

# GUIDA PER L'ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA DI MISURA NELLE PROVE MICROBIOLOGICHE

Angela Maiello, Dino Spolaor



**Angela Maiello    Dino Spolaor**

# **GUIDA PER L'ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA DI MISURA NELLE PROVE MICROBIOLOGICHE**

Angela Maiello:  
Maiello & Maiello sas - Torino

Dino Spolaor:  
Veneto Agricoltura - Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari - Thiene (VI)

## **RINGRAZIAMENTI**

*Si ringrazia Seppo I. Niemelä dell'Istituto di Metrologia e Accreditamento finlandese (MIKES) autore della pubblicazione "Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms", utilizzata dagli Autori della presente Guida, come principale riferimento di studio. Un grazie particolare per aver contribuito a fugare i dubbi che si sono presentati nel corso della stesura del documento fornendo, in prima persona, chiarimenti e spunti di riflessione, con grande sollecitudine e disponibilità.*

*Si ringrazia inoltre Sergio Sartori (direttore responsabile alla rivista "Tutto\_Misure"), per i preziosi commenti accolti dagli Autori come spunti di miglioramento della Guida.*

# INDICE

|  | Pagina |
|--|--------|
| <b>PREFAZIONE</b>  | 3      |
| <b>NOTA INTRODUTTIVA</b>   | 5      |
| <b>PREMESSA</b>  | 6      |
| <b>1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b>   | 6      |
| <b>2 DEFINIZIONI</b>   | 7      |
| <b>3 SIMBOLI ED ACRONIMI</b>   | 10     |
| <b>4 CALCOLO DEL CONTEGGIO</b>   | 11     |
| 4.1 METODO CULTURALE IN PIASTRE PETRI  | 11     |
| 4.2 METODO CULTURALE IN PROVETTE   | 12     |
| <b>5 VALUTAZIONE DEI CONTRIBUTI DELL'INCERTEZZA</b>                                    | 13     |
| 5.1 VALUTAZIONE DI CATEGORIA A   | 13     |
| 5.2 VALUTAZIONE DI CATEGORIA B   | 13     |
| 5.2.1 Calcolo dell'intervallo di fiducia secondo ISO 7218                              | 14     |
| 5.2.1.1 Conta di piccoli numeri di microrganismi                                       | 14     |
| 5.2.1.2 Conta di microrganismi superiore a 15  | 14     |
| 5.2.2 Calcolo dell'intervallo di fiducia secondo UNI ENV ISO 13843 e UNI 10674         | 15     |
| 5.2.3 Calcolo dell'intervallo di fiducia in un sistema MPN con diluizioni multiple     | 16     |
| <b>6 STIMA DELLE COMPONENTI DI INCERTEZZA NEI METODI DI CONTEGGIO IN PIASTRE PETRI</b> | 17     |
| 6.1 INCERTEZZA DATA DALLA DISTRIBUZIONE DI POISSON                                     | 17     |
| 6.1.1 Incertezza di una singola conta  | 17     |
| 6.1.2 Incertezza di una somma di conte   | 18     |
| 6.2 INCERTEZZA DEL FATTORE DI DILUIZIONE   | 18     |
| 6.3 INCERTEZZA DEL VOLUME TOTALE INOCULATO   | 21     |
| 6.4 INCERTEZZA DI CONFERMA DELLE COLONIE   | 23     |
| 6.4.1 Conferma generale in un sistema rivelatore multiplo                              | 24     |
| 6.4.2 Conferma specifica di ciascuna diluizione in un sistema rivelatore multiplo      | 25     |
| 6.4.3 Conferma specifica di ciascuna piastra Petri in un sistema rivelatore multiplo   | 27     |
| 6.5 INCERTEZZA DI LETTURA DELLE PIASTRE PETRI  | 28     |
| 6.5.1 Incertezza di lettura di un singolo operatore                                    | 28     |
| 6.5.2 Incertezza di lettura di conte multiple  | 31     |
| 6.5.3 Incertezza di lettura specifica del laboratorio                                  | 31     |
| <b>7 CALCOLO DELL'INCERTEZZA TIPO COMPOSTA</b>   | 33     |
| <b>8 CALCOLO SEMPLIFICATO DELL'INCERTEZZA DI MISURA</b>                                | 35     |
| <b>9 REGOLE PER L'ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA DI MISURA</b>                            | 38     |
| 9.1 NUMERI SIGNIFICATIVI E ARROTONDAMENTO  | 38     |
| 9.2 ELEVATE CONCENTRAZIONI E VALORE DI INCERTEZZA                                      | 38     |
| 9.3 INCERTEZZA DI MISURA ASIMMETRICA   | 39     |
| <b>10 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE</b>  | 40     |
| <b>11 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b>  | 40     |

# PREFAZIONE

L'analisi microbiologica è stata da sempre percepita come un'attività fortemente condizionata dall'appartenenza dell'oggetto di ricerca al "mondo biologico", essendo gli specifici misurandi delle entità viventi; per tale motivo, si è sempre ritenuto che il risultato delle prove microbiologiche fosse soggetto a variazioni, la cui dimensione non potesse rientrare nei limiti ricavati da un algoritmo matematico.

A differenza di quanto accade nell'analisi chimica, in cui l'analista ha coscienza, seppure in alcuni casi con ampia sottovalutazione, del grado di "incertezza" del proprio operato, in ambito microbiologico si è avuto, per molto tempo, uno spirito di rassegnazione verso la prospettiva di quantificazione dell'incertezza dei dati che derivano dalle prove. Ciò non è altro che il risultato della mancanza, nei laboratori di microbiologia, di una sufficiente cultura metrologica e si porta appresso una diffusa avversione verso la valutazione di singole componenti che hanno impatto sulle attività analitiche.

Viene, pertanto, da chiedersi quanta parte abbia, in tale visione del problema, l'assenza, anche a livello di formazione universitaria, di riferimenti a concetti metrologici applicati alle prove analitiche. Il forte scollamento esistente tra mondo universitario e realtà di mercato si rende evidente, soprattutto, quando il cliente del laboratorio biologico, sulla base di esigenze di ordine commerciale, richiede che l'espressione del risultato sia accompagnata dal valore dell'incertezza di misura.

Il laboratorio, a sua volta indotto, per rimanere sul mercato, ad avviare l'*iter* per l'accreditamento delle prove, si trova a dover soddisfare i requisiti della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000 di riferimento, cercando di superare "dignitosamente" lo scoglio rappresentato dalla valutazione dall'incertezza di misura. La soluzione scelta dai laboratori per risolvere in tempi brevi il "problema", spinge spesso in direzioni sbagliate, a volte anche con l'aiuto di professionisti, con il risultato di affrontare tale aspetto applicando metodologie, consolidate e condivise ad esempio in ambito chimico, ma inadatte a soddisfare il requisito se applicate in ambito microbiologico. Tale tendenza, più diffusa di quanto si possa pensare, trova origine nella generale mancanza di quella cultura metrologica, riferita allo specifico ambito, cui si faceva precedentemente cenno.

A questo proposito, è opportuno evidenziare che ciò che limita il facile trasferimento delle metodologie di calcolo da un settore applicativo all'altro, è principalmente la natura delle misure: in chimica, i dati di misura sono rappresentati da variabili casuali continue, che seguono il modello di distribuzione di probabilità normale, mentre in microbiologia si opera con variabili casuali discrete, dati di conteggio, che seguono per lo più il modello di distribuzione di probabilità di Poisson o quello binomiale.

La scelta, tra le più consolidate in chimica, di basare la valutazione dell'incertezza di misura su dati di ripetibilità e riproducibilità del metodo, ancorché sostenuta da autorevoli Organismi di normazione, quale l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC), anche per la microbiologia, viene ritenuta da altre fonti (Centre For Metrology And Accreditation - Mikes) inadatta in quest'ambito, per almeno tre validi motivi

1. instabilità dei campioni biologici, siano essi costituiti da matrici alimentari o ambientali;
2. variabilità esistente tra i sottocampioni, più elevata di quella derivante dall'esecuzione ripetuta della prova;
3. distribuzione dei microrganismi nel campione che, per quanto resa omogenea, viene rappresentata dalla relazione di uguaglianza tra media e varianza.

La carenza di esempi specifici e dedicati all'ambito microbiologico nella norma UNI CEI ENV 13005:2000 - Guida all'espressione dell'incertezza di misura, fa apparire la stessa, ad un primo approccio, di limitato aiuto, a parte le indicazioni terminologiche e di simbologia ad uso metrologico. La norma 13005, comunque, pur non riferendo la distribuzione di probabilità di Poisson, che descrive le

grandezze considerate in ambito microbiologico, presenta i principi applicabili anche a questo campo. Degna di attenzione, è la lettura del paragrafo 6.1.2 della stessa norma, in cui si afferma che “... *in talune applicazioni ...e là dove sono coinvolte la salute e la sicurezza pubblica, è sovente necessario dare una valutazione quantitativa dell’incertezza che definisca un intervallo intorno al risultato della misurazione che si aspetti comprendere una gran parte della distribuzione di valori che possono essere ragionevolmente attribuiti al misurando*”, dando così enfasi all’estensione dei concetti metrologici, qui dibattuti, ad ambiti quali sicurezza alimentare e ambiente.

Analizzando il panorama di documenti attualmente disponibili per affrontare con cognizione di causa la valutazione dell’incertezza di misura, si deve constatare la mancanza di norme o guide tecniche a carattere orizzontale applicabili alla microbiologia.

Alcuni cenni di valutazione si possono trovare nella ISO 7218:1996 e nella UNI ENV ISO 13843:2003, quest’ultima specifica del settore acque. Si tratta, per lo più, di valutazioni di categoria B, come quelle presentate al paragrafo 9.3.6.1 della ISO 7218 e al paragrafo 9.5.3 della UNI ENV ISO 13843. Sono, tuttavia, in quest’ultima presenti anche alcuni approcci di valutazione dell’incertezza legata a singole attività analitiche, quale la componente relativa all’incertezza di lettura. Unico documento che affronta l’argomento, in modo più organico e sistematico, è la pubblicazione realizzata, per opera di Seppo I. Niemelä, dall’Istituto di Metrologia Finlandese (Mikes), che richiede, tuttavia, una buona conoscenza di base dei concetti di metrologia e un attento studio per una corretta e adeguata applicazione nei laboratori di prova microbiologici.

Consci degli oggettivi ostacoli e difficoltà nella comprensione delle diverse metodologie, gli autori del presente lavoro hanno svolto, negli ultimi anni, opera di divulgazione dell’approccio metrologico, applicabile specificatamente nei laboratori che effettuano prove nel settore biologico: allo scopo sono stati attivati corsi di formazione, organizzati dal CSQA Certificazioni Srl, con l’egida del Sistema Nazionale di Accreditamento dei Laboratori (SINAL).

Attualmente, raccogliendo anche gli spunti venuti dall’“applicazione in campo” da parte di quanti hanno partecipato agli interventi formativi, viene presentata una Guida che affronta in modo organico diversi approcci di valutazione ed espressione dell’incertezza di misura in ambito microbiologico, con l’obiettivo di soddisfare un’esigenza che i laboratori percepiscono da tempo e, parallelamente, stimolare gli Enti preposti a fare un passo per la pubblicazione di una Guida ufficiale italiana, in linea con gli indirizzi internazionali.

La Guida proposta presenta una parte introduttiva con la terminologia di base, per una migliore comprensione degli argomenti successivamente trattati, in associazione alla simbologia richiamata nelle formule di calcolo, che si rifà ai criteri di rappresentazione universalmente accettati, riportati nella Guida UNI 13005. In successione, vengono descritti i diversi criteri di valutazione dell’incertezza e proposti gli approcci semplificati indicati dalle norme ISO 7218 e UNI ENV ISO 13843.

Il corpo centrale della trattazione presenta il più complesso approccio di tipo metrologico, che basa la valutazione dell’incertezza di misura sulla stima del contributo delle singole componenti individuabili in una prova analitica microbiologica, secondo i criteri proposti da Niemelä; ove necessario ed esemplificativo, il testo è stato integrato con esempi pratici, che derivano da dati sperimentali scaturiti da prove quotidianamente applicate in un laboratorio competente ed accreditato, individuato dagli Autori.

La Guida accompagna, passo dopo passo, l’utilizzatore lungo una strada che è un’applicazione scrupolosa della metodologia di calcolo dell’incertezza di misura, attraverso la valutazione delle singole componenti, arrivando all’espressione dell’incertezza estesa.

Le fasi principali, riportate nella Guida, sono esemplificate mediante esempi numerici, presi da documenti di riferimento o da casi pratici di laboratorio, per una migliore chiarezza dell’applicazione dei metodi di calcolo descritti.

Vengono offerte, infine, indicazioni relative alle corrette modalità di espressione dell’incertezza di misura associata al risultato analitico, per rispondere in modo idoneo ai requisiti normativi in vigore.

# NOTA INTRODUTTIVA

Gli Autori si sono rivolti a Seppo Niemelä, tra i maggiori esperti a livello internazionale di metrologia applicata all'ambito microbiologico, per chiedere la sua autorevole opinione sulle peculiarità del calcolo dell'incertezza di misura nelle prove microbiologiche rispetto a quello consolidato ed applicato in ambito chimico. Si riporta in questa nota introduttiva alla Guida, un breve estratto della risposta che mette in luce i presupposti che stanno alla base dei due approcci.

*Dear Angela Maiello and Dino Spolaor, Thank you for your letter and greetings. (...) You offered me the opportunity to write something about the idea of evaluating uncertainty in microbiology. I find it difficult to explain the idea of microbiological uncertainty in a short and simple way but I will try.*

*With many chemical methods the uncertainty of measurement is almost completely determined by the analytical procedure. In contrast, the uncertainty of quantitative microbiological test results always consists of at least two independent components: the uncertainty due to the analytical procedure (the method) and the uncertainty of the observed value (number of colonies). The uncertainty of the observed value is due to the random distribution of microbes in the test solution.*

*The analytical procedure usually consists of many operations with their associated uncertainties. In microbiology the uncertainty of the analytical procedure is usually smaller than the random uncertainty of the observed value. Special experiments to determine the general uncertainty (repeatability, reproducibility) of methods do not work properly in microbiology because the unpredictable observed values make the uncertainty of every analytical result unique.*

*A mathematical principle called the law of propagation of uncertainty is an efficient way of determining the combined uncertainty of a test result in microbiology. The value of the uncertainty of the test result is composed of the uncertainty estimates from the separate uncertainties of the operations in the analytical procedure combined with the uncertainty of the observed value. The most important physical and biological factors (dilution, growth, death) exert their influence on the average microbial concentration multiplicatively. It is therefore most convenient to deal with uncertainties in the relative scale.*

*Helsinki, 03.01.2005*

*Seppo Niemelä*

Traduzione a cura degli Autori

In molti metodi chimici l'incertezza di misura è pressoché totalmente determinata dalla procedura analitica. Al contrario, l'incertezza dei risultati delle prove microbiologiche quantitative è sempre costituita da almeno due componenti indipendenti: l'incertezza dovuta alla procedura analitica (metodo) e l'incertezza del valore osservato (numero di colonie). L'incertezza del valore osservato è dovuta alla distribuzione casuale dei microbi nella sospensione sottoposta ad analisi.

La procedura analitica consiste usualmente di molte operazioni, ciascuna con la propria incertezza associata. In microbiologia l'incertezza della procedura analitica è solitamente inferiore a quella dovuta alla distribuzione casuale dei valori osservati. L'esecuzione di prove *ad hoc* per determinare l'incertezza generale dei metodi (ripetibilità, riproducibilità) non funziona in modo appropriato in microbiologia a causa dei valori osservati che non possono essere predetti e che rendono unico il valore di incertezza di ogni singolo risultato analitico.

Un principio matematico chiamato legge di propagazione dell'incertezza è un modo efficiente per determinare l'incertezza composta del risultato di una prova microbiologica. Il valore di incertezza del risultato è composto dalle stime di incertezza, derivate dalle singole incertezze delle operazioni della procedura analitica, combinate con l'incertezza del valore osservato. I fattori fisici e biologici più importanti (diluizione, crescita, morte) esercitano, in modo moltiplicativo, la loro influenza sulla concentrazione microbica media. Per questo motivo risulta più utile trattare le incertezze in scala relativa.

# PREMESSA

I laboratori di prova accreditati, per rispondere ad una prescrizione della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, devono essere in grado di valutare l'incertezza di misura da associare ad un risultato, al fine di permettere il confronto tra dati ottenuti da laboratori diversi e verificare la rispondenza dei risultati a limiti di legge. Considerando che, per raggiungere tale obiettivo, diventa opportuno uniformare la procedura di calcolo dell'incertezza di misura, si vuole dare un contributo in questo senso ai laboratori impegnati in prove microbiologiche, ambito analitico in cui con minor convinzione si sono, finora, applicate le tecniche di valutazione delle componenti dell'incertezza.

Nella presente guida, sono state delineate due metodologie applicabili anche in un laboratorio di *routine*, esemplificando gli approcci che fanno riferimento a quanto espresso nelle norme ISO 7218, UNI ENV ISO 13843 e UNI 10674:2002 e un approccio, più articolato e complesso, in cui vengono individuate le principali componenti dell'incertezza, secondo quanto proposto in un lavoro prodotto dall'Istituto di Metrologia e di Accreditamento Finlandese, MIKES [8].

## 1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Stabilire i metodi di calcolo per determinare l'incertezza di misura da associare ai risultati derivanti dalle prove microbiologiche quantitative, basate sulla conta delle colonie su piastra o sulla valutazione in provetta secondo il metodo del numero più probabile (MPN).

## 2 DEFINIZIONI

Le definizioni utilizzate nella presente Guida sono quelle riferite e/o utilizzate in documenti con valenza internazionale o nazionale (capitolo 11). Nei casi in cui i termini non siano stati specificati e definiti nelle norme o qualora le definizioni siano state modificate per renderle applicabili al settore microbiologico, gli Autori riferiscono l'accezione secondo cui i termini vengono utilizzati nel presente documento. Tali termini sono individuabili all'interno di questo capitolo in quanto non riportano un riferimento riconducibile alla bibliografia del capitolo 11.

- **Analita; misurando:** quantità particolare sottoposta a misurazione. In Microbiologia l'analita è teoricamente definito come un elenco di specie definite in modo tassonomico; in molti casi, in pratica, l'analita può essere definito solo da designazioni di gruppi, meno accurate delle definizioni tassonomiche (UNI ENV ISO 13843:2003).
- **Coefficiente di variazione (CV):** scarto tipo relativo per una caratteristica non negativa, il rapporto tra scarto tipo e media. (UNI ENV ISO 13843:2003). Il termine è utilizzato quando lo scarto tipo relativo è espresso in percentuale ( $CV\% = 100 \times RSD$ ).
- **Conta delle colonie ( $C_i$ ):** numero di colonie contate su una piastra Petri con terreno agarizzato.
- **Conta delle colonie confermate:** conta delle colonie presunte positive, corrette dei falsi positivi.
- **Conta totale delle colonie ( $\sum C$ ):** numero totale delle colonie contate su tutte le piastre Petri utilizzate per il calcolo del conteggio.
- **Conte parallele:** numeri di colonie o particelle in porzioni analitiche uguali tratto dalla stessa sospensione (UNI ENV ISO 13843:2003).
- **Conteggio:** risultato finale, in termini di Unità Formanti Colonie (U.F.C.) per grammo o per millilitro di campione. Generalmente il risultato viene espresso come  $Y = X \cdot 10^k$ , dove  $Y$  è il risultato (conteggio),  $X$  è la media ponderata delle conte e  $10^k$  è il fattore di diluizione.
- **Diluizione ( $d$ ):** sospensione o soluzione ottenuta miscelando un volume misurato della sospensione madre con un volume di diluente pari a  $n$  volte il volume suddetto e ripetendo questa operazione  $k$  volte fino ad ottenere una serie di diluizioni adatte per l'inoculazione dei terreni di coltura. Per  $n = 9$  si ha una diluizione decimale, espressa come  $10^{-k}$ . Per  $k = 2$ , si avrà  $10^{-2}$  che si può anche esprimere come 0,01.
- **Fattore di copertura ( $k$ ):** fattore numerico utilizzato come moltiplicatore dell'incertezza tipo composta per ottenere un'incertezza estesa. Il fattore di copertura  $k$  è tipicamente nell'intervallo da 2 a 3 (UNI CEI ENV 13005:2000). È uguale a 2 in una distribuzione normale (gaussiana) in cui il 95% dei risultati è coperto dall'intervallo dell'incertezza estesa.
- **Fattore di copertura alla probabilità  $p = 95\%$  ( $K_p$ ):** fattore numerico che, nel caso di una distribuzione dei microrganismi, rappresentata dal modello di Poisson, in cui media e varianza della distri-

buzione coincidono, viene moltiplicato per lo scarto tipo  $\sqrt{C}$  permettendo di ottenere un semi-intervallo di fiducia corrispondente al livello di probabilità  $p$  [10].

- **Fattore di diluizione ( $F$ ):** reciproco della diluizione, corrisponde, nel caso di diluizioni decimali, a  $10^k$ , dove  $k$  è uguale al numero di ripetizioni della diluizione considerata. Per  $k = 2$  si può esprimere come 100. Viene utilizzato come fattore moltiplicatore quando si devono trasformare le conte per esprimere la concentrazione del misurando nel campione originale. Nel caso di un singolo *step* di diluizione viene rappresentato dalla lettera  $f$  minuscola.
- **Germe:** entità vivente in grado di produrre crescita in un terreno nutritivo (UNI ENV ISO 13843:2003).
- **Gradi di Libertà ( $gdl$ ):** valore equivalente a  $n-1$ , dove  $n$  corrisponde al numero dei dati sperimentali. Nelle formule matematiche può essere indicato con il simbolo  $v$ .
- **Grandezza d'influenza:** grandezza che non è il misurando ma che altera il risultato della misurazione (UNI CEI ENV 13005:2000).
- **Incertezza (di misura):** parametro, associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione di valori che possono essere ragionevolmente attribuiti al misurando (UNI CEI ENV 13005:2000).
- **Incertezza estesa ( $U$ ):** grandezza che definisce, intorno al risultato di una misurazione, un intervallo che ci si aspetta comprendere una frazione rilevante della distribuzione di valori ragionevolmente attribuibili al misurando (UNI CEI ENV 13005:2000). Ottenuta moltiplicando l'incertezza tipo composta  $u_c$  per il fattore di copertura  $k$ .
- **Incertezza tipo ( $u$ ):** incertezza del risultato di una misurazione espressa come scarto tipo (UNI CEI ENV 13005:2000). Nelle statistiche quantitative essa è uguale allo scarto tipo (*Standard Deviation*). È espressa nella stessa unità di misura del misurando.
- **Incertezza tipo composta ( $u_c$ ):** incertezza tipo del risultato di una misurazione allorché il risultato è ottenuto mediante i valori di un certo numero di grandezze; essa è uguale alla radice quadrata positiva di una somma di termini, che sono le varianze o le covarianze di quelle grandezze, pesate secondo la variazione del risultato della misurazione al variare di esse (UNI CEI ENV 13005:2000).
- **Incertezza tipo composta relativa ( $u(y)/y$ ):** si ottiene dividendo l'incertezza tipo composta, in valore assoluto, per la stima del misurando.
- **Incertezza tipo relativa (*Relative Standard Uncertainty*):** si ottiene dividendo l'incertezza tipo, in valore assoluto, per la stima del misurando. Corrisponde allo scarto tipo relativo (*Relative Standard Deviation - RSD*).
- **Indice di dispersione ( $X^2$ ):** stima del  $\chi^2$ , ricavata da dati sperimentali, utilizzata per la verifica del grado di accordo dei risultati di prova con il modello di distribuzione. Il grado di accettabilità è dato dal confronto tra il valore dell'indice di dispersione e quello della variabile  $\chi^2$ , tabulata in corrispondenza del livello di probabilità  $p$  prefissato e dei gradi di libertà  $v$  definiti in base al numero dei dati sperimentali.

- **Intervallo di fiducia:** intervallo di variazione all'interno del quale, con la probabilità prescelta (generalmente pari al 95%), cade il valore atteso dell'analita nel campione. (UNI 10674:2002).
- **Misura:** informazione costituita da un numero, un'incertezza e un'unità di misura, assegnata a rappresentare un parametro in un determinato stato del sistema (UNI 4546:1984).
- **Misurazione:** insieme di operazioni che ha lo scopo di determinare un valore di una grandezza (UNI CEI ENV 13005:2000).
- **Numero più probabile (MPN - Most Probable Number):** stima del numero più probabile di microrganismi specificati riferito ad una definita quantità di alimento. Tale stima è ricavata dalla combinazione di risultati positivi e negativi ottenuti da una serie di provette inoculate con quantità diluite del campione [10].
- **Ripetibilità ( $r$ ):** grado di concordanza tra i risultati di successive misurazioni dello stesso misurando effettuate nelle stesse condizioni di misurazione (UNI CEI ENV 13005:2000).
- **Riproducibilità ( $R$ ):** grado di concordanza tra i risultati di successive misurazioni dello stesso misurando effettuate cambiando le condizioni di misurazione (UNI CEI ENV 13005:2000).
- **Scarto tipo (Standard Deviation) ( $s$ ):** radice quadrata positiva della varianza (UNI CEI ENV 13005:2000).
- **Scarto tipo relativo (STR) ( $RSD - Relative Standard Deviation$ ):** stima dello scarto tipo di una popolazione da un campione di  $n$  risultati diviso per la media di tale campione (UNI ENV ISO 13843:2003). Nell'ambito delle misure assume l'espressione di Incertezza tipo relativa.
- **Sistema rivelatore:** combinazione di piastre o di provette sulle quali è basata la stima quantitativa della concentrazione microbica presente in un campione. "Gruppo rivelatore" nella norma UNI ENV ISO 13843:2003.
- **Sospensione madre (prima diluizione):** sospensione, soluzione o emulsione ottenuta in seguito a miscelazione di una quantità pesata o misurata del campione in esame con una quantità di diluente pari a  $n$  volte la quantità del campione. Per  $n = 9$  si ha una sospensione diluita in rapporto 1:10.
- **Unità Formante Colonie (UFC):** acronimo, di cui viene sconsigliato l'uso in alcune norme (UNI ENV ISO 13843:2003), viene utilizzato in questa guida in quanto gli autori ne hanno riscontrato l'uso anche in metodi normati e documenti di recente emissione e risulta essere un termine di utilizzo consolidato nei laboratori di prova microbiologici. Germe è uno dei termini alternativi, raccomandati. In UNI 10674 UFC è definito come numero di cellule microbiche presenti in un substrato di crescita dalle quali si sviluppano colonie rilevabili visivamente. Il valore di UFC si esprime in funzione del volume o della massa di campione esaminato.
- **Varianza ( $s^2$ ):** misura della dispersione, definita come somma dei quadrati degli scarti delle osservazioni rispetto alla loro media aritmetica, divisa per il numero delle osservazioni meno uno (UNI CEI ENV 13005:2000).

### 3 SIMBOLI ED ACRONIMI

|                  |   |
|------------------|---|
| $u^2(x_i)$       | <b>Varianza</b> stimata associata alla stima d'ingresso $x_i$ che stima la grandezza d'ingresso $X_i$ |
| CV               | <b>Coefficiente di Variazione</b>   |
| $k$              | <b>Fattore di copertura</b>   |
| $K_p$            | <b>Fattore di copertura alla probabilità <math>p = 95\%</math></b>                                    |
| $u$              | <b>Incertezza</b>   |
| $u(x_i)/x_i$     | <b>Incertezza tipo relativa</b> ( <i>relative standard uncertainty</i> )                              |
| $U$              | <b>Incertezza estesa</b>  |
| $u(x_i)$         | <b>Incertezza tipo</b> (standard uncertainty)   |
| $u_c$            | <b>Incertezza tipo composta</b>   |
| $u(y)/y$         | <b>Incertezza tipo composta relativa o Incertezza composta relativa</b>                               |
| $\bar{x}$        | <b>Media aritmetica</b> di $n$ valori $x_i$   |
| $\chi^2$         | <b>Stima del <math>\chi^2</math>, ricavata da dati sperimentali</b>                                   |
| $s(x_i)$         | <b>Scarto tipo</b> ( <i>Standard Deviation</i> )  |
| $s(x_i)/x_i$     | <b>Scarto tipo relativo</b> ( <i>Relative Standard Deviation - RSD</i> )                              |
| $[u(x_i)/x_i]^2$ | <b>Varianza relativa</b>  |
| $s^2(x_i)$       | <b>Varianza sperimentale</b> determinata da $n$ osservazioni ripetute ed indipendenti                 |

# 4 CALCOLO DEL CONTEGGIO

## 4.1 METODO COLTURALE IN PIASTRE PETRI

In ambito microbiologico l'obiettivo della misurazione è la determinazione, mediante il metodo di conta delle colonie microbiche su piastre Petri, del numero  $N$  di microrganismi presenti in un campione. Il conteggio, come indicato nella ISO 7218, è ottenuto mediante il calcolo della media ponderata delle conte di due diluizioni successive, in cui almeno una piastra contenga 15 colonie, mediante la relazione:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \quad (1)$$

in cui:

$N$  = numero di microrganismi presenti nel campione

$\Sigma C$  = somma delle conte delle colonie in tutte le piastre considerate alle due successive diluizioni

$V$  = volume di inoculo per ciascuna piastra Petri

$n_1$  = numero delle piastre alla prima diluizione considerata

$n_2$  = numero delle piastre alla seconda diluizione considerata

$d$  = diluizione dell'inoculo distribuito nella prima piastra presa in considerazione nella conta

### ESEMPIO 4.1a

Conte piastre:  $C_1 = 168$  ;  $C_2 = 215$  ;  $C_3 = 14$  ;  $C_4 = 25$

Sommatoria conte:  $\Sigma C = 422$

$V = 1$  ml (in ogni piastra)

$n_1 = 2$  (numero di piastre della prima diluizione)

$n_2 = 2$  (numero di piastre della seconda diluizione)

$d = 0,001$  (piastra  $n_1$  con diluizione  $10^{-3}$ )

Sostituendo i dati nella (1)

$$N = \frac{422}{1 \cdot (2 + 0,1 \cdot 2)} \cdot \frac{1}{0,001}$$

$$N = \frac{422}{2,2} \cdot \frac{1}{0,001}$$

$$N = \frac{422}{0,0022} = 191.818 \text{ pari a } 1,9 \times 10^5$$

È opportuno precisare, per la corretta interpretazione del metodo di calcolo proposto nella ISO 7218 [3], ripreso anche nella norma AFNOR 1998 XP V 08-102 [11], che quando si applica un metodo di prova che stabilisca un intervallo di conte accettabili compreso tra 15 e 300 colonie, non devono essere escluse dal conteggio le piastre con meno di 15 colonie. Si devono prendere, invece, in considerazione tutte le piastre con conte valide, anche se inferiori a 15, purchè almeno in una di esse ci siano 15 colonie. A titolo esemplificativo, si riporta il caso applicativo presentato nella norma AFNOR 1998 XP V 08-102. [11]

## ESEMPIO 4.1b

Tabella 4.1 - Combinazione di conte microbiche in un sistema rivelatore multiplo

| Diluizione         | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-3</sup> |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| N. colonie/piastra | 53               | 48               | 5                | 3                |

$$N = \frac{53 + 48 + 5 + 3}{1 \cdot (2 + 0,1 \cdot 2)} \cdot \frac{1}{0,01} = \frac{109}{2,2} \cdot 100 = 4.954$$

Valore arrotondato, per la corretta espressione del risultato, come 5.000 germi per ml o g oppure in forma esponenziale, tenendo in considerazione due cifre significative, come  $5,0 \times 10^3$  germi per ml o g.

Nel caso di metodi che richiedano conferma delle colonie, nella formula (1) si sostituisce  $\Sigma C$  con  $\Sigma a$ , dove

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

in cui  $b$  corrisponde al numero di colonie confermate,  $A$  al numero di colonie, presunte positive, sottoposte a conferma e  $C$  al numero totale di colonie presunte positive per la caratteristica considerata.

## 4.2 METODO COLTURALE IN PROVETTE

Il conteggio dei microrganismi con il metodo MPN è un sistema che presenta un'ampia possibilità di impiego nella microbiologia ambientale e degli alimenti. Consiste nella semina di un'aliquota del campione a diverse diluizioni successive in una serie di provette, con terreno liquido, replicate (3, 5 o 10 volte) per ciascuna diluizione.

Dopo appropriata incubazione, le provette risultate positive sono sottoposte a conferma ed il numero finale di provette positive per diluizione viene utilizzato per il calcolo MPN. L'essenza del metodo MPN sta nella diluizione di un campione ad un grado tale che gli inoculi, "qualche volta, ma non sempre", contengano cellule microbiche vitali [14].

In altri termini, l'applicabilità del metodo richiede che le provette risultino in parte positive e in parte negative. Il numero più probabile rappresenta la stima statistica della concentrazione dei microrganismi in un dato campione, basata sulla distribuzione di Poisson.

La stima del numero più probabile (MPN), derivata da un sistema di più diluizioni e più serie parallele di provette (o pozzetti) per diluizione, è facilmente risolvibile facendo uso delle tabelle MPN riferite nella ISO 7218 [3].

Tabelle MPN utilizzabili sono anche allegate a metodi normati, ma bisogna verificare che siano specifiche per la serie di provette allestite (usualmente serie di 3 o di 5 provette).

Le attuali tabelle MPN, pur riportando un risultato per qualsiasi combinazione di provette positive, esprimono, mediante l'individuazione di 4 categorie, un giudizio sulla plausibilità statistica del risultato osservato, tenuto conto anche del numero di prove effettuate. In questi casi, spetta all'utilizzatore decidere quali risultati accettare o meno. Prima di iniziare la prova si dovrebbe aver già definito quale categoria considerare accettabile: categoria 1; 1 e 2 o 1, 2 e 3.

Quando dal risultato dipende una decisione di grande importanza, si dovrebbero accettare solo i risultati che ricadono nella categoria 1 o al massimo 1 e 2. I risultati della categoria 0 dovrebbero essere considerati con molte riserve.

# 5 VALUTAZIONE DEI CONTRIBUTI DELL'INCERTEZZA

La Guida all'espressione dell'incertezza di misura [5] classifica i metodi di stima dell'incertezza in:

- Valutazione di categoria A dei contributi delle incertezze
- Valutazione di categoria B dei contributi delle incertezze

## 5.1 VALUTAZIONE DI CATEGORIA A

Una valutazione di categoria A dell'incertezza tipo  $u(x_i)$ , si ottiene da una serie di  $n$  misure indipendenti  $(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$  del campione sottoposto a prova, nelle stesse condizioni sperimentali (condizioni di ripetibilità) calcolando lo scarto tipo sperimentale mediante la formula:

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

La valutazione di categoria A dell'incertezza può riguardare il risultato finale di una prova oppure solo una parte di essa. Essa è tanto più affidabile quanto maggiore è il numero di misure indipendenti  $n$ .

Per le misurazioni di *routine* in microbiologia, la strada della ripetizione di  $n$  prove non è generalmente percorribile, principalmente per due ragioni:

- la variabilità, da caso a caso, del numero di colonie, dovuta al modello di distribuzione di Poisson (è questa la maggiore componente dell'incertezza);
- l'instabilità del campione.

Nell'ambito della presente Guida, la valutazione di categoria A viene applicata nel calcolo di singole componenti di incertezza che hanno influenza sul risultato delle prove (es. volumi di inoculo e volumi dei diluenti).

## 5.2 VALUTAZIONE DI CATEGORIA B

Tutte le valutazioni di incertezza non basate sull'analisi statistica di una serie di dati sono definite valutazioni di categoria B. Esse sono basate su informazioni di vario tipo, tra le quali si possono citare:

- distribuzioni statistiche prese a modello (es. distribuzione di Poisson);
- distribuzioni di possibili valori, prese come modello a priori (es. distribuzione rettangolare e triangolare);
- valori basati sull'esperienza o su informazioni relative alle specifiche di una apparecchiatura e date dal costruttore;
- dati ottenuti dalla letteratura scientifica;
- caratteristiche dei materiali (specifiche tecniche del produttore);
- dati forniti nei certificati di taratura.

I casi più frequenti di distribuzione *a priori*, applicabili alle prove chimiche e fisiche, sono le distribuzioni rettangolare e triangolare [2,5], che trovano limitata applicazione in campo microbiologico, per il quale è invece largamente usata la distribuzione di Poisson [3,4].

La distribuzione di Poisson è considerata come un modello statistico appropriato in microbiologia nelle sospensioni ben miscelate, in cui le cellule microbiche sono distribuite in modo perfettamente

casuale. Il modello di Poisson ha l'indubbio vantaggio che una singola valutazione può essere collegata ad ogni determinazione [4].

Poiché i misurandi (germi) delle prove microbiologiche seguono la distribuzione di Poisson, l'incertezza legata ai risultati derivati da una prova di microbiologia viene calcolata come intervallo di fiducia al 95% di probabilità [3].

## 5.2.1 Calcolo dell'intervallo di fiducia secondo ISO 7218

### 5.2.1.1 Conta di piccoli numeri di microrganismi

Per numeri di microrganismi per piastra sino a 15 l'intervallo di fiducia è ricavato

- dalla *tabella A-1* della ISO 7218 [3] se il metodo applicato prevede che la prova venga condotta in singolo (una piastra di Petri);
- dalla *tabella A-2* della ISO 7218 [3] se il metodo applicato prevede che la prova venga condotta in doppio (due piastre di Petri).

### 5.2.1.2 Conta di microrganismi superiore a 15

L'intervallo di fiducia per valori di microrganismi superiore a 15 si valuta applicando l'espressione

$$\delta = \left[ \frac{\sum C}{B} + \frac{1,92}{B} \pm \frac{1,96 \sqrt{\sum C}}{B} \right] \cdot \frac{1}{d} \quad (3)$$

in cui

$\delta$  = intervallo di fiducia della distribuzione statistica dei microrganismi presenti nel campione

$\sum C$  = somma delle conte delle colonie in tutte le piastre considerate alle due successive diluizioni

$B = V(n_1 + 0,1n_2)$  dalla equazione (1)

1,92 = fattore di correzione che tiene conto della non perfetta approssimazione della distribuzione di Poisson rispetto a quella normale

1,96 = variabile standardizzata  $k$  per  $p = 0.95$  ( $k_{0,95}$ )

$d$  = diluizione corrispondente al primo inoculo considerato

#### ESEMPIO 5.2.1.2

Posto  $B$  della (3) pari a

$$B = V(n_1 + 0,1n_2) = 2,2$$

e riprendendo i dati del precedente esempio 4.1a

$$\delta = \left[ \frac{422}{2,2} + \frac{1,92}{2,2} \pm \frac{1,96 \sqrt{422}}{2,2} \right] \cdot \frac{1}{0,001}$$

Limite superiore

$$\delta = [192.670 + 18.300] = 210.970$$

arrotondato a 210.000 pari a  $2,1 \times 10^5$

Limite inferiore

$$\delta = [192.670 - 18.300] = 174.370$$

arrotondato a 170.000 pari a  $1,7 \times 10^5$

### 5.2.2 Calcolo dell'intervallo di fiducia secondo UNI ENV ISO 13843 e UNI 10674

Estremamente semplificato è il metodo di calcolo proposto dall'*American Standard Methods* [9] riportato nella ISO 13843 [4] e ripreso dalla UNI 10674 [10], che si basa sull'equivalenza tra il conteggio e la varianza.

Per conteggi in singola piastra superiori a 15 UFC/unità di campione permette di calcolare i limiti di fiducia al 95 % di probabilità.

Dato  $C$  = conteggio, l'intervallo di fiducia al 95% di probabilità, per un fattore di copertura  $K_p = 2$ , è espresso da

$$C \pm 2\sqrt{C} \quad (4)$$

in cui il Limite superiore =  $C + 2\sqrt{C}$  ed il Limite inferiore =  $C - 2\sqrt{C}$

#### ESEMPIO 5.2.2a

Dall'esempio 4.1a

Posto  $C = 191,8$  conteggio ricavato dal rapporto  $\frac{422}{2,2}$

e sostituendo in (4), moltiplicando per il fattore di diluizione 1000 (reciproco della diluizione)

$$(191,8 \pm 2\sqrt{191,8}) \cdot \frac{1}{0,001} = 191.800 \pm 27.698$$

I limiti dell'intervallo di fiducia saranno pertanto:

Limite superiore = 219.498 arrotondato a 220.000 pari a  $2,2 \times 10^5$

Limite inferiore = 164.102 arrotondato a 160.000 pari a  $1,6 \times 10^5$

Nel caso di conteggi ottenuti da due prove in parallelo, la norma UNI 10674 indica per il calcolo dell'intervallo di fiducia, la formula

$$C = C_m \pm 2,0 \sqrt{\frac{C_m}{2}}$$

che approssimando dà  $C = C_m \pm 1,4 \sqrt{C_m}$

in cui  $C_m$  è la conta media.

### ESEMPIO 5.2.2b

Conte delle piastre in parallelo  $C_1 = 20$   $C_2 = 29$

Conta media  $C_m = 25$

$C = 25 \pm 1,4 \sqrt{25}$  pari a  $C = 25 \pm 7$

I limiti dell'intervallo di fiducia saranno pertanto:

Limite superiore = 32

Limite inferiore = 18

### 5.2.3 Calcolo dell'intervallo di fiducia in un sistema MPN con diluizioni multiple

In un sistema di più diluizioni e più serie parallele di provette (o pozzetti) per diluizione, applicando le tabelle MPN con cui si è stimato il numero più probabile (MPN), si ottiene, per ogni combinazione di provette positive, il relativo limite di fiducia al 95% e al 99% di probabilità.

Sulla base dell'intervallo di fiducia, ricavato dalle tabelle MPN o da appositi programmi informatici, è possibile calcolare l'incertezza tipo relativa secondo la formula:

$$u(MPN)/MPN = \frac{\ln(x_{sup}) - \ln(x_{inf})}{2} \cdot \frac{1}{2} \quad (5)$$

dove  $x_{sup}$  e  $x_{inf}$  sono, rispettivamente, i limiti superiore e inferiore dell'intervallo di fiducia per una probabilità  $p = 95\%$ .

Nell'equazione, la semiampiezza dell'intervallo di fiducia viene moltiplicata per 1/2 per presentare il valore alla probabilità  $p = 68\%$ , pari ad un  $\sigma$ .

Nel caso di prove che richiedano l'allestimento di numerose diluizioni, si dovrà tener conto anche del fattore di diluizione. Si ricaverà l'incertezza composta relativa, estraendo la radice quadrata della somma delle varianze relative dei diversi contributi di incertezza:

$$u(y)/y = \sqrt{[u(MPN)/MPN]^2 + [u(F)/F]^2} \quad (6)$$

Per il calcolo della varianza relativa del fattore di diluizione si rimanda al paragrafo 6.2.

### ESEMPIO 5.2.3

Si abbia una combinazione 3 2 1 di provette positive che, applicando le tabelle MPN [3], dà un risultato  $MPN = 15$  ed un intervallo di fiducia, alla probabilità del 95%, con limite inferiore = 3 e limite superiore = 38.

L'incertezza tipo relativa sarà data da:

$$u(MPN)/MPN = \frac{\ln(38) - \ln(3)}{4}$$

$$u(MPN)/MPN = 0,635$$

Per il calcolo dell'incertezza composta relativa si dovrà sommare sotto radice quadrata l'incertezza tipo relativa del fattore di diluizione, che nell'esempio si ipotizza essere pari a 0,055.

$$u(y)/y = \sqrt{0,635^2 + [u(F)/F]^2}$$

Si procede, infine, al calcolo della radice quadrata della somma delle varianze, come indicato al successivo paragrafo 6:

$$u(y)/y = \sqrt{0,635^2 + 0,055^2} = 0,637$$

# 6 STIMA DELLE COMPONENTI DELL'INCERTEZZA NEI METODI DI CONTEGGIO IN PIASTRE PETRI

Le condizioni in cui viene effettuata una prova microbiologica sono, di fatto, praticamente irripetibili: pertanto il miglior approccio in microbiologia sembra essere la composizione di una incertezza stimata, ottenuta da singole incertezze di singole operazioni della procedura analitica.

Allo scopo viene applicato un procedimento matematico, noto come “legge di propagazione dell’incertezza” che risulta essere complicato in presenza di covarianze; quando le componenti di incertezza sono indipendenti, non si parla più di covarianze e la trattazione della legge di propagazione risulta più semplice.

La maggior parte delle componenti dell’incertezza nei metodi microbiologici possono essere assunte come indipendenti l’una dall’altra o solo debolmente correlate. Unica eccezione è l’incertezza del fattore di diluizione, che si ottiene da un rapporto in cui sia al numeratore sia al denominatore appare la misura dello stesso volume [8].

Il modo più immediato di esprimere l’incertezza nelle prove microbiologiche è usualmente l’incertezza tipo relativa. Nonostante i valori di incertezza usati per valutare la rispondenza a limiti cogenti debbano essere espressi nella stessa grandezza del risultato, è utile, almeno nelle prime fasi di calcolo, riportare l’incertezza in unità relative [8].

L’incertezza tipo composta, data da fattori indipendenti, viene calcolata come la radice quadrata della somma delle varianze.

L’incertezza composta del risultato di un metodo di prova microbiologico, solitamente, deriva dalla combinazione di diversi fattori. Nelle prove microbiologiche sono sempre coinvolti fattori legati a:

- Incertezza data dalla distribuzione di Poisson (6.1)
- Incertezza del fattore di diluizione (6.2)
- Incertezza del volume totale inoculato (6.3)
- Incertezza di conferma delle colonie (6.4)
- Incertezza di lettura delle piastre Petri (6.5)

## 6.1 INCERTEZZA DATA DALLA DISTRIBUZIONE DI POISSON

### 6.1.1 Incertezza di una singola conta

La distribuzione statistica di un numero di microorganismi osservata in un volume definito può essere descritta dal modello di Poisson. La distribuzione di Poisson è un modello adatto a rappresentare la variazione del numero di particelle osservate in una serie di aliquote misurate (inoculi) provenienti da sospensioni omogeneamente miscelate.

**La varianza relativa della conta da una singola piastra** è data da:

$$\left[ u(z)/z \right]^2 = \frac{1}{z} \quad (7)$$

$z$  = numero delle colonie presenti

#### ESEMPIO 6.1.1

Data la conta su una piastra singola = 36 colonie, sostituendo nella (7)

$$\left[ u(x)/x \right]^2 = \frac{1}{36} = 0,0278$$

### 6.1.2 Incertezza di una somma di conte

La stima della concentrazione microbica, nel caso di un sistema rivelatore multiplo, è calcolata come Media ponderata, data dalla somma di tutte le colonie contate ( $Z = \sum z_i$ ) divise per il volume totale analizzato ( $V = \sum v_i$ ).

$$\text{Media ponderata} = \frac{\sum z_i}{\sum v_i} = \frac{Z}{V} \quad (8)$$

La formula, per la stima della **varianza relativa della somma delle conte**, è analoga a quella della singola conta (7), ma il valore stimato è solitamente minore perché derivato da un maggior numero di colonie:

$$[u(Z)/Z]^2 = \frac{1}{\sum z_i} = \frac{1}{Z} \quad (9)$$

Z = somma del numero di colonie presenti in un sistema rivelatore multiplo, costituito da più piastre

#### ESEMPIO 6.1.2

Tabella 6.1.2 - Combinazione di conte microbiche in un sistema rivelatore multiplo

| Diluizione       | Conte     |                   | Conta totale |
|------------------|-----------|-------------------|--------------|
|                  | piastra 1 | piastra 2         |              |
| 10 <sup>-4</sup> | 156       | 185               | 341          |
| 10 <sup>-5</sup> | 17        | 22                | 39           |
|                  |           | <b>Totale (Z)</b> | <b>380</b>   |

Sostituendo nella (9)

$$[u(x)/x]^2 = \frac{1}{380} = 0,0026$$

### 6.2 INCERTEZZA DEL FATTORE DI DILUIZIONE

Il fattore di diluizione  $f$  – di un unico *step* di diluizione – è dato dalla relazione

$$f = \frac{V_{inoc} + V_{dil}}{V_{inoc}} \quad (10)$$

essendo

$V_{inoc}$  = volume dell'inoculo

$V_{dil}$  = volume del diluente sterile

Il fattore di diluizione – dato da  $k$  successivi *step* di diluizione – è calcolato come prodotto dei singoli fattori  $f$

$$F_k = \frac{V_{inoc.1} + V_{dil.1}}{V_{inoc.1}} \cdot \frac{V_{inoc.2} + V_{dil.2}}{V_{inoc.2}} \cdot \dots \cdot \frac{V_{inoc.k} + V_{dil.k}}{V_{inoc.k}} = f_1 \cdot f_2 \cdot \dots \cdot f_k \quad (11)$$

Il fattore di diluizione, dato da  $k$  successivi *step* di diluizione, considerato che la serie di diluizioni è solitamente “regolare” nel senso che i volumi di *inoculo* e *diluyente* sono uguali in tutti gli *step*, è espresso più semplicemente mediante la relazione

$$F_k = f^k = \left( \frac{V_{inoc} + V_{dil}}{V_{inoc}} \right)^k \quad (12)$$

dove  $k$  = numero degli *step*

**La varianza del fattore di diluizione  $f$  è data da:**

$$u^2(f_i) = \frac{u^2(dil)}{V_{inoc}^2} + \frac{V_{dil}^2 u^2(inoc)}{V_{inoc}^4} \quad (13)$$

essendo

$u^2(dil)$  = varianza del volume del diluyente

$u^2(inoc)$  = varianza del volume di inoculo

L’incertezza volumetrica è il risultato di almeno tre principali fattori di influenza:

- ripetibilità di riempimento e svuotamento del sistema di misurazione del volume
- specifiche della vetreria date dal costruttore (limiti dichiarati del “volume vero”)
- effetto della temperatura quando la taratura e la misurazione vengono effettuate a temperature diverse.

Data la difficoltà di calcolo dell’incertezza volumetrica tramite i 3 fattori indicati, la stima dell’incertezza di volume, che deriva da misurazioni ripetute, è un approccio più pratico e permette la stima simultanea delle componenti casuali e sistematiche dell’incertezza.

La  $u^2(dil)$  e  $u^2(inoc)$  sono le varianze, rispettivamente, del volume del diluyente e del volume dell’inoculo dispensato con la relativa pipetta graduata. Si tratta di valori calcolati mediante una valutazione dei contributi delle incertezze di categoria A.

In altri termini, si eseguono delle prove di ripetibilità dei dosaggi del diluyente e dell’inoculo, misurati per pesata, calcolandone lo scarto tipo  $s$  e la varianza  $s^2$ .

Si riporta l’esempio 6.2a, in cui lo scarto tipo del volume di inoculo viene calcolato sulla base di 20 pesate, ottenute utilizzando 5 diverse pipette del volume richiesto dalla prova, con le quali il dosaggio viene ripetuto per 4 volte.

### ESEMPIO 6.2a

Tabella 6.2a - Calcolo dello scarto tipo del volume di inoculo

|                  | Ripetizione 1      | Ripetizione 2 | Ripetizione 3                   | Ripetizione 4 |
|------------------|--------------------|---------------|---------------------------------|---------------|
| <b>Pipetta 1</b> | 1,03               | 0,97          | 1,02                            | 1,01          |
| <b>Pipetta 2</b> | 1,02               | 0,97          | 1,02                            | 0,98          |
| <b>Pipetta 3</b> | 1,01               | 1,03          | 1,02                            | 1,04          |
| <b>Pipetta 4</b> | 1,01               | 1,01          | 1,01                            | 1,01          |
| <b>Pipetta 5</b> | 1,02               | 1,01          | 1,01                            | 0,97          |
| <b>Media</b>     | <b>Scarto tipo</b> |               | <b>Incertezza tipo relativa</b> |               |
| 1,01             | 0,0203             |               | 0,02                            |               |
|                  |                    |               | <b>CV%</b>                      |               |
|                  |                    |               | 2,0                             |               |

Nell'esempio 6.2b lo scarto tipo del volume del diluente viene calcolato sulla base di 20 pesate del diluente, a fine sterilizzazione in autoclave, ottenute per differenza tra il peso lordo delle provette contenenti il diluente sterilizzato raffreddato e la tara della relativa provetta vuota, pesata prima del riempimento.

### ESEMPIO 6.2b

Tabella 6.2b - Calcolo dello scarto tipo del volume del diluente (9 ml)

| N. | Provetta vuota con tappo | PRIMA DELLA STERILIZZAZIONE     |                     | DOPO LA STERILIZZAZIONE |                     |
|----|--------------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
|    |                          | Provetta + diluente             | Peso netto diluente | Provetta + diluente     | Peso netto diluente |
| 1  | 20,57                    | 29,78                           | 9,21                | 29,62                   | 9,05                |
| 2  | 15,72                    | 24,96                           | 9,24                | 24,80                   | 9,08                |
| 3  | 18,56                    | 27,77                           | 9,21                | 27,64                   | 9,08                |
| 4  | 16,72                    | 25,92                           | 9,20                | 25,76                   | 9,04                |
| 5  | 16,08                    | 25,29                           | 9,21                | 25,11                   | 9,03                |
| 6  | 20,39                    | 29,59                           | 9,20                | 29,50                   | 9,11                |
| 7  | 20,29                    | 29,49                           | 9,20                | 29,10                   | 8,81                |
| 8  | 19,32                    | 28,54                           | 9,22                | 28,44                   | 9,12                |
| 9  | 23,94                    | 33,18                           | 9,24                | 32,93                   | 8,99                |
| 10 | 18,83                    | 28,02                           | 9,19                | 27,65                   | 8,82                |
| 11 | 16,31                    | 25,50                           | 9,19                | 25,26                   | 8,95                |
| 12 | 19,59                    | 28,82                           | 9,23                | 28,68                   | 9,09                |
| 13 | 19,55                    | 28,80                           | 9,25                | 28,66                   | 9,11                |
| 14 | 24,10                    | 33,32                           | 9,22                | 33,06                   | 8,96                |
| 15 | 19,15                    | 28,40                           | 9,25                | 28,18                   | 9,03                |
| 16 | 19,76                    | 28,94                           | 9,18                | 28,79                   | 9,03                |
| 17 | 26,18                    | 35,38                           | 9,20                | 35,27                   | 9,09                |
| 18 | 20,23                    | 29,44                           | 9,21                | 29,20                   | 8,97                |
| 19 | 25,34                    | 34,53                           | 9,19                | 34,50                   | 9,16                |
| 20 | 19,79                    | 29,06                           | 9,27                | 28,92                   | 9,13                |
|    |                          | <b>MEDIA</b>                    | <b>9,22</b>         |                         | <b>9,03</b>         |
|    |                          | <b>SCARTO TIPO</b>              | <b>0,02</b>         |                         | <b>0,09</b>         |
|    |                          | <b>INCERTEZZA TIPO RELATIVA</b> |                     |                         | <b>0,010</b>        |

Ricavata la **varianza relativa del fattore di diluizione** dall'espressione

$$[u(f)/f]^2 = \frac{\left( u^2(dil) + V_{dil}^2 \cdot [u(inoc)/inoc]^2 \right)}{(V_{inoc} + V_{dil})^2} \quad (14)$$

essendo

- $V_{inoc}$  = volume dell'inoculo
- $V_{dil}$  = volume del diluente sterile
- $u^2(dil)$  = varianza del volume del diluente
- $[u(inoc)/inoc]^2$  = varianza relativa del volume di inoculo
- $f$  = fattore di diluizione

la **varianza relativa del fattore di diluizione totale**, nel caso tutte le diluizioni siano costituite da  $k$  *step* uguali, è data dall'espressione

$$[u(F)/F]^2 = k \cdot [u(f)/f]^2 \quad (15)$$

### ESEMPIO 6.2c

Considerati i dati degli esempi 6.2a e 6.2b:

$u(\text{inoc})/\text{inoc} = 0,02$  (2%)

$u(\text{inoc})$ , incertezza tipo di **1 ml** di inoculo:  $\text{ml } 1 \times 2\% = \mathbf{0,02}$

$u(\text{dil})/\text{dil} = 1\%$

$u(\text{dil})$ , incertezza tipo di **9 ml** di diluente:  $\text{ml } 9 \times 1\% = \mathbf{0,09}$

sostituendo nella espressione (14), si ottiene la varianza relativa del fattore di diluizione:

$$[u(f)/f]^2 = \frac{(0,09^2 + 9^2 \cdot 0,02^2)}{(1+9)^2} = 0,0004$$

Nel caso di diluizione da  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , con *step* uguali nelle 3 diluizioni, si avrà:

$$[u(F)/F]^2 = k \cdot \frac{(0,09^2 + 9^2 \cdot 0,02^2)}{(1+9)^2} = 3 \cdot 0,0004$$

$[u(F)/F]^2 = 0,0012$  che è il valore della varianza relativa del fattore di diluizione totale.

## 6.3 INCERTEZZA DEL VOLUME TOTALE INOCULATO

La **varianza del volume totale (V) inoculato**, nel caso di un sistema rivelatore multiplo, è data dalla relazione

$$u^2(V) = n \cdot u^2(\text{inoc}) + \left(\frac{1}{f}\right)^2 \cdot \left\{ n \cdot [u(\text{inoc})/\text{inoc}]^2 + k \cdot [u(f)/f]^2 \right\} \quad (16)$$

essendo

$n$  = numero di piastre inoculate per ciascuna diluizione

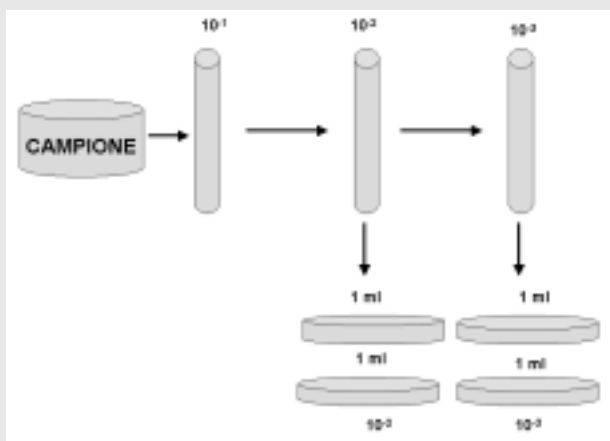
$k$  = numero di *step* di diluizione

L'**incertezza relativa del volume totale (V) inoculato** è data da:

$$u(V)/V = \frac{\sqrt{u^2(V)}}{V} \quad (17)$$

### ESEMPIO 6.3a

Figura 6.3a - Caso di prove che prevedano diluizioni



Considerati i dati degli esempi 6.2a e 6.2b:

$$u(\text{inoc})/\text{inoc} = 0,02 \text{ (2\%)}$$

$u(\text{inoc})$  - incertezza tipo di **1 ml** di inoculo:

$$\text{ml } 1 \times 2\% = \mathbf{0,02}$$

$$u(\text{dil})/\text{dil} = 0,01 \text{ (1\%)}$$

$u(\text{dil})$  - incertezza tipo di **9 ml** di diluente:

$$\text{ml } 9 \times 1\% = \mathbf{0,09}$$

nelle seguenti condizioni operative:

$$f = 10 \text{ (fattore di diluizione di un singolo step)}$$

$$n = 2 \text{ (numero di piastre)}$$

$$k = 2 \text{ (numero di step di diluizione)}$$

sostituendo nella (16):

$$u^2(V) = 2 \cdot 0,02^2 + (0,1)^2 \cdot \left\{ 2 \cdot 0,02^2 + 2 \cdot 0,0004 \right\} = 0,000816$$

$$u(V) = \sqrt{0,000816} = 0,0286$$

Da cui si ricava l'incertezza relativa del volume totale (V) inoculato sostituendo nella (17):

$$u(V)/V = \frac{0,0286}{2,2} = 0,013$$

Nella tabella 6.3a, che utilizza gli stessi valori di incertezza relativa dei volumi di inoculo e del diluente presentati nell'esempio 6.3a, vengono ipotizzati casi con numeri di *step* di diluizione da 0 a 9. Si può rilevare che l'incertezza relativa del volume totale inoculato  $u(V)/V$ , tra la prima e l'ultima diluizione, mostra variazioni solo alla quarta cifra decimale.

Tabella 6.3a - Calcolo dell'incertezza relativa del volume totale inoculato  $u(V)/V$

| Diluizioni | $[u(F)/F]^2$ | $u^2(V)$ | $u(V)$   | $u(V)/V$ |
|------------|--------------|----------|----------|----------|
| $10^0$     | 0,0000       | 0,000808 | 0,028425 | 0,0129   |
| $10^{-1}$  | 0,0004       | 0,000812 | 0,028496 | 0,0130   |
| $10^{-2}$  | 0,0008       | 0,000816 | 0,028566 | 0,0130   |
| $10^{-3}$  | 0,0012       | 0,000820 | 0,028636 | 0,0130   |
| $10^{-4}$  | 0,0016       | 0,000824 | 0,028705 | 0,0130   |
| $10^{-5}$  | 0,0020       | 0,000828 | 0,028775 | 0,0131   |
| $10^{-6}$  | 0,0024       | 0,000832 | 0,028844 | 0,0131   |
| $10^{-7}$  | 0,0028       | 0,000836 | 0,028914 | 0,0131   |
| $10^{-8}$  | 0,0032       | 0,000840 | 0,028983 | 0,0132   |
| $10^{-9}$  | 0,0036       | 0,000844 | 0,029052 | 0,0132   |

La variazione del valore di incertezza relativa del volume inoculato, solo alla quarta cifra decimale, consente di considerare trascurabile la varianza relativa del fattore di diluizione totale  $[u(F)/F]^2$ , semplificando la (16) come segue:

$$u^2(v) = n \cdot u^2(inoc) + \left(\frac{1}{f}\right)^2 \cdot \left\{ n \cdot [u(inoc)/inoc]^2 \right\} \quad (18)$$

Nel caso gli inoculi non prevedano alcuna diluizione e, quindi, il dosaggio venga eseguito con 1 ml e 0,1 ml della sospensione madre, la formula risulta così semplificata:

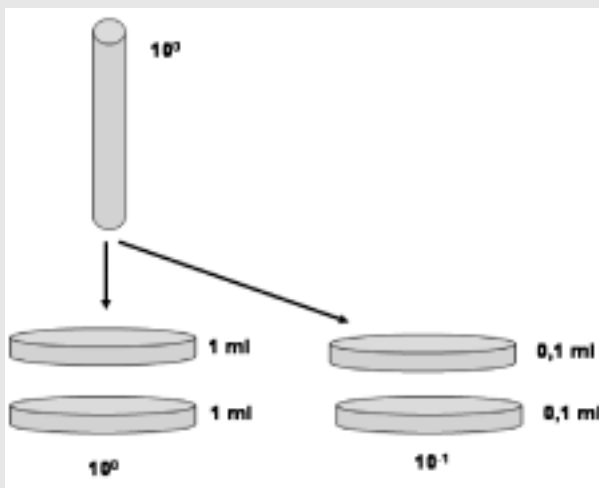
$$u^2(V) = u^2(1ml) + u^2(1ml) + u^2(0,1ml) + u^2(0,1ml) \quad (19)$$

Si ricava infine dalla (18) e dalla (19) la **varianza relativa del volume totale inoculato** (20) da utilizzare nel calcolo dell'incertezza composta (capitolo 7):

$$[u(V)/V]^2 = \frac{u^2(V)}{V^2} \quad (20)$$

### ESEMPIO 6.3b

Figura 6.3b - Caso di prove che non prevedano diluizioni



Considerando i seguenti dati:

$$u(1 \text{ ml})/1 \text{ ml} = 2\%$$

$$\text{Incertezza tipo di } \mathbf{1 \text{ ml}} \text{ di inoculo: } 1 \text{ ml} \times 2\% = 0,02$$

$$u(0,1 \text{ ml})/0,1 \text{ ml} = 8\% \text{ (dati di calcolo non presentati)}$$

Incertezza tipo di **0,1 ml** di inoculo:

$$0,1 \text{ ml} \times 8\% = 0,008$$

Sostituendo nella (19)

$$u(V) = \sqrt{0,02^2 + 0,02^2 + 0,008^2 + 0,008^2} = 0,0305 \text{ ml}$$

Da cui si ricava l'incertezza relativa del volume totale (V) inoculato:

$$u(V)/V = \frac{0,0305 \text{ ml}}{2,2 \text{ ml}} = 0,014$$

## 6.4 INCERTEZZA DI CONFERMA DELLE COLONIE

Se si assume che  $k$  colonie di un totale di  $n$  colonie sia confermato, la miglior stima del coefficiente di conferma è data dal rapporto:

$$\hat{p} = \frac{k}{n} \quad (21)$$

essendo

$n$  = numero colonie presunte positive, sottoposte a conferma

$k$  = numero di colonie confermate

**La varianza relativa del coefficiente di conferma**, è data da:

$$[u(\hat{p})/\hat{p}]^2 = \frac{n-k}{kn} \quad (22)$$

**La varianza della distribuzione di Poisson**, nel caso della conta confermata, è data da:

$$u^2(x) = \frac{z^2k(n-k) + nk^2z}{n^3} \quad (23)$$

essendo

$z$  = numero delle colonie presunte positive

$k$  = numero delle colonie confermate

$n$  = numero delle colonie presunte positive, sottoposte a conferma

**La varianza relativa della distribuzione di Poisson**, nel caso della conta confermata viene così semplificata:

$$[u(x)/x]^2 = \frac{1}{z} + \frac{1}{k} - \frac{1}{n} \quad (24)$$

essendo

$z$  = numero delle colonie presunte positive

$k$  = numero delle colonie confermate

$n$  = numero delle colonie presunte positive, sottoposte a conferma

L'applicazione della metodologia qui presentata può seguire percorsi diversi in dipendenza dell'approccio seguito per la conferma delle colonie. Ci possono essere 3 diversi approcci, che verranno di seguito illustrati:

- in un sistema rivelatore multiplo
- per singola diluizione
- per singola piastra.

#### **6.4.1 Conferma generale in un sistema rivelatore multiplo**

*(caso di più piastre appartenenti a più diluizioni)*

La somma delle conte confermate è espressa dalla relazione:

$$X = \sum x_i = \hat{p}_1 z_1 + \hat{p}_2 z_2 + \dots \quad (25)$$

essendo

$x_i$  = conte confermate

$z_1$  = numero delle colonie presunte positive, della prima piastra

$z_2$  = numero delle colonie presunte positive, della seconda piastra

All'interno del sistema multiplo le colonie di ciascuna piastra Petri sono rappresentative di una stessa popolazione microbica. Il rapporto di conferma calcolato da ciascuna piastra può essere una stima del rapporto di conferma come espresso in (21).

**Il coefficiente di conferma comune** sarà pertanto calcolato dal rapporto:

$$\hat{p} = \frac{\sum k_i}{\sum n_i} \quad (26)$$

essendo

$\sum k_i$  = somma delle colonie confermate nel sistema rivelatore multiplo

$\sum n_i$  = somma delle colonie presunte positive, sottoposte a conferma

**La varianza relativa della somma delle conte confermate** è data da:

$$[u(X)/X]^2 = \frac{1}{\sum z_i} + \frac{1}{\sum k_i} - \frac{1}{\sum n_i} \quad (27)$$

che può anche essere scritta, analogamente alla (24) come

$$[u(X)/X]^2 = \frac{1}{Z} + \frac{1}{K} - \frac{1}{N} \quad (28)$$

essendo

$Z$  = somma delle colonie presunte positive

$K$  = somma delle colonie confermate

$N$  = somma delle colonie presunte positive sottoposte a conferma

#### **ESEMPIO 6.4.1** (Dati grezzi da esempio 6.4.2)

*Tabella 6.4.1 - Conferma di conte microbiche in un sistema rivelatore multiplo*

| Colonie presunte positive<br>( $Z$ ) | Colonie sottoposte a conferma<br>( $N$ ) | Colonie confermate<br>( $K$ ) | Coefficiente di conferma<br>( $\hat{p}$ ) | Conta confermata<br>( $X$ ) |
|--------------------------------------|--|-------------------------------|---|-----------------------------|
| 157                                  | 26                                       | 20                            | 0,77                                      | 120,8                       |

Sostituendo i valori della tabella 6.4.1, nella relazione (28):

$$[u(X)/X]^2 = \frac{1}{157} + \frac{1}{20} - \frac{1}{26} = 0,01791$$

l'incertezza tipo relativa è data da:

$$u(X)/X = \sqrt{0,01791} = 0,1338$$

#### **6.4.2 Conferma specifica di ciascuna diluizione in un sistema rivelatore multiplo**

*(caso di due piastre in parallelo per due diluizioni successive)*

Quando il fattore di diluizione tra due livelli di diluizione è 10, la media delle colonie nelle piastre Petri di diluizioni successive è notevolmente diversa: la proporzione delle colonie confermate appare, pertanto, diversa nelle due diluizioni, dato che le variazioni nella comparsa delle colonie, dovute alla differente aggregazione delle particelle, alterano la valutazione soggettiva delle colonie presunte positive.

Nel caso di due piastre in parallelo per due diluizioni successive, assunto che il rapporto di conferma

sia diverso nelle due diluizioni, le colonie da sottoporre a prova di conferma devono essere scelte separatamente da ciascuna diluizione.

**La somma delle conte confermate** è data dalla relazione:

$$X = \frac{K_1 Z_1}{N_1} + \frac{K_2 Z_2}{N_2} \quad (29)$$

**La varianza della somma delle conte confermate** è data da:

$$u^2(X) = \frac{Z_1^2 K_1 (N_1 - K_1) + N_1 K_1^2 Z_1}{N_1^3} + \frac{Z_2^2 K_2 (N_2 - K_2) + N_2 K_2^2 Z_2}{N_2^3} \quad (30)$$

essendo

$X$  = somma delle conte confermate

$Z_1$  = somma delle colonie presunte positive nella prima diluizione

$N_1$  = numero totale di colonie presunte positive sottoposte a conferma nella prima diluizione

$K_1$  = numero totale di colonie confermate nella prima diluizione

$Z_2$  = somma delle colonie presunte positive nella seconda diluizione

$N_2$  = numero totale delle colonie presunte positive sottoposte a conferma nella seconda diluizione

$K_2$  = numero totale delle colonie confermate nella seconda diluizione

**La varianza relativa della somma delle conte confermate** è data da:

$$\left[ \frac{u(X)}{X} \right]^2 = \frac{u^2(X)}{X^2} \quad (31)$$

#### ESEMPIO 6.4.2

Tabella 6.4.2 - Conferma di conte microbiche per singola diluizione

| Diluizioni | Colonie Presunte positive<br>(z) | Colonie Sottoposte a conferma<br>(n) | Colonie Confermate<br>(k) | Coefficiente di conferma<br>(p̂) | Conta confermata<br>(x) |
|------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| $10^{-3}$  | 146                              | 17                                   | 12                        | 0,706                            | 103,1                   |
| $10^{-4}$  | 11                               | 9                                    | 8                         | 0,891                            | 9,8                     |
|            |                                  |                                      |                           | <b>Totale</b>                    | <b>112,9</b>            |

Sostituendo i valori nella (30) per entrambe le diluizioni

Prima diluizione  $10^{-3}$

$$u^2(x_{-3}) = \frac{146^2 \cdot 12 \cdot (17 - 12) + 17 \cdot 12^2 \cdot 146}{17^3} = 333,0690$$

Seconda diluizione  $10^{-4}$

$$u^2(x_{-4}) = \frac{11^2 \cdot 8 \cdot (9 - 8) + 9 \cdot 8^2 \cdot 11}{9^3} = 10,0192$$

**La varianza della somma delle conte confermate** per entrambe le diluizioni considerate è data da

$$u^2(X) = 333,0690 + 10,0192 = 343,0882$$

$$u(X) = \sqrt{343,0882} = 18,5226$$

e l'incertezza tipo relativa

$$u(X)/X = \frac{18,5226}{112,9} = 0,164$$

### 6.4.3 Conferma specifica di ciascuna piastra Petri in un sistema rivelatore multiplo

Secondo tale approccio, si procede calcolando separatamente, per ciascuna piastra, la **varianza delle conte confermate**:

$$u^2(x_i) = \frac{z_1^2 k_1 (n_1 - k_1) + n_1 k_1^2 z_1}{n_1^3} \quad (32)$$

essendo

$z_1$  = numero delle colonie presunte positive

$k_1$  = numero delle colonie confermate

$n_1$  = numero delle colonie presunte positive, sottoposte a conferma

L'incertezza tipo relativa si calcolerà secondo la seguente relazione:

$$u(X)/X = \frac{\sqrt{\sum u^2(x_i)}}{X} \quad (33)$$

#### ESEMPIO 6.4.3

Tabella 6.4.3 - Conferma di conte microbiche per singola piastra Petri

| Piastre | Colonie Presunte positive<br>(z) | Colonie Sottoposte a conferma<br>(n) | Colonie Confermate<br>(k) | Coefficiente di conferma<br>( $\hat{p}$ ) | Conta confermata<br>(x) |
|---------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---|-------------------------|
| 1       | 66                               | 8                                    | 6                         | 0,750                                     | 49,5                    |
| 2       | 80                               | 9                                    | 6                         | 0,666                                     | 53,3                    |
| 3       | 7                                | 5                                    | 4                         | 0,800                                     | 5,6                     |
| 4       | 4                                | 4                                    | 4                         | 1,00                                      | 4,0                     |
|         |                                  |                                      |                           | <b>Totale</b>                             | <b>112,4</b>            |

Sostituendo i valori nella (32):

$$u^2(x_1) = \frac{66^2 \cdot 6 \cdot (8 - 6) + 8 \cdot 6^2 \cdot 66}{8^3} = 139,2188$$

$$u^2(x_2) = \frac{80^2 \cdot 6 \cdot (9 - 6) + 9 \cdot 6^2 \cdot 80}{9^3} = 193,5802$$

$$u^2(x_3) = \frac{7^2 \cdot 4 \cdot (5 - 4) + 5 \cdot 4^2 \cdot 7}{5^3} = 6,0480$$

$$u^2(x_4) = \frac{4^2 \cdot 4 \cdot (4 - 4) + 4 \cdot 4^2 \cdot 4}{4^3} = 4,0000$$

Si calcola la sommatoria delle varianze delle 4 piastre

$$u^2(X) = 342,8470$$

Incertezza tipo:  $u(X) = 18,5161$

Incertezza tipo relativa:

$$u(X)/X = \frac{18,5161}{112,4} = 0,165$$

## 6.5 INCERTEZZA DI LETTURA DELLE PIASTRE PETRI

Si tratta di una componente che non viene stimata contestualmente ad ogni prova eseguita.

Può essere più pratico valutare l'incertezza di lettura di un singolo operatore o fare delle stime in una prova intralaboratorio per esprimere l'incertezza media del laboratorio, da utilizzare successivamente nel calcolo dell'incertezza composta.

Questa seconda modalità può dare i maggiori vantaggi ad un laboratorio, in quanto permette di confrontare le prestazioni di ciascun operatore rispetto agli altri e rilevare l'eventuale bisogno di formazione ai fini di una valutazione omogenea delle conte all'interno del laboratorio.

Lo scarto tipo calcolato dai risultati di operatori diversi è, cioè, più informativo di quello calcolato da conte duplicate effettuate da uno stesso operatore: un operatore potrebbe, infatti, effettuare la duplice conta erroneamente, con considerevole precisione.

### 6.5.1 Incertezza di lettura di un singolo operatore

La stima dell'incertezza di lettura della conta delle colonie, effettuata da un operatore, può essere valutata, nella *routine*, ripetendo per due volte la conta in ciascuna piastra di Petri.

È preferibile lasciare intercorrere un certo tempo, ma non più di un'ora, tra la prima e la seconda lettura, variando in modo casuale l'ordine delle piastre sottoposte alla seconda lettura.

La varianza relativa dovuta alla lettura (*lett*) può essere stimata dalla ripetizione delle conte; essa è indipendente dal numero delle colonie presenti nella piastra e diventa abbastanza attendibile se vengono considerate almeno 30 conte.

#### Primo metodo: valori trasformati in logaritmo naturale

$$\left[ u_{(lett)/lett} \right]^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\ln z_1 - \ln z_2)^2}{2 \cdot n} \quad (34)$$

essendo

$z_1$  = conta delle colonie della prima lettura

$z_2$  = conta delle colonie della seconda lettura

$n$  = numero di piastre rilette

### ESEMPIO 6.5.1a

Tabella 6.5.1a - Conte trasformate in logaritmi naturali

| Piastre | $z_1$ | $z_2$ | $\ln z_1$ | $\ln z_2$     | $(\ln z_1 - \ln z_2)^2$ |
|---------|-------|-------|-----------|---------------|-------------------------|
| 1       | 343   | 337   | 5,84      | 5,82          | 0,00031                 |
| 2       | 40    | 39    | 3,69      | 3,66          | 0,00064                 |
| 3       | 57    | 62    | 4,04      | 4,13          | 0,00707                 |
| 4       | 399   | 397   | 5,99      | 5,98          | 0,00003                 |
| 5       | 112   | 130   | 4,72      | 4,87          | 0,02221                 |
| 6       | 349   | 325   | 5,86      | 5,78          | 0,00508                 |
|         |       |       |           | <b>Totale</b> | <b>0,03534</b>          |

Sostituendo i valori nella (34), la varianza relativa è data da:

$$\left[ u_{(lett.)}/lett. \right]^2 = \frac{0,03534}{2 \cdot 6} = 0,00295$$

### Secondo metodo: valori non trasformati in logaritmo

$$\left[ u_{(lett.)}/lett. \right]^2 = \frac{2}{n} \cdot \sum_1^n \left( \frac{z_1 - z_2}{z_1 + z_2} \right)^2 \quad (35)$$

essendo

- $z_1$  = conta delle colonie della prima lettura
- $z_2$  = conta delle colonie della seconda lettura
- $n$  = numero di piastre rilette

### ESEMPIO 6.5.1b

Tabella 6.5.1b - Conte non trasformate in logaritmi naturali

| Piastre | $z_1$ | $z_2$ | $z_1 - z_2$ | $z_1 + z_2$   | $[(z_1 - z_2)/(z_1 + z_2)]^2$ |
|---------|-------|-------|-------------|---------------|-------------------------------|
| 1       | 343   | 337   | 6           | 680           | 0,000078                      |
| 2       | 40    | 39    | 1           | 79            | 0,000160                      |
| 3       | 57    | 62    | -5          | 119           | 0,001765                      |
| 4       | 399   | 397   | 2           | 796           | 0,000006                      |
| 5       | 112   | 130   | -18         | 242           | 0,005532                      |
| 6       | 349   | 325   | 24          | 674           | 0,001268                      |
|         |       |       |             | <b>Totale</b> | <b>0,008810</b>               |

Sostituendo i valori nella (35):

$$\left[ u_{(lett.)}/lett. \right]^2 = \frac{2}{6} \cdot 0,008810 = 0,00294$$

### Terzo metodo: secondo UNI ISO ENV 13843 - Appendice B.2.2

$$[u_{(lett.)/lett.}]^2 = \frac{\sum_1^n \left( \frac{s(x_i)}{\bar{x}_i} \right)^2}{n} \quad (36)$$

$s(x)$  = scarto tipo delle conte duplicate sulla  $i$ -esima piastra

$\bar{x}$  = media delle conte duplicate sulla  $i$ -esima piastra

$n$  = numero di piastre sottoposte a conte ripetute

### ESEMPIO 6.5.1c

Tabella 6.5.1c - Conte elaborate secondo il metodo della UNI ENV ISO 13843

| Conta 1 | Conta 2 | Media | Scarto tipo | Scarto tipo relativo | Varianza relativa |
|---------|---------|-------|-------------|----------------------|-------------------|
| 343     | 337     | 340   | 4,24264     | 0,01248              | 0,00016           |
| 40      | 39      | 40    | 0,70711     | 0,01790              | 0,00032           |
| 57      | 62      | 60    | 3,53553     | 0,05942              | 0,00353           |
| 399     | 397     | 398   | 1,41421     | 0,00355              | 0,00001           |
| 112     | 130     | 121   | 12,72792    | 0,10519              | 0,01106           |
| 349     | 325     | 337   | 16,97056    | 0,05036              | 0,00254           |
|         |         |       |             | <b>Totale</b>        | <b>0,01762</b>    |

$$[u_{(lett.)/lett.}]^2 = \frac{0,01762}{6} = 0,00294$$

Applicando ai dati delle precedenti conte, trasformati nei rispettivi valori logaritmici (ln) (tab. 6.5.1d), l'analisi della varianza ad una via [13], si ottiene la stessa varianza relativa ottenuta dai precedenti esempi, elaborati sulla base dei dati in scala aritmetica.

Tabella 6.5.1d - Dati sottoposti ad analisi della varianza

| Piastre  | lnz <sub>1</sub> | lnz <sub>2</sub> |
|----------|------------------|------------------|
| <b>1</b> | 5,84             | 5,82             |
| <b>2</b> | 3,69             | 3,66             |
| <b>3</b> | 4,04             | 4,13             |
| <b>4</b> | 5,99             | 5,98             |
| <b>5</b> | 4,72             | 4,87             |
| <b>6</b> | 5,86             | 5,78             |

In tabella 6.5.1e, si riporta il *report* dell'ANOVA ottenuta per mezzo del programma Excel.

Tabella 6.5.1e - Risultati dell'analisi della varianza

| Origine della variazione | SQ       | gdl | MQ             |
|--------------------------|----------|-----|----------------|
| Tra gruppi               | 9,915982 | 5   | 1,983196       |
| Entro gruppi             | 0,017668 | 6   | <b>0,00295</b> |

dove:

SQ = somma dei Quadrati degli scarti (Devianza)

MQ = varianza

gdl = gradi di libertà

### 6.5.2 Incertezza di lettura di conte multiple

La varianza relativa dovuta alla lettura delle piastre ( $L$ ), in un sistema rivelatore multiplo, può essere stimata dalla somma delle conte ripetute mediante la formula

$$\left[ \frac{u(L)}{L} \right]^2 = \frac{\sum_1^n (\ln z_1 - \ln z_2)^2}{2 \cdot n} \cdot \frac{\sum z_i^2}{(\sum z_i)^2} \quad (37)$$

essendo

$z_i$  = conta delle colonie della  $i$ -esima piastra

#### ESEMPIO 6.5.2

Nella tabella che segue, utilizzando dati sperimentali di una conta multipla ottenuta da una prova microbiologica quantitativa, viene calcolato il valore di parte della formula applicabile per la valutazione della varianza relativa di lettura ( $L$ ).

Tabella 6.5.2 - Calcolo del valore del numeratore della prima frazione della formula (37)

| Piastre       | $z_1$ | $z_2$ | $\ln z_1$ | $\ln z_2$ | $(\ln z_1 - \ln z_2)^2$ |
|---------------|-------|-------|-----------|-----------|-------------------------|
| 1             | 250   | 254   | 5,52      | 5,54      | 0,00025                 |
| 2             | 220   | 218   | 5,39      | 5,38      | 0,00008                 |
| 3             | 26    | 23    | 3,26      | 3,14      | 0,01503                 |
| 4             | 28    | 30    | 3,33      | 3,40      | 0,00476                 |
| <b>Totale</b> |       |       |           |           | <b>0,02013</b>          |

Di seguito, utilizzando sempre i dati delle conte di  $z_1$  e  $z_2$  presentati in tabella 6.5.2, viene calcolato il valore della seconda frazione della formula (37):

$$\frac{\sum z_i^2}{(\sum z_i)^2} = \frac{250^2 + 254^2 + \dots + 28^2 + 30^2}{(250 + 254 + \dots + 28 + 30)^2} = 0,20522$$

Sostituendo i valori ottenuti nella (37), la varianza relativa di lettura delle piastre, in un sistema rivelatore multiplo, è data da:

$$\left[ \frac{u(L)}{L} \right]^2 = \frac{0,02013}{2 \cdot 4} \cdot 0,20522 = 0,00052$$

### 6.5.3 Incertezza di lettura specifica del laboratorio

La varianza relativa dovuta alla lettura di più piastre da parte di più analisti, può essere stimata mediante la formula

$$\left[ \frac{u(\text{lett.})}{\text{lett.}} \right]^2 = \frac{\sum_{p=1}^n \left( \frac{s(x_p)}{\bar{x}_p} \right)^2}{n} \quad (38)$$

essendo

$s(x)$  = scarto tipo delle conte di diversi analisti sulla  $p$ -esima piastra

$\bar{x}$  = media delle conte di diversi analisti sulla  $p$ -esima piastra

$n$  = numero di piastre sottoposte a conte ripetute

### ESEMPIO 6.5.3

Tabella 6.5.3a - Conte eseguite da tecnici diversi sulle stesse piastre

| Piastra | Tecnico A | Tecnico B | Tecnico C | Tecnico D | Tecnico E | Media | RSD    |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|--------|
| 1       | 33        | 26        | 33        | 34        | 33        | 31,8  | 0,1029 |
| 2       | 160       | 156       | 166       | 176       | 174       | 166,4 | 0,0520 |
| 3       | 142       | 128       | 142       | 146       | 139       | 139,4 | 0,0491 |
| 4       | 78        | 97        | 81        | 81        | 83        | 84,0  | 0,0891 |
| 5       | 89        | 94        | 81        | 94        | 92        | 90,0  | 0,0603 |
| 6       | 38        | 44        | 38        | 42        | 40        | 40,4  | 0,0645 |

da cui si può ricavare la varianza di lettura del laboratorio:

$$[u(\text{lett.})/\text{lett.}]^2 = \frac{0,1029^2 + 0,0520^2 + 0,0491^2 + 0,0891^2 + 0,0603^2 + 0,0645^2}{6} = 0,00524$$

Applicando agli stessi dati, trasformati nei rispettivi valori logaritmici naturali, l'analisi della varianza ad una via [13], si ottiene, con qualche approssimazione, la stessa varianza relativa ottenuta dal precedente esempio, elaborato sulla base dei dati in scala aritmetica.

Tabella 6.5.3b - Conte della tabella 6.5.3a, trasformate in logaritmi naturali

| Piastra | Tecnico A | Tecnico B | Tecnico C | Tecnico D | Tecnico E |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1       | 3,50      | 3,26      | 3,50      | 3,53      | 3,50      |
| 2       | 5,08      | 5,05      | 5,11      | 5,17      | 5,16      |
| 3       | 4,96      | 4,85      | 4,96      | 4,98      | 4,93      |
| 4       | 4,36      | 4,57      | 4,39      | 4,39      | 4,42      |
| 5       | 4,49      | 4,54      | 4,39      | 4,54      | 4,52      |
| 6       | 3,64      | 3,78      | 3,64      | 3,74      | 3,69      |

In tabella 6.5.3c si riporta il *report* dell'ANOVA ottenuta per mezzo del programma Excel.

Tabella 6.5.3c - Risultati dell'analisi della varianza

| Origine della variazione | SQ       | gdl | MQ              |
|--------------------------|----------|-----|-----------------|
| Tra gruppi               | 10,90968 | 5   | 2,181935        |
| Entro gruppi             | 0,130784 | 24  | <b>0,005449</b> |

dove:

SQ = Somma dei Quadrati degli scarti (Devianza)

MQ = Varianza

gdl = gradi di libertà

Nel caso siano elaborati con la stessa formula i dati di lettura delle medesime piastre da parte di operatori di laboratori diversi, appositamente riuniti per confrontare le proprie prestazioni di lettura delle piastre, vengono ottenute informazioni sulla riproducibilità di conta delle colonie.

## 7 CALCOLO DELL'INCERTEZZA TIPO COMPOSTA

Dopo aver effettuato la valutazione delle singole componenti, si procede alla somma di tutti i contributi dell'incertezza, espressi come varianze relative, come sintetizzato in tabella 7a.

*Tabella 7a - Contributi all'incertezza di misura nelle prove microbiologiche e riferimento ai paragrafi in cui sono trattati ed alle formule di calcolo usate per il calcolo*

| <b>Contributi</b>                                     | <b>Paragrafo</b> | <b>Formula</b>        |
|---|------------------|-----------------------|
| varianza relativa data dalla distribuzione di Poisson | 6.1              | n. 9                  |
| varianza relativa del fattore di diluizione totale    | 6.2              | n.15                  |
| varianza relativa del volume totale inoculato         | 6.3              | n. 20                 |
| varianza relativa di lettura                          | 6.5              | n. 34, 35, 36, 37, 38 |

L'incertezza composta relativa del risultato della prova è data dalla radice quadrata della somma delle varianze relative delle singole componenti considerate:

$$u(y)/y = \sqrt{[u(Z)/Z]^2 + [u(V)/V]^2 + [u(F)/F]^2 + [u(L)/L]^2} \quad (39)$$

L'incertezza composta relativa può essere espressa in %, come coefficiente di variazione (CV).

L'incertezza di conferma non è stata inserita nella formula (39), in quanto non sempre questo contributo è da prendere in considerazione.

Qualora il metodo preveda la fase di conferma, il suo contributo deve essere sommato, come varianza relativa, a quelli già considerati in tabella 7a, avendo l'avvertenza di sottrarre l'incertezza dovuta alla distribuzione di Poisson, già compresa nel contributo dato dall'incertezza di conferma.

*Tabella 7b - Contributo dell'incertezza di conferma nelle prove microbiologiche e riferimento alle formule di calcolo usate nella Guida*

| <b>Contributi</b>             | <b>Paragrafo</b> | <b>Formula</b> |
|-------------------------------|------------------|----------------|
| varianza relativa di conferma | 6.4              | n. 28, 31      |

Per una migliore comprensione dell'argomento, a scopo riepilogativo, si riportano in tabella 7c le componenti di incertezza e le fasi analitiche in cui ciascuna di esse può entrare come contributo all'incertezza composta della prova.

Tabella 7c - Significato delle diverse componenti d'incertezza

| <b>Componenti incertezza</b>       | <b>Quando contribuiscono all'incertezza?</b>   |
|------------------------------------|--|
| Distribuzione di Poisson: $u(Z)/Z$ | Comune a tutti i conteggi (di facile calcolo, è inversamente proporzionale al numero di colonie contate)   |
| Volume totale inoculato: $u(V)/V$  | Comune a tutti i conteggi (legata alla ripetibilità di dosaggio degli inoculi). È richiesta una valutazione sperimentale della ripetibilità del dosaggio con le pipette  |
| Fattore di diluizione: $u(F)/F$    | In presenza di diluizioni (legata alla numerosità delle diluizioni allestite e alla ripetibilità di dosaggio dei volumi del diluente). È richiesta una valutazione sperimentale della ripetibilità del dosaggio del diluente |
| Lettura piastre: $u(L)/L$          | Comune a tutti i conteggi, richiede una preliminare valutazione della ripetibilità dei conteggi da parte degli operatori   |
| Conferma colonie: $u(p)/p$         | Solo se richiesta la conferma delle colonie. In tale caso comprende e quindi sostituisce $u(Z)/Z$ (distribuzione di Poisson)   |

A conclusione del percorso di calcolo, l'incertezza composta relativa, espressa in percentuale, ricavata dalla formula (39) secondo i criteri riepilogati in tabella 7c, viene moltiplicata per il risultato della prova per ricavare l'incertezza tipo composta  $u_c$ .

#### ESEMPIO 7a

In tabella 7d si riporta una sintesi di calcolo dell'incertezza sulla base di dati reali ottenuti da prove di routine eseguite in un laboratorio di riferimento accreditato

Tabella 7d - Applicazione del metodo di calcolo dell'incertezza di misura in una prova microbiologica effettuata con metodo normato

| Carica microbica mesofila in latte crudo<br>(su mezzo di coltura Plate Count Agar) | Diluizione $10^{-5}$  |     | Diluizione $10^{-6}$                     |    |
|--|---|-----|--|----|
|  | 224   | 260 | 25                                       | 35 |
| <b>CALCOLO DELLE COMPONENTI DI INCERTEZZA</b>                                      | <b>Incertezza tipo relativa <math>u</math></b>                  |     | <b>Peso %</b>                            |    |
| a) Fattore di diluizione   | 0,022   |     | 18,8 %                                   |    |
| b) Volume totale inoculato   | 0,005   |     | 4,3 %                                    |    |
| c) Distribuzione di Poisson delle cellule microbiche                               | 0,0429  |     | 36,6 %                                   |    |
| d) Ripetibilità di lettura delle piastre   | 0,0472  |     | 40,3 %                                   |    |
| <b>INCERTEZZA TIPO RELATIVA COMPOSTA (<math>u(y)/y</math>)</b>                     | <b>0,0676</b>   |     | <b>6,8 %</b>                             |    |
|  | <b>Incertezza tipo composta della misura (<math>u_c</math>)</b> |     | <b>Incertezza estesa <math>U</math></b>  |    |
| <b>Risultato della prova</b>   | <b><math>2,5 \times 10^7</math></b>                             |     | <b><math>\pm 0,34 \times 10^7</math></b> |    |

# 8 CALCOLO SEMPLIFICATO DELL'INCERTEZZA DI MISURA

Secondo quanto riportato da Niemelä [8], un metodo che non richieda il calcolo delle singole componenti di incertezza, ma che comunque tenga conto delle componenti date dalla distribuzione di Poisson, dall'incertezza dei volumi e dall'incertezza di lettura delle piastre, è quello che fa ricorso al calcolo del parametro  $G^2$  (*log likelihood ratio*), riferito anche come test G [12]. Tale parametro, definito come “logaritmo del rapporto di verosimiglianza della proporzionalità (linearità) delle conte” [4] o, con termine meno tecnico, “log del rapporto di probabilità” [12], esprime il grado di proporzionalità dei conteggi in un sistema rivelatore multiplo.

Come valore guida cui fare riferimento per dare un giudizio di proporzionalità, il parametro  $G^2$  deve essere confrontato con i valori delle tavole del  $\chi^2$  per  $n-1$  gradi di libertà. I valori eccedenti il valore tabulato indicano una divergenza dalla proporzionalità al livello di probabilità prescelto. In altri termini: il valore assunto da  $G^2$  permette di valutare se l'operatore abbia lavorato in maniera accettabile e se i conteggi ottenuti alle distinte diluizioni siano da considerarsi congruenti tra loro. Il risultato che si ottiene è di solito sovrapponibile a quello che si ottiene con l'indice di dispersione di Poisson ( $X^2$ ).

Il parametro  $G^2$  si calcola con la formula

$$G_{n-1}^2 = 2 \cdot \left[ \sum_{i=1}^n z_i \cdot \ln\left(\frac{z_i}{v_i}\right) - Z \cdot \ln\left(\frac{Z}{V}\right) \right] \quad (40)$$

dove:

$z_i$  = conta delle colonie nella  $i$ -esima piastra di Petri

$v_i$  = volume di sospensione distribuita nella  $i$ -esima piastra (in ml)

$n$  = numero di piastre

$Z$  = somma di tutte le conte  $i$ -esime

$V$  = somma dei volumi delle  $i$ -esime sospensioni

L'incertezza relativa composta, per il cui calcolo si fa ricorso al valore di  $G^2$ , si ricava dall'equazione

$$u(y)/y = \sqrt{[u(\bar{x})/\bar{x}]^2 + [u(F)/F]^2} \quad (41)$$

in cui:

$$[u(\bar{x})/\bar{x}]^2 = \frac{G_{n-1}^2}{n-1} \cdot \frac{1}{Z} \quad (42)$$

dove:

$Z$  = somma di tutte le conte

$n$  = numero totale delle piastre sottoposte a conta

$G^2$  = stima del logaritmo del rapporto di verosimiglianza della linearità delle conte (proporzionalità dei conteggi)

Il rapporto  $G^2/n-1$ , presente nella (42), già noto anche come rapporto di Lexis [4], dà informazioni sul grado di variabilità delle conte sottoposte a valutazione, secondo le categorie [8] riportate in tabella 8a.

Tabella 8a - Significato del rapporto  $G^2 / n-1$

| CATEGORIE | $G^2 / n-1$ | Valutazione   |
|-----------|-------------|---|
|           | $\leq 1,0$  | Valore atteso nella classica distribuzione di Poisson                               |
|           | $> 1,0$     | Presenza di variabilità non imputabile alla sola distribuzione di Poisson           |
|           | $> 5,0$     | Presenza di problemi analitici. In questo caso i dati dovrebbero essere riesaminati |

### ESEMPIO 8

Tabella 8b - Conte in un sistema rivelatore multiplo elaborate per il calcolo del logaritmo del rapporto di verosimiglianza della proporzionalità (linearità) delle conte

| Diluizione    | Volume della diluizione $v_i$ | Conta delle colonie $z_i$ | Totale conta | $z_i \ln(z_i/v_i)$ |
|---------------|-------------------------------|---------------------------|--------------|--------------------|
| $10^{-5}$     | 1                             | 224                       | <b>484</b>   | 1212,2090          |
|               | 1                             | 260                       |              | 1445,7770          |
| $10^{-6}$     | 0,1                           | 25                        | <b>60</b>    | 138,0365           |
|               | 0,1                           | 35                        |              | 205,0277           |
| <b>Totale</b> | <b>2,2</b>                    | gdl = 3                   | <b>544</b>   | <b>3001,0500</b>   |

Per ottenere una stima dell'incertezza relativa che include tutte le componenti casuali che influenzano le conte nel sistema rivelatore multiplo viene dapprima calcolato tramite la (40), il logaritmo del rapporto di verosimiglianza:

$$G_{n-1}^2 = 2 \cdot \left[ 3001,05 - 544 \cdot \ln\left(\frac{544}{2,2}\right) \right] = 6,685074$$

Dividendo  $G^2$  per i propri gradi di libertà, si stima il grado di variabilità delle conte:

$$\frac{G_{n-1}^2}{n-1} = \frac{6,685074}{4-1}$$

da cui si ottiene:  $\frac{G_{n-1}^2}{n-1} = 2,23$

il cui valore, calcolato nell'esempio, indica la presenza di variabilità non imputabile alla sola distribuzione di Poisson.

La varianza relativa della conta viene calcolata applicando la formula (42):

$$\left[ \frac{u(\bar{x})}{\bar{x}} \right]^2 = \frac{6,685074}{4-1} \cdot \frac{1}{544} = 0,004096$$

Utilizzando il dato per risolvere la (41) e sfruttando il dato dell'incertezza del fattore di diluizione dalla tabella 7d, si può ricavare l'incertezza composta relativa del conteggio:

$$u(y)/y = \sqrt{0,004096 + [0,0022]^2} = 0,064038 \text{ (6,4\%)}$$

Posto il risultato pari a  $2,5 \times 10^7$ , si calcola l'incertezza tipo composta, moltiplicando il conteggio per l'incertezza relativa composta, calcolata nell'esempio,  $u(y)/y = 0,064038$ .

Nella tabella 8c si riportano a titolo di confronto gli intervalli di incertezza ottenuti, dopo il calcolo dell'incertezza estesa, con l'approccio metrologico descritto al capitolo 6 e con il metodo di calcolo semplificato, entrambi confrontati all'intervallo di fiducia ottenuto applicando la metodologia proposta dalla ISO 7218.

Tabella 8c - Confronto degli intervalli dell'incertezza ottenuti applicando i diversi approcci di calcolo presentati nella presente Guida

| <b>Risultato<br/>2,5 x 10<sup>7</sup> UFC</b> | <b>Incetezza<br/>tipo composta</b> | <b>Incetezza<br/>estesa (k = 2)</b> | <b>Limite<br/>inferiore</b> | <b>Limite<br/>superiore</b> |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Metodo metrologico                            | 0,17 x 10 <sup>7</sup>             | ± 0,34 x 10 <sup>7</sup>            | 2,2 x 10 <sup>7</sup>       | 2,8 x 10 <sup>7</sup>       |
| Metodo semplificato                           | 0,16 x 10 <sup>7</sup>             | ± 0,32 x 10 <sup>7</sup>            | 2,2 x 10 <sup>7</sup>       | 2,8 x 10 <sup>7</sup>       |
| ISO 7218                                      | /                                  | /                                   | 2,3 x 10 <sup>7</sup>       | 2,7 x 10 <sup>7</sup>       |

Il metodo semplificato proposto ha, da un lato il vantaggio di una maggiore semplicità di calcolo rispetto al metodo metrologico e dall'altro, a differenza del metodo della ISO 7218, permette di calcolare un intervallo d'incertezza che varia la propria ampiezza in funzione del grado di omogeneità delle conte.

Nella tabella 8d si sono ipotizzate combinazioni di conte che, pur dando tutte lo stesso risultato, presentano gradi diversi di omogeneità. Come si può rilevare, i valori dell'incertezza estesa (k=2) variano significativamente nei diversi casi, in linea con il rapporto

$$\frac{G_{n-1}^2}{n-1}$$

Tabella 8d - Diverse combinazioni di conta di colonie aventi il medesimo conteggio microbico per unità di campione

| <b>Diluizioni</b>      |                        |                        |                        | <b>Risultato<br/>(UFC)</b> | $\frac{G_{n-1}^2}{n-1}$ | <b>Incetezza<br/>estesa U</b> | <b>Limite<br/>inferiore</b> | <b>Limite<br/>superiore</b> |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>10<sup>-5</sup></b> | <b>10<sup>-5</sup></b> | <b>10<sup>-6</sup></b> | <b>10<sup>-6</sup></b> |                            |                         |                               |                             |                             |
| 249                    | 248                    | 23                     | 24                     | 2,5 x 10 <sup>7</sup>      | 0,05                    | ± 510.000                     | 2,4 x 10 <sup>7</sup>       | 2,6 x 10 <sup>7</sup>       |
| 240                    | 244                    | 33                     | 27                     | 2,5 x 10 <sup>7</sup>      | 0,99                    | ± 2.100.000                   | 2,3 x 10 <sup>7</sup>       | 2,7 x 10 <sup>7</sup>       |
| 204                    | 280                    | 28                     | 32                     | 2,5 x 10 <sup>7</sup>      | 4,86                    | ± 4.700.000                   | 2,0 x 10 <sup>7</sup>       | 3,0 x 10 <sup>7</sup>       |
| 184                    | 300                    | 22                     | 38                     | 2,5 x 10 <sup>7</sup>      | 11,57                   | ± 7.300.000                   | 1,8 x 10 <sup>7</sup>       | 3,2 x 10 <sup>7</sup>       |

Applicando invece la formula di calcolo dell'intervallo di fiducia proposta nella ISO 7218 si ottengono, in tutti i casi presentati, anche nei casi di non omogeneità delle conte ( $G^2/n-1 > 5$ ), gli stessi limiti: 2,3 x 10<sup>7</sup> come limite inferiore e 2,7 x 10<sup>7</sup> come limite superiore.

I dati dimostrano la grande efficacia del metodo semplificato di calcolo dell'incertezza che, a differenza del metodo proposto dalla ISO 7218, esprime valori di incertezza con ampiezza che è funzione della qualità della prestazione analitica che ha prodotto il risultato.

# 9 REGOLE PER L'ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA DI MISURA

Quando l'incertezza di misura è espressa come incertezza tipo composta  $u_c$ , viene raccomandata la forma per cui il risultato è da esprimere come  $Y = X$  (per unità) e incertezza tipo composta  $u_c$  (per unità). L'unità di misura nelle determinazioni microbiologiche, è solitamente grammo (g) o millilitro(ml).

**AVVERTENZA:** il valore dell'incertezza composta non deve essere preceduto dal segno  $\pm$ , da anteporre solo all'incertezza estesa

Se il risultato viene espresso come incertezza estesa  $Y = X \pm U$  è necessario indicare il livello di probabilità considerato (di norma al 95%), che corrisponde ad un fattore di copertura  $k = 2$

L'incertezza estesa sarà data da  $U = k u_c$

## 9.1 NUMERI SIGNIFICATIVI E ARROTONDAMENTO

Il risultato finale e l'incertezza associata sono, di norma, espressi da 2 cifre significative, mentre le misure intermedie e i valori osservati dovrebbero essere inseriti nei calcoli con tutte le cifre decimali osservate originariamente.

In alcune norme generali guida [3, 11], viene indicato di tenere preferibilmente, come risultato, un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per la potenza appropriata di 10 o un numero intero con 2 cifre significative, come evidenziato al successivo paragrafo 9.2.

Nell'esprimere il risultato finale, si deve inoltre tenere conto delle regole di arrotondamento, come descritte anche in Amd 1 della ISO 7218:

- se la terza cifra è  $\geq 5$ , quella precedente deve essere aumentata di una unità;
- se la terza cifra è  $< 5$ , quella precedente resta invariata.

Le regole di arrotondamento vanno analogamente applicate anche al dato di incertezza che si associa al risultato. Il risultato e l'incertezza, se espressi in forma scientifica, devono essere moltiplicati per la stessa potenza in base 10.

## 9.2 ELEVATE CONCENTRAZIONI E VALORE DI INCERTEZZA

Il contenuto microbico di un campione potrebbe essere di milioni o centinaia di milioni per grammo. Il risultato della prova viene, pertanto, usualmente espresso in microbiologia, nella forma:

$$Y = X \cdot 10^k \quad (43)$$

in cui sovente:

$X$  è un numero decimale, con 2 cifre significative

$k$  un numero intero

Esempio: un risultato  $Y$  pari a  $17.524.328 \text{ g}^{-1}$  può essere espresso come

$Y = 18.000.000 \text{ g}^{-1}$  con una incertezza estesa associata  $U = \pm 350.000 \text{ g}^{-1}$   
oppure

$Y = 1,8 \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}$  con una incertezza estesa associata  $U = \pm 0,35 \cdot 10^7 \text{ g}^{-1}$

### 9.3 INCERTEZZA DI MISURA ASIMMETRICA

L'applicazione della formula (3) proposta nella ISO 7218 porta al calcolo di un intervallo di fiducia asimmetrico, che non può essere rappresentato dalla forma  $\pm U$ , illustrata al capitolo 9. In questo caso è necessario esprimere il dato come limite inferiore e limite superiore dell'intervallo di fiducia al livello di probabilità ( $p$ ) del 95%.

Esempio, che riprende i dati del paragrafo 5.2.1.2

$Y = 190.000$

limite inferiore 170.000;

limite superiore 210.000

$p = 0,95$

## 10 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

A conclusione del lavoro presentato in questo documento Guida, gli Autori vogliono sottolineare che la trattazione ha principalmente avuto lo scopo di raccogliere quanto proposto in diverse norme, specificamente applicabili al settore microbiologico, dando particolare rilievo a quanto descritto in un documento, di cui riconoscono l'elevata valenza, che presenta per la prima volta un approccio metrologico, applicabile ad uno specifico processo di prova del campo biologico.

Per rendere di più semplice comprensione quest'ultimo approccio e volendo sperimentare "in prima persona" quanto si andava a descrivere nei singoli capitoli, sono state effettuate prove sperimentali di cui si dà evidenza, negli esempi, con i dati ottenuti in un laboratorio accreditato, ad alta specializzazione nel campo della microbiologia applicata alle matrici alimentari.

Gli Autori, consapevoli che la Guida in certi passaggi presenta una trattazione concisa non descrivendo nei dettagli alcuni approcci statistici, per i quali si rimanda ai testi del capitolo 11, auspicano comunque di aver centrato quello che era il loro primo l'obiettivo: fornire ai laboratori uno strumento di supporto alle attività analitiche al fine di produrre dati validi e confrontabili.

## 11 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- [1] UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura
- [2] Guida SINAL DT-0002 Rev.1. Guida per la valutazione e la espressione dell'incertezza nelle misurazioni
- [3] ISO 7218:1996/Amd 1:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination
- [4] UNI ENV ISO 13843:2003. Qualità dell'acqua - Guida per la validazione di metodi microbiologici
- [5] UNI CEI ENV 13005:2000. Guida all'espressione dell'incertezza di misura
- [6] International Vocabulary of basic and general terms in Metrology (V.I.M.)
- [7] UNI 4546:1984. Misure e misurazioni - Termini e definizioni fondamentali
- [8] MIKES - Centre for Metrology and Accreditation (Helsinki 2003). Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Seppo I. Niemelä. Publication J4/2003
- [9] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed 1992. APHA, AWWA, WEF
- [10] UNI 10674:2002. Acque destinate al consumo umano - Guida generale per determinazioni microbiologiche
- [11] AFNOR XP V 08-102 December 1998. Microbiologie des aliments - Règles générales pour le comptage des colonies et pour l'expression des résultats - cas des dénombrements sur milieu solide
- [12] Soliani L. (2004). Manuale di statistica per la ricerca e la professione. Statistica univariata e bivariata parametrica e non-parametrica nelle discipline ambientali e biologiche.
- [13] Rogantin M. P. (2003). Introduzione alla Statistica con esempi sviluppati con il software Minitab. Edizioni C.L.U.T. - Torino
- [14] Bacteriological Analytical Manual Online, January 2001, Appendix 2, Most Probable Number from Serial Dilutions, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition.

Molto si è lavorato nei laboratori microbiologici per migliorare la qualità delle proprie misure, pur mancando talvolta la consapevolezza, basata su dati oggettivi, della relazione esistente tra le singole fasi di una procedura di prova e la qualità della prestazione analitica. Ottenere dati validi è di capitale importanza, in quanto ogni misurazione viene eseguita per ricavare un dato che non può che essere una stima dei possibili valori attribuibili al misurando. È necessario pertanto, soprattutto nei casi in cui si debbano prendere delle decisioni come in ambito salute e sicurezza, esprimere la misura ottenuta dal processo di prova, associata alla sua incertezza. Sebbene agli “addetti ai lavori” il concetto di incertezza fosse noto, nella sua applicazione rigorosa, a partire dalla pubblicazione nel 1993 della “*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*”, mancava, per le prove microbiologiche, un documento che raccogliesse e presentasse i diversi approcci di calcolo dell’incertezza di misura descritti in vari documenti e norme. La presente Guida, che affronta l’argomento con una snella trattazione, accompagnata puntualmente da esempi applicativi, vuole essere un riferimento per i numerosi laboratori biologici che, per i requisiti richiesti dall’accreditamento o per esigenze di mercato, si trovano a dover soddisfare concretamente la richiesta di produrre dati confrontabili e riferibili a specifiche e limiti cogenti.

