



STIMA DELL'INCERTEZZA IN MICROBIOLOGIA



CALCOLO DELL'INCERTEZZA PER METODI MICROBIOLOGICI CHE PREVEDONO UN CONTEGGIO IN PIASTRA APPLICATI ALLA MATRICE ACQUA

- ✘ **Le prove microbiologiche generalmente rientrano nella categoria di quelle che precludono il calcolo rigoroso, metrologicamente e statisticamente corretto dell'incertezza di misura (rif. EA 04-10)**

Le componenti individuali dell'incertezza devono comunque essere identificate e si deve dimostrare che siano sotto controllo

La stima dell'incertezza in microbiologia può essere fatta :

A - con approccio statistico

B - con approccio metrologico

C - con approccio top-down o olistico





METODO STATISTICO ISO 8199: 2005

Il modello statistico in grado di descrivere i dati ottenuti dalle conte su piastra è la distribuzione di Poisson. L'elaborazione dei dati viene quindi eseguita utilizzando questo tipo di distribuzione.

- ⦿ **L'incertezza legata ai risultati di tali prove viene calcolata come intervallo di confidenza al 95% di probabilità, dopo aver verificato in fase di qualificazione del metodo ufficiale o normalizzato o in fase di validazione del metodo, che il laboratorio produce dati in accordo con il modello teorico.**

Sulla base del risultato del conteggio delle UFC/piastra, si possono individuare due situazioni:





- ✦ Quando $Z \geq 20$, il risultato finale con intervallo di confidenza (CI) al 95% è dato dall'equazione:

$$C_s \pm 95\% \text{ CI} = \left(\frac{Z \pm 2\sqrt{Z}}{V_{\text{tot}}} \right) \times V_s = \left(\frac{Z}{V_{\text{tot}}} \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{\text{tot}}} \right) \times V_s = \frac{Z}{V_{\text{tot}}} \times V_s \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

- ⊙ Quindi il risultato finale **C** con l'intervallo di confidenza sarà :

$$C = C_s \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{\text{tot}}} \times V_s$$

Dove

C_s è la stima del numero di ufc in un volume di riferimento del campione V_s ;

Z è la somma delle colonie contate sulle piastre o sulle membrane derivate dalle diluizioni d_1, d_2, \dots, d_i , o derivate da volumi separati della porzione testata (campione o diluizione);

V_S è il volume di riferimento scelto per esprimere la concentrazione dei microrganismi nel campione;

V_{tot} è il volume totale del campione originale calcolato su tutte le piastre conteggiate.

V_{tot} è la somma dei volumi separati delle porzioni di test (campione o diluizione) o calcolato tramite l'equazione : $V_{\text{tot}} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i)$

dove

n_1, n_2, \dots, n_i è il numero delle piastre contate per le diluizioni d_1, d_2, \dots, d_i ;

V_1, V_2, \dots, V_i è il volume testato per le diluizioni d_1, d_2, \dots, d_i ;

d_1, d_2, \dots, d_i è la diluizione usata per i volumi analizzati V_1, V_2, \dots, V_i ($d=1$ per il campione non diluito, $d=0,1$ per una diluizione di dieci volte, ecc...).





- ✘ Quando $Z < 20$, l'effetto della obliquità (asimmetria) della distribuzione di Poisson sui limiti di confidenza viene approssimativamente calcolato apportando delle piccole correzioni incluse nell'Equazione seguente:

$$\text{Limite superiore ed inferiore 95\% CI} = \left(\frac{Z + 2 \pm 2 \sqrt{Z + 1}}{V_{\text{tot}}} \right) \times V_s$$

Dove:

Z è la somma delle colonie contate sulle piastre o sulle membrane derivate dalle diluizioni d_1, d_2, \dots, d_i , o derivate da volumi separati della porzione testata (campione o diluizione);

V_s è il volume di riferimento scelto per esprimere la concentrazione dei microrganismi nel campione;

V_{tot} è il volume totale del campione originale calcolato su tutte le piastre conteggiate.

V_{tot} è la somma dei volumi separati delle porzioni di test (campione o diluizione) o calcolato tramite l'equazione : $V_{\text{tot}} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i)$

dove:

n_1, n_2, \dots, n_i

è il numero delle piastre contate per le diluizioni d_1, d_2, \dots, d_i ;

V_1, V_2, \dots, V_i

è il volume testato per le diluizioni d_1, d_2, \dots, d_i ;

d_1, d_2, \dots, d_i

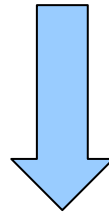
è la diluizione usata per i volumi analizzati V_1, V_2, \dots, V_i ($d=1$ per il campione non diluito, $d=0,1$ per una diluizione di dieci volte, ecc...).

I risultati vengono riportati, arrotondati all'intero e, in accordo con il risultato, con un'approssimazione di due cifre significative





L'approccio statistico stima il valore dei limiti fiduciali **in funzione delle colonie rilevate**, non rileva la dispersione (sovradisersione) dovuta ad errori casuali commessi nel processo analitico.



**PRESUPPONE CHE GLI ERRORI CASUALI ABBIANO
INFLUENZA TRASCURABILE**





CALCOLO DELL'INCERTEZZA PER METODI MICROBIOLOGICI CHE PREVEDONO UN CONTEGGIO IN PIASTRA APPLICATI ALLA MATRICE ALIMENTI

◎ **APPROCCIO TOP - DOWN o OLISTICO**

BASA LA STIMA DELL'INCERTEZZA DI MISURA SU DATI DI RIPETIBILITÀ E RIPRODUCIBILITÀ

ISO/TS 19036:2006

- ◎ **Campo di Applicazione**
 - **Prodotti destinati al consumo umano ed animale**
 - **Campioni ambientali (aree di produzione e manipolazione alimenti)**
- ◎ **NON APPLICABILE**
 - **Prove in MPN**
 - **Prove quantitative con bassa concentrazione di m.o. (UFC<10) rif alla ISO 7218 1996 (in fase di elaborazione Amd a ISO 19036)**
 - **Prove QUALITATIVE (programmata l'elaborazione di un nuovo documento)**





U- UGUALE PER TUTTI ?

- ✘ **E' caratteristica di un laboratorio**
- ✘ **E' correlata ad un dato ottenuto in specifiche condizioni (operatori, apparecchiature, reagenti...)**
- ✘ **Non è caratteristica di un metodo analitico di per sé, indipendentemente dal laboratorio che la calcola (legame metodo-laboratorio)**



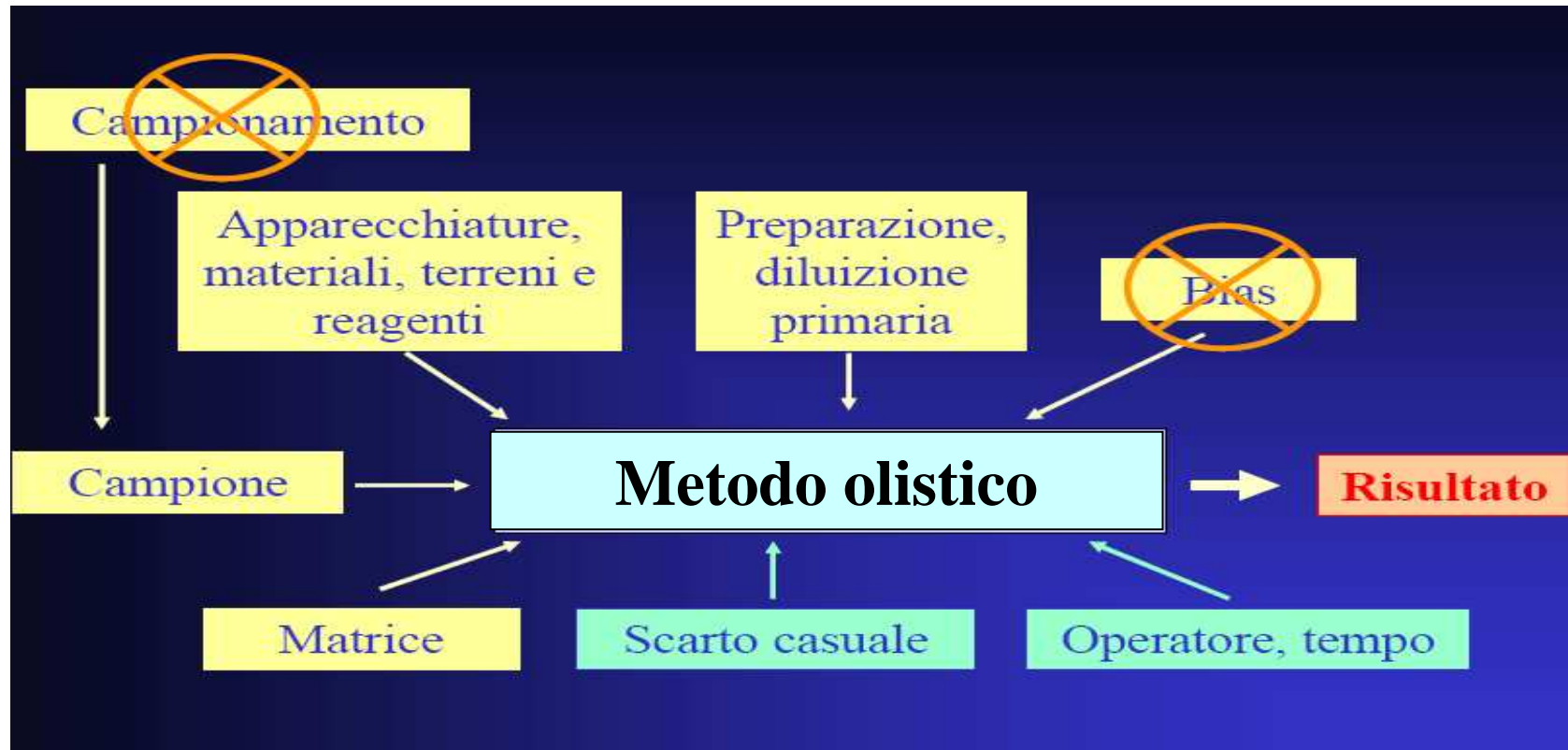


SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITÀ (s_R)

(in ordine di preferenza)

- × s_R di riproducibilita' intralaboratorio
- × s_R da studio interlaboratorio
- × s_R da proficiency test





- Il campionamento introduce una parte significativa dell'errore totale ma non fa parte dell'incertezza collegata alla misura
- Il bias non è preso in considerazione data l'empirica natura delle numerazioni microbiche.





La stima dell'incertezza di misura è calcolata come incertezza estesa mediante lo Scarto tipo di Riproducibilità della prova, derivante da prove ripetute sullo stesso campione da due o più operatori dello stesso laboratorio.

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (\log a_i - \log b_i)^2}{2n}}$$

a_i e b_i sono il primo ed il secondo risultato della prova sullo stesso campione
 $(\log a_i - \log b_i)$ = differenza tra i 2 risultati, espressi in logaritmo decimale
 n = numero di prove eseguite in doppio (≥ 10)
 $i = 1, 2, 3, \dots, n$





Lo Scarto tipo di Riproducibilità viene calcolato per ciascun metodo e per gruppi omogenei di matrici (1° gruppo: liquidi e polveri; 2° gruppo solidi ben miscelati).

Il protocollo sperimentale applicato nel nostro laboratorio di prova viene effettuato su 10 campioni dello stesso gruppo in giorni differenti da due diversi operatori.

Il calcolo dello scarto tipo di dati trasformati in logaritmo, stabilizza le variazioni di riproducibilità sopra i livelli di contaminazione. Non è quindi necessario stimare lo scarto tipo di riproducibilità per ogni livello di contaminazione. Tuttavia, dove è possibile, i campioni e/o le diluizioni devono essere scelte in modo da coprire il range di concentrazione delle prove routinarie.





Dovrebbero essere usati per quanto possibile campioni naturalmente contaminati perché permettono una più realistica stima dell'incertezza di misura.

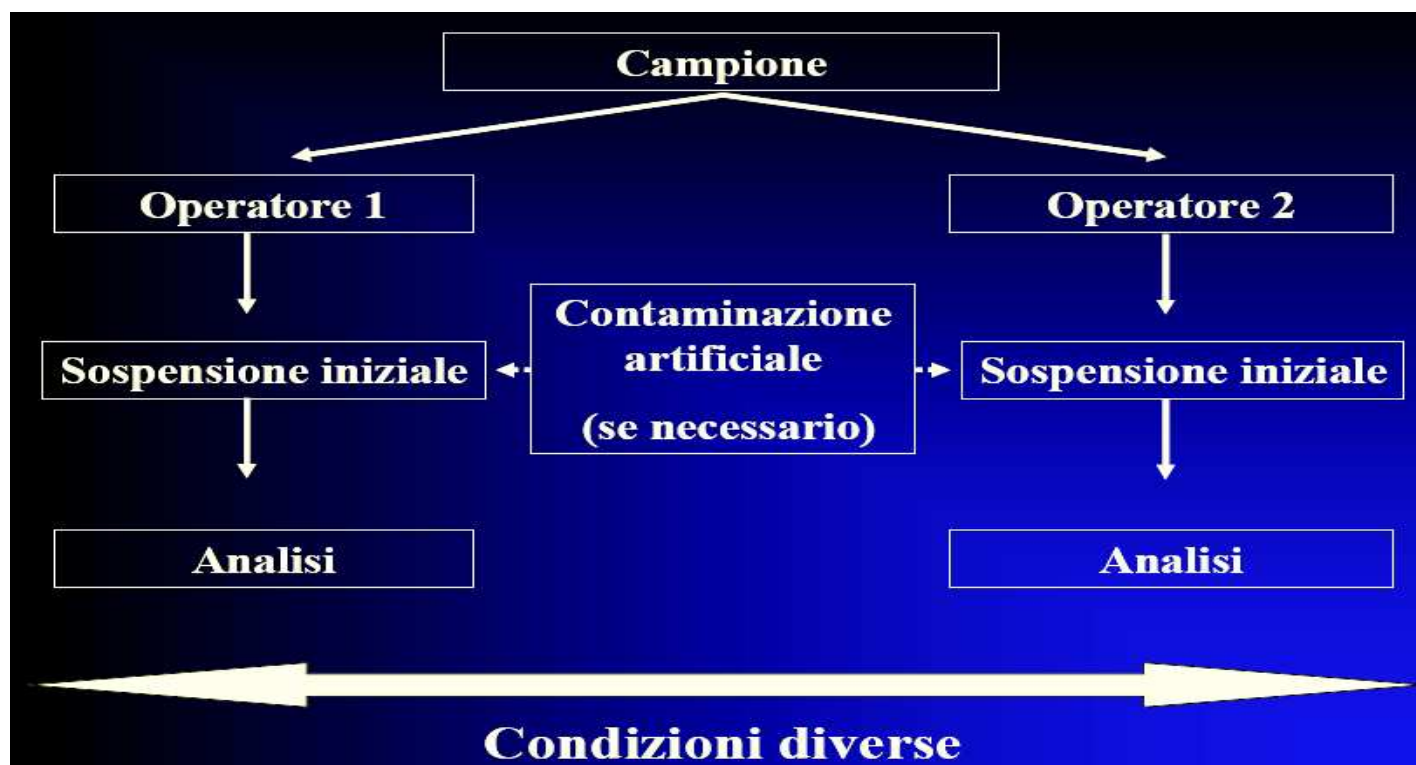
La condizione fisiologica del microrganismo (per es. lo stress) può anche influenzare la variabilità dei risultati, quindi dovrebbero essere ricreate le condizioni che si hanno nei campioni routinari.





Di seguito viene riportata la modalità di trattamento del campione contaminato naturalmente o del campione contaminato artificialmente (se necessario).

Le due sospensioni iniziali devono essere contaminate separatamente dopo essere state preparate





Le varie fonti di incertezza, come il sub-campionamento, la natura della matrice, gli errori accidentali residui, l'operatore, le attrezzature, i terreni di coltura e reagenti sono considerati simultaneamente ma non sono valutati separatamente. L'incertezza definita secondo la ISO/TS 19036: 2006 va applicata nel range che va da 10-300 ufc o da 10-150 ufc.

L'espressione per il calcolo è la seguente:

$$U = 2u_c(y) = 2Sr$$

U = Incertezza estesa (Quantità che definisce un intervallo circa il risultato di una misura che può essere prevista per comprendere una grande frazione di distribuzione dei valori che potrebbero essere ragionevolmente attribuiti al misurando)

2 = fattore di copertura K; con probabilità al 95% (tale fattore è il ~~fattore numerico usato come moltiplicatore dell'incertezza composta per ottenere l'incertezza estesa u~~)

$u_c(y)$ = Scarto tipo di riproducibilità





Espressione dell' Incertezza di misura:

$$y \pm 2 Sr (\log)$$

$$y \log [y - 2 Sr ; y + 2 Sr]$$

$$x \text{ ufc/g } [10^{y - 2 Sr} ; 10^{y + 2 Sr}]$$

$$x \text{ ufc/g } [10^y - (10^{y - 2 Sr} / 10^y) \% ; 10^y + (10^{y + 2 Sr} / 10^y) \%]$$

Risultato ed intervallo in \log_{10}

$$5,0 \log \pm 0,3 \log$$

$$5,0 \log [4,7 ; 5,3]$$

Risultato ed intervallo in valore naturale

$$10^5 \text{ ufc/g } [5 \times 10^4 ; 2 \times 10^5]$$

Intervallo in percentuale

$$10^5 \text{ ufc/g } [10^5 - 50\% ; 10^5 + 100\%]$$





ESEMPIO

Risultato=100 ufc/g $S_R = 0,5$ $U = 1$ (log)

2 ± 1 (log)

$2 \log (1 ; 3)$

100 ufc/g (10 ; 1000)

100 ufc/g (100 – 10%) ; 100 + 1000%)



100 ufc/g (90 ; 1100)



Gaia Piccini

**STIMA DELL'INCERTEZZA NEI METODI DI PROVA QUANTITATIVI CHE
UTILIZZANO LA TECNICA DEL MOST PROBABLE NUMBER (MPN)**

INCERTEZZA METODI MPN

In letteratura è indicato che i risultati di prova microbiologici che portano al valore numerico più probabile MPN seguono la distribuzione binomiale.

L'incertezza di misura è espressa per i singoli valori di MPN dai limiti fiduciali riportati nelle tabelle dei valori MPN fornite dai metodi stessi come ad es. nel caso del metodo enzimatico sulle acque per la ricerca di E.coli (Colilert Quanti Tray) è possibile, in base al numero di pozzetti positivi, riferirsi alla Tab.1 dei Rapporti ISTISAN 2007/5 (pag 24-25) sia per il risultato che per l'intervallo di confidenza al 95% associato.





STIMA DELL'INCERTEZZA NEI METODI DI PROVA QUALITATIVI

INCERTEZZA METODI QUALITATIVI

La stima dell'incertezza di misura non può essere applicata ai metodi di prova qualitativi; per questi è utile verificare in fase di validazione/qualificazione del metodo:

- ◉ **la sensibilità** (probabilità che un campione vero positivo risulti effettivamente tale utilizzando il metodo)
- ◉ **la specificità** (probabilità che un campione vero negativo risulti effettivamente tale utilizzando il metodo).





ALCUNI DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- ✘ UNICHIM manuale n. 179/0 Ed.1999 “Linee guida per la validazione di metodi analitici nei laboratori chimici.” Criteri generali.
- ✘ UNICHIM manuale n. 179/1 Ed. 2001“Valutazione della precisione (ripetibilità stretta) di un metodo analitico eseguito in un unico laboratorio da un solo operatore su di un unico strumento in un breve intervallo di tempo.”
- ✘ UNICHIM manuale n. 179/2 Ed. 1995“Valutazione della precisione (ripetibilità) di un metodo analitico eseguito in un unico laboratorio con più operatori/strumenti.
- ✘ Guida EURACHEM The Fitness for Purpose of Analytical Methods / A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics;
- ✘ UNI-ISO 3534-1 febbraio 2000 – Statistica – Vocabolario e simboli – Probabilità e termini statistici generali
- ✘ UNI-ISO 3534-2 febbraio 2000 – Statistica – Vocabolario e simboli – Controllo statistico della qualità.
- ✘ ISO 3534-3:1993, Statistics – Vocabulary and symbols – Part 3: Design of experiments
- ✘ Manuale ARPA. Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell’incertezza di misura. *Accreditamento e certificazione*-Settembre 2003



ALCUNI DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- ✘ UNI ISO 5725-1:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 1: Principi generali e definizioni.
- ✘ UNI ISO 5725-2:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 2: Metodo base per determinare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato
- ✘ UNI ISO 5725-3:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 3. Misure intermedie di precisione in un metodo di misurazione normalizzato
- ✘ UNI ISO 5725-4:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 4. Metodi di base per determinare l'esattezza di un metodo di misurazione normalizzato
- ✘ UNI ISO 5725-5:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 5 . Metodi alternativi per la determinazione di un metodo di misurazione normalizzato
- ✘ UNI ISO 5725-6:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 6. Uso nella pratica dei valori di accuratezza



ALCUNI DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- ✘ UNI CEI ENV 13005 - Guida all'espressione dell'incertezza di misura.
- ✘ Seconda edizione (2000) della Guida EURACHEM / CITAC CG 4 - Rapporti ISTISAN 03/30 - Quantificazione dell'incertezza nelle misure analitiche
- ✘ DT-0002 SINAL- Guida per la valutazione ed espressione della incertezza nelle misurazioni
- ✘ DT-0002/3 - Avvertenze per la valutazione dell'incertezza nel campo dell'analisi chimica
- ✘ DT-0002/4, Esempi applicativi di valutazione dell'incertezza nelle misurazioni chimiche
- ✘ M.Thompson, "Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing" Analyst, 2000, 125, 385 – 386
- ✘ EA-4/16, Guidelines of expression of uncertainty in quantitative testing
- ✘ ISO/TR 13843- 2000: Water quality – Guidance on validation of microbiological methods
- ✘ ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
- ✘ ISO 8199:2005 "Water quality-General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture"
- ✘ ISO/TS 19036:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations