z} + u_{o(lg)}^2}$$ (ژ-۳)

که در آن ، $u_{o(lg)}$ عدم قطعیت عملیاتی برحسب لگاریتم اعشاری، است (پیوست- پ).

ژ-۲-۳ عدم قطعیت مرکب شمارش کلنی‌های تاییدشده

عدم قطعیت مرکب شمارش کلنی‌های تاییدشده در مقیاس لگاریتم طبیعی و نسبی با استفاده از فرمول (ژ-۴) یا فرمول (ژ-۵) و سایر مقیاس‌ها به شرح زیر است :

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{o,rel}^2 + \frac{1}{n_c} + \frac{n_z - n_k}{n_z n_k}}$$ (ژ-۴)

یا

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{o,rel}^2 + \frac{1}{n_c} + \frac{(n_k+0.5)(n_z-n_k+0.5)n_z^2}{(n_z+1)^2(n_z+2)n_k^2}}$$ (ژ-۵)

که در آن :

n_c تعداد کل کلنی‌های هدف احتمالی شمارش‌شده؛

n_z تعداد کل کلنی‌های هدف جدا شده جهت تأیید؛

n_k تعداد کلنی‌های تأییدشده؛

سپس تبدیل این مقادیر به صورت لگاریتم اعشاری، بهتر انجام می‌شود.

مقیاس بازه‌ای: $u_c = n_c u_{c,rel}$

مقیاس لگاریتمی معمولی : $u_{c\,(lg)} = ۰/۴۳۴۳\, u_{c,rel}$

(پیوست- ث)

ژ-۲-۴ عدم قطعیت مرکب در شمارش MPN

عدم قطعیت مرکب شمارش MPN با استفاده از فرمول‌های (ژ-۶) به دست می‌آید :

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{o,rel}^2 + \left(\frac{\ln T_1 - \ln T_0}{3.92}\right)^2}$$

$$u_{c(lg)} = \sqrt{u_{o(lg)}^2 + \left(\frac{\lg T_1 - \ln T_0}{3.92}\right)^2}$$ (ژ-۶)

که در آن :

T_1 حد بالاتر ضریب اطمینان ٪ ۹۵ مقادیر MPN؛

T_0 حد پایین‌تر ضریب اطمینان ٪ ۹۵ مقادیر MPN؛

$u_{o,rel}$ عدم قطعیت عملیاتی نسبی (لگاریتم طبیعی)؛

$u_{o(lg)}$ همان عدم قطعیت در مقیاس لگاریتم اعشاری؛

(پیوست- ت)

ژ-۲-۵ عدم قطعیت اندازه‌گیری مرکب بین آزمایشگاهی

تخمین و استفاده از عدم قطعیت تجدیدپذیری بین آزمایشگاهی در این استاندارد مورد بررسی قرار نمی‌گیرد. زمانی‌که نیاز باشد، بررسی موارد مرتبط با تخمین عدم قطعیت تجدیدپذیری بین آزمایشگاهی را می‌توان از داده‌های آزمون مهارت استخراج‌کرد. تخمین متغیرها تخمین زده شده، یعنی عدم قطعیت تجدیدپذیری بین آزمایشگاهی استاندارد، s_R از آزمون نمونه‌های مرجع مشخص در آزمایشگاه‌های متفاوت به دست می‌آید.

در زمان انتشار این استاندارد، مدرکی توسط استاندارد فرانسه (کتاب‌نامه شماره ۹) در دست تهیه است که شامل جزئیات پروتکل کاربرد داده‌های کنترل‌کیفیت برای تخمین سطوح متفاوت عدم قطعیت اندازه‌گیری (تکرارپذیری، تجدیدپذیری درون آزمایشگاهی و بین آزمایشگاهی) است.

ژ-۲-۶ عدم قطعیت اندازه‌گیری مرکب گسترده

در صورت لزوم عدم قطعیت مرکب گسترده U را می‌توان با ضرب تخمین عدم قطعیت مرکب در فاکتور پوششی k به دست آورد. مقدار (k = ۲)، نیم‌پهنای تقریب ٪ ۹۵ تخمینی بازه‌ای است و (k = ۳)، نیم‌پهنای ٪۹۹ تخمینی بازه‌ای را نشان می‌دهد.

ژ-۳ تخمین‌گر بازه‌ای

ژ-۳-۱ کلیات

توزیع آماری شمارش‌های میکروبی در شمارش‌های موازی از یک سوسپانسیون یا از آزمون‌های تکرارشده، با درجات مختلفی نامتقارن (مورب) است. با افزایش عدم قطعیت عملیاتی، نامتقارن‌بودن نیز افزایش می‌یابد. تعیین دقیق مرزهای حدود اطمینان نیازمند یک مدل منطقی از توزیع احتمالی شمارش و کاربرد برنامه‌های رایانه‌ای می‌باشد. این امکانات در این استاندارد ارائه نشده است. دو نوع تقریب که محاسبه آن آسان است ارائه می‌شود. این دو نوع با حدود دقیق و حدود بر اساس تئوری بایز در نمونه‌های آزمون‌شده، مقایسه شده‌اند.

ژ-۳-۲ بازه‌های اطمینان دقیق

چون‌که هیچ شکی در کاربرد مدل توزیع دوجمله‌ای در شمارش‌های میکروبی مطرح نشده است، احتمالاً بهترین تقریب ساده برای این هدف است. حدود اطمینان دقیق را می‌توان با واردکردن تخمین متغیرهای (میانگین و عدم قطعیت عملیاتی) در توابع توزیع احتمالات آماری مناسب محاسبه‌کرد. به عنوان مثال حدود اطمینان ٪۹۵ را می‌توان با مشاهده نقاط ٪۲٫۵ و ٪۹۷٫۵ از تابع چگالی احتمال به دست‌آورد. استفاده از برنامه‌های کامپیوتری لازم است.

ژ-۳-۳ تقریب توسط حدود متقارن در مقیاس بازه‌ای

تخمین تقریب بازه‌ای را می‌توان بدون استفاه از رایانه انجام‌داد. در اطراف مقدار مشاهده‌شده در مقیاس بازه‌ای، حدود به صورت متقارن است. فرض بر این می‌باشد که شمارش مشاهده‌شده، تخمینی بدون اریبی از میانگین است. این حدود مطابق پیوست (ژ-۲-۲) و با استفاده از فرمول (ژ-۷) به دست می‌آید :

$$T_0 = n_z - 2\sqrt{n_z + u_{o,rel}^2 n_z^2} \qquad (ژ-۷)$$

$$T_1 = n_z + 2\sqrt{n_z + u_{o,rel}^2 n_z^2}$$

که در آن :

T_0 حد پایین‌تر تخمین‌گر بازه‌ای؛

T_1 حد بالاتر تخمین‌گر بازه‌ای؛

n_z تعداد کلنی‌های مشاهده‌شده؛

$u_{o,rel}$ عدم قطعیت عملیاتی نسبی، است.

یادآوری- اگر تعداد کلنی‌های مشاهده‌شده مشتمل بر شمارش‌های حاصل از پلیت‌های موازی سوسپانسیون نهایی یا از پلیت‌های با رقت متفاوت باشد، محاسبات بر اساس مجموع کلنی‌های شمارش‌شده انجام می‌شود. تخمین‌های بازه‌ای آن با استفاده از فرمول (ژ- ۸) به دست می‌آید :

$$T_0 = \sum n_z - 2\sqrt{\sum n_z + u_{o,rel}^2 (\sum n_z)^2} \qquad (ژ-۸)$$

$$T_1 = \sum n_z + 2\sqrt{\sum n_z + u_{o,rel}^2 (\sum n_z)^2}$$

که در آن، $\sum n_z$ مجموع شمارش کلنی‌ها است.

اگر قرار است نمونه جهت تولید سوسپانسیون نهایی رقیق شود، نتیجه آن در فاکتور رقت، F ضرب می‌شود.

اگر عدم قطعیت عملیاتی صفر باشد، توزیع به‌صورت مدل پواسون درمی‌آید. درنتیجه حدود اطمینان را می‌توان با استفاده از فرمول‌های سنتی مطابق فرمول (ژ- ۹) محاسبه کرد :

$$T_0 = n_z - 2\sqrt{n_z} \qquad (ژ-۹)$$

$$T_1 = n_z + 2\sqrt{n_z}$$

که n_z، تعداد کلنی‌های مشهود در آزمونه سوسپانسیون نهایی است.

با داشتن مقدار عدم قطعیت عملیاتی کم‌تر از حدود ۰٫۱ (۰٫۰۴ برحسب لگاریتم)، توزیع پواسون به‌احتمال زیاد مدل مناسبی است، اگرچه در شمارش‌های کم‌تر از چهار، حد منفی پایین‌تر آن منفی می‌شود. عدم قطعیت عملیاتی در نمونه آب به ندرت بزرگ‌تر از ۰/۱ است و انتظار می‌رود که تحت هر شرایطی بیش‌تر از ۰٫۲۵ نباشد. برای آزمون آب، حدود متقارن در مقیاس بازه‌ای تقریب خوبی به نظر می‌رسد (مثال بند ژ-۴).

ژ-۳-۴ تقریب توسط حدود نسبی :

زمانی‌که عدم قطعیت عملیاتی بیش‌تر از ۰٫۲۵ باشد و به‌ویژه در شمارش کلنی‌های زیاد، تخمین‌های بازه‌ای نسبی می‌تواند مناسب باشد (مثال بند ژ-۴).

برای بیان عدم قطعیت مرکب در مقیاس لگاریتم طبیعی یا نسبی (بند ژ۲-۳)، حدود اطمینان با استفاده ازفرمول (ژ-۱۰) و فرمول (ژ-۱۱) تعیین می‌شوند :

الف- تخمین تقریب بالاتر بازه (٪۹۵) :

$$T_1 = n_z \exp(2u_{c,rel}) \qquad (ژ-۱۰)$$

که در آن، n_z شمارش نهایی کلنی‌ها است.

ب- تخمین تقریب پایین‌تر بازه (٪۹۵) :

$$T_0 = \frac{n_z}{\exp(2uc,rel)} \qquad (ژ-۱۱)$$

زمانی که عدم قطعیت برحسب لگاریتم اعشاری بیان می‌شود، حدود اطمینان با استفاده ازفرمول (ژ-۱۲) و فرمول (ژ-۱۳) تعیین می‌شوند :

الف- تخمین تقریب بالاتر بازه (٪۹۵) :

$$T_1 = n_z 10^{2uc(\lg)} \qquad (ژ-۱۲)$$

ب- تخمین تقریب پایین‌تر بازه (٪۹۵) :

$$T_0 = \frac{n_z}{10^{2uc(\lg)}} \qquad (ژ-۱۳)$$

ژ-۳-۵ محاسبه احتمال بایز

حدود اطمینان برحسب نظریه بایز با محاسبات احتمال آینده‌نگر[1] که نوعی مدل توزیع احتمال است، تخمین‌زده‌می‌شود. این شیوه در مدارک دردست تهیه توسط استاندارد فرانسه (کتاب‌نامه شماره ۹) به‌کارگرفته شده است. جدول‌هایی تهیه شده است که از روی آن‌ها می‌توان حدود اطمینان‌های ٪۹۵ و ٪۹۹ برای توزیع دوجمله‌ای منفی با مقادیر میانگین و عدم قطعیت عملیاتی را به صورت مستقیم یا به وسیله نمودارهای خطی به دست آورد.

ژ-۴ مقایسه چهار رویکرد بازه‌ای

تقریب بازه‌های ٪۹۵ (فاکتور پوشش k = ۲) توسط چهار روش ارزیابی‌شده و مورد مقایسه قرارگرفته‌اند. دو روش بر اساس مدل توزیع احتمال "دقیق" و "بایز" مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت و در هر مدل میانگین

1 Posteriori

و عدم قطعیت عملیاتی به‌کارگرفته شدند. نتایج حاصل با "بازه‌های نسبی" و "تقریب متقارن" براساس عدم‌قطعیت مرکب اندازه‌گیری مرکب مقایسه‌شدند. نتایج مقایسه در جدول‌های (ژ-۱) و (ژ-۲) قابل مشاهده است .

جدول س-۱ تخمین بازه‌ای محاسبه شده با چهار روش متفاوت برای شمارش‌های ۴ ، ۱۰ ، ۳۰ و ۱۰۰ کلنی

شمارش nz	$u_c = \sqrt{n_z + u_{o(rel)}^2 n_z^2}$	$u_{c,rel} = \frac{nz}{uc}$	دقیق [۱]	متقارن [۲]	نسبی [۳]	بایز
۴	۲٫۰۴۰	۰٫۵۰۹۹	۰ - ۸	۰ - ۸	۱ -۱۱	۱ - ۹
۱۰	۳٫۳۱۷	۰٫۳۳۱۷	۳ - ۱۷	۳ - ۱۷	۵ -۱۹	۵ - ۱۸
۳۰	۶٫۲۴۵	۰٫۲۰۸۲	۱۸ - ۴۲	۱۸ - ۴۲	۲۰ - ۴۵	۲۰ - ۴۵
۱۰۰	۱۴٫۱۴۲	۰٫۱۴۱۴	۷۳ - ۱۲۹	۷۳ - ۱۲۸	۷۵ - ۱۳۳	۷۸ - ۱۳۱

یادآوری- عدم قطعیت عملیاتی نسبی $u_{o,rel}$ = ۰/۱(۱۰٪) گردکردن تخمینی به نزدیک‌ترین عدد کامل

۱ حاصل از تابع چگالی از توزیع دوجمله‌ای منفی

۲ حاصل از $n_z \pm 2\, u_c$

۳ حاصل از $n_z / \exp[2u_{c(rel)}]$ و $n_z \exp[2u_{c(rel)}]$

جدول س-۲ تخمین بازه‌ای محاسبه‌شده با چهار روش متفاوت برای شمارش‌های ۴ ، ۱۰ ، ۳۰ و ۱۰۰ کلنی

شمارش	u_c	$u_{c,rel}$	دقیق	متقارن	نسبی	بایز
۴	۲٫۲۳۶	۰٫۵۵۹۰	۰ - ۹	۰ - ۸	۱ -۱۲	۱ -۱۱
۱۰	۴٫۰۳۱	۰٫۴۰۳۱	۲ - ۱۹	۲ - ۱۷	۴ -۲۲	۴ -۲۳
۳۰	۹٫۲۸۷	۰٫۳۰۹۶	۱۳ - ۵۰	۱۱ - ۴۹	۱۶ - ۵۶	۱۶ - ۵۹
۱۰۰	۲۶٫۹۲۶	۰٫۲۶۹۳	۵۳ - ۱۵۹	۴۶ - ۱۵۴	۵۸ - ۱۷۱	۵۹ - ۱۸۴

یادآوری- عدم قطعیت فرایندی نسبی $u_{o,rel}$ = ۰/۲۵(٪ ۲۵) گردکردن تخمینی به نزدیکترین عدد کامل

جدول س-۳ اثرات عدم قطعیت عملیاتی نسبی بر بازه‌های تخمینی با چهار روش

$u_{o,rel}$	u_c	$u_{c,rel}$	دقیق	متقارن	نسبی	بایز
۰٫۰۰	۵٫۴۷۷۲	۰٫۱۸۲۶	۱۹ - ۴۱	۱۹ - ۴۱	۲۱ - ۴۳	۲۰ -۴۲
۰٫۰۵	۵٫۶۷۸۹	۰٫۱۸۹۳	۱۸ - ۴۲	۱۹ - ۴۱	۲۱ - ۴۴	۲۰ -۴۳
۰٫۱۰	۶٫۲۴۵۰	۰٫۲۰۸۲	۱۸ - ۴۳	۱۸ - ۴۲	۲۰ - ۴۵	۲۰ - ۴۵
۰٫۲۰	۸٫۱۲۴۰	۰٫۲۷۰۸	۱۵ - ۴۷	۱۴ - ۴۶	۱۷ - ۵۲	۱۷ - ۵۳
۰٫۳۰	۱۰٫۵۳۵۷	۰٫۳۵۲۱	۱۲ - ۵۳	۹ - ۵۱	۱۵ - ۶۱	۱۵ - ۶۸
۰٫۴۰	۱۳٫۱۹۰۹	۰٫۴۳۹۷	۸ - ۶۰	۴ - ۵۶	۱۲ -۷۲	۱۲ - ۹۶
۰٫۵۰	۱۵٫۹۶۸۷	۰٫۵۳۲۳	۶ - ۶۸	۰[۱] - ۶۲	۱۰ - ۸۷	۹ - ۱۵۵
۰٫۶۰	۱۸٫۸۱۵	۰٫۶۲۷۲	۴ - ۷۶	۰[۱] - ۶۸	۹ - ۱۰۵	۷ - ۳۳۷

یادآوری- عدم قطعیت فرایندی نسبی ($\mathbf{u_{o,rel}}$) از صفر تا ۰/۶۰ (٪۶۰) به‌دست می‌آید. گردکردن نتایج درنزدیک‌ترین تعداد کامل، با فرض تعداد کلنی‌ها n_z=۳۰ در همه موارد

۱ - حد منفی پایین‌تر

با توجه به جداول (ژ-۱) تا (ژ-۳) به نظر می‌رسد که امکان این نتیجه‌گیری وجود دارد که برای کل دامنه شمارش‌ها و مقادیر عدم قطعیت عملیاتی در آزمون آب، تخمین‌های بازه‌ای متقارن، تقریب مناسبی است.
تخمین‌های بازه‌ای نسبی معمولاً در نمونه‌هایی ارجحیت دارند که در معرض تغییر نمونه‌برداری فرعی یا دیگر علت‌های عملیاتی قرار دارند.

ژ-۵ کاربردهای عدم قطعیت اندازه‌گیری

ژ-۵-۱ گزارش عدم قطعیت

گزارش تخمین عدم قطعیت بستگی به نحوه استفاده مورد نظر از نتیجه آزمون دارد. در صورت نیاز مشتریان، باید مشخص باشد که چگونه تخمین عدم قطعیت محاسبه شده است و به چه صورتی ارائه می‌شود (عدم قطعیت مرکب، عدم قطعیت گسترده و یا تخمین بازه‌ای). مقیاس اندازه‌گیری آن، بازه نسبی، لگاریتم اعشاری، لگاریتم طبیعی و یا درصد، همیشه باید معلوم و مشخص باشد.

س-۵-۲ مقایسه با استفاده از عدم قطعیت

مقایسه دو نتیجه آزمون x_1 و x_2 ، دارای تخمین‌های عدم قطعیت گسترده U_1 و U_2 غالباً به صورت گرافیکی انجام می‌شود. نتایج با عدم قطعیت گسترده که با خطوط منقطع و به صورت عمودی پایین و بالای مقدار امتداد یافته‌اند، کنار همدیگر رسم می‌شوند. اگر خطوط منقطع روی همدیگر قرار بگیرند، نتایج به صورت معنی‌داری متفاوت به‌نظر نمی‌رسند. این امر از نظر محاسباتی تطابق دارد با مقایسه این موضوع که تفاوت مطلق x_1 و x_2 بزرگ‌تر و یا کوچک‌تر از مجموع $U_2 + U_1$ باشد، روشی که کاملاً قابل مقایسه با آزمون‌های آماری نیست.
مقایسه نتایج x در مقابل مقادیر مجاز می‌تواند به همین نحو انجام شود. اگر مقدار مجاز در محدوده $x \pm U$ باشد، تفاوت معنی‌دار نیست.
روش علمی‌تر مقایسه x با a با محاسبه امتیاز z مطابق فرمول (ژ-۱۴) است.

$$z = \frac{|x-a|}{u_c(x)} \qquad (ژ-۱۴)$$

که در آن :

a مقدار مجاز؛

$u_c(x)$ عدم قطعیت مرکب نتیجه x است.

اگر امتیاز z بیش از ۲ باشد، x به صورت معنی‌داری مغایر با a محسوب می‌شود.

پیوست س

(اطلاعاتی)

کتاب‌نامه

[۱] استاندارد ملی ایران شماره ۹۶۰۶، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - تخمین عدم قطعیت اندازه‌گیری در آزمون‌های کمی - راهنما

[۲] استاندارد ملی ایران ایزو-آی‌ای‌سی شماره ۱۷۰۲۵، الزامات عمومی برای احراز صلاحیت آزمایشگاه‌های آزمون و کالیبراسیون

[3] ISO 3534-1:2006, Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: General statistical terms and terms used in probability

[4] ISO 5725-3, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method

[5] ISO 8199, Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

[6] ISO/TR 13843, Water quality — Guidance on validation of microbiological methods

[7] ISO/IEC Guide 98-3:2008, Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM_1995)

[8] BS 8496, Water quality — Enumeration of micro-organisms in water samples — Guidance on the estimation of variation of results with particular reference to the contribution of uncertainty of measurement

[9] XP-T 90-465-2, Qualité de l'eau — Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes de dénombrement microbiologiques — Partie 2 : Les techniques de dénombrement [Water quality — Protocol to estimate the uncertainty of measurement associated with an analysis result for microbiological enumeration methods — Part 2: Enumeration techniques]1)

[10] EURACHEM/CITAC CG 4, Quantifying uncertainty in analytical measurement, Ellison, S. L. R.Rosslein, M., Williams, A., editors. 2nd edition, 2000. Available (viewed 2012-01-13) at: *http://www.eurachem.org/guides/pdf/QUAM2000-1.pdf*

[11] NMKL Procedure No. 8, Measurement of uncertainty in quantitative microbiological examination of foods

[12] Nordtest Report TR 537, Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories, Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H., Krysell, M., editors, 2nd Edition. Espoo: Nordtest, 2004. 41 p. Available (viewed 2012-01-13) at: *http://www.nordicinnovation.net/nordtestfiler/tec537.pdf*

[13] Brown, L.D., Cai, T.T., Dasgupta, A. Interval estimation for a binomial proportion. Statist. Sci. 2001, 16, pp. 101-133

[14] Cochr an, W.G. Sampling techniques, 3rd edition. New York, NY: Wiley, 1977. 428 p. ISBN 0-471-02939-4

[15] Evans, M., Hastings, N., Peacock, B. Statistical distributions, 3rd edition. New York, NY: Wiley, 2000.221 p.

[16] Forster , L.I. Conclusions on measurement uncertainty in microbiology. J. AOAC Int. 2009, 92, pp. 312-319

[17] Haldane, J.B.S. Sampling errors in the determination of bacterial or virus density by the dilution method.J. Hyg. (Lond.) 1939, 39, pp. 289-293

[18] Hurley, M.A., Roscoe, M.E. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series.J. Appl. Bacteriol. 1983, 55, pp. 159-164

[19] Nieme lä, S.I. Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Helsinki: MIKES, 2003, 82 p. (Publication J4/2003.) ISBN 952-5209-76-8, ISSN 1235-5704. Available (viewed 2012-01-13) at: *http://www.mikes.fi/documents/upload/J4_2003.pdf*