

Eurachem - Accreditation for Microbiological Laboratories *Third Edition 2023*

Incerteza di misura e di campionamento (*matrici acqua e alimenti*)

Dr.ssa Anna Moschin

5 dicembre 2023



1

Linea guida EURACHEM AML 2023

DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

- ISO 8199:2018 Water quality – General requirements and guidance for microbiological examinations by culture
- ISO 29201:2012 Water quality - The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods
- **ISO 7218:2007** Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
- **ISO 7218:2007/Amd.1:2013** Microbiology of food and animal feeding stuffs General requirements and guidance for microbiological examinations
- ISO 19036:2019 Microbiology of the food chain - Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
- **Eurachem 2023** Accreditation for Microbiological Laboratories (Third Edition)



2

Linea guida EURACHEM AML 2023

La terza edizione della Linea Guida Eurachem “Accreditamento per i laboratori microbiologici” è stata pubblicata a maggio 2023 è una revisione della seconda edizione del 2013.

La guida si concentra sui requisiti della norma ISO 17025, nella versione del 2017, costituendo quindi un utile supporto per l’accreditamento dei laboratori di microbiologia.

La guida fornisce informazioni utili per i laboratori che vogliono implementare un sistema di gestione della qualità anche senza il riconoscimento formale dell’accreditamento.

I principali cambiamenti della terza edizione sono:



3

Linea guida EURACHEM AML 2023

- aggiornamento delle tecniche di indagine per le prove microbiologiche, ad es. tecniche di biologia molecolare (PCR) per il rilevamento di microrganismi;
- aggiunta di una sezione con simboli e abbreviazioni utilizzati nella nuova linea guida;
- aggiunta del *Capitolo 3* per l’analisi del rischio come approccio da seguire per correlare la probabilità di un rischio e il suo impatto sulla validità dei risultati prodotti;
- aggiornamento del *Capitolo 10* relativo alla verifica e alla validazione dei metodi di prova per inserimento delle nuove norme ISO specifiche (p.e. ISO 13843:2017, ISO 16140-3:2021, etc.);



4

Linea guida EURACHEM AML 2023

- utilizzo della regola decisionale nella dichiarazione di conformità;
- aggiornamento dell'Allegato A relativamente alla terminologia da utilizzare per le prove microbiologiche;
- aggiornamento dell'ordine dei capitoli della linea guida in conformità con i capitoli della norma ISO/IEC 17025;
- **inserimento del nuovo Allegato C per il calcolo degli intervalli di confidenza da associare ai risultati delle prove microbiologiche;**
- **inserimento del nuovo Allegato D per il calcolo dell'incertezza dal campionamento.**

NEW

unicim

5

Linea guida EURACHEM AML 2023

Matrice acqua

ISO 8199:2018 e ISO 29201:2012

ISO 8199:2018 ... Incertezza dei risultati

Si rimanda alla norma **ISO 29201** per indicazioni sulla stima e l'espressione dell'incertezza di misura dei risultati dei metodi microbiologici quantitativi.

unicim

6

ISO 29201:2012

La norma è una linea guida per la valutazione dell'incertezza di misura nella microbiologia quantitativa basata sul conteggio di microrganismi. E' applicabile alla matrice acqua (*ma anche ad altre matrici...*) per **metodi quantitativi** (*metodi di conta e metodi MPN*).

Nella ISO 29201:2012 sono descritti due approcci per il calcolo dell'incertezza di misura:

- **APPROCCIO PER COMPONENTI (bottom-up o step-by-step)**
- **APPROCCIO GLOBALE MODIFICATO (top-down o black-box)**

Lo scopo è quello di valutare la variabilità operativa intralaboratorio e l'incertezza composta del risultato finale.

Non sono compresi nello scopo della norma: il calcolo del **contributo dovuto alla varianza di campionamento**, l'utilizzo della riproducibilità interlaboratorio (s_R) dei proficiency tests per la stima dell'incertezza di misura.



7

ISO 29201:2012

Per determinare l'incertezza estesa di misura (U), è necessario calcolare la variabilità o **varianza intrinseca relativa di distribuzione** $u_{d,rel}^2$ e la variabilità o **varianza operativa relativa** $u_{o,rel}^2$.

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

Entrambe le varianze servono per il calcolo della **incertezza composta relativa di misura** $u_{c,rel}$, la cui equazione si applica ad entrambi gli approcci di stima dell'incertezza di misura.



8

ISO 29201:2012

- La **varianza intrinseca di distribuzione** relativa $u^2_{d,rel}$ è la variabilità intrinseca che è associata alla distribuzione delle particelle nella sospensione finale (**distribuzione di Poisson**).

Se viene effettuata la conferma parziale di colonie presunte positive e nei metodi MPN, la variabilità intrinseca aumenta considerevolmente e non segue più la distribuzione di Poisson.

- La **varianza operativa** relativa $u^2_{o,rel}$ è la combinazione di tutte le incertezze associate alle **fasi tecniche della procedura analitica**.

E' la somma delle incertezze legate al sottocampionamento, alla miscelazione, alla diluizione del campione, agli effetti dell'incubazione e all'incertezza di conteggio.



9

ISO 29201:2012

Alcune considerazioni sui metodi microbiologici

In generale i **metodi microbiologici quantitativi** si basano su una procedura analitica che prevede la preparazione della sospensione iniziale mediante l'omogeneizzazione di una porzione del campione in un diluente idoneo e le successive diluizioni fino ad arrivare alla sospensione finale.

Per la **matrice acqua** il campione è la sospensione iniziale e, se non sono necessarie ulteriori diluizioni, il campione è anche la sospensione finale.

In generale, la **procedura analitica** consiste di 6 passaggi successivi:

1. sottocampionamento e preparazione della sospensione iniziale
2. diluizione
3. semina in terreno di coltura
4. incubazione a temperature idonee
5. conteggio
6. conferma delle colonie presunte positive



10

ISO 29201:2012

La valutazione della **variabilità operativa** consiste perciò nello stimare gli effetti dei passaggi sopra descritti.

- L'**approccio per componenti** prende in considerazione singolarmente tutti questi contributi che, sommati all'incertezza dovuta alla distribuzione casuale dei microrganismi nel campione (variabilità intrinseca), permette di calcolare l'incertezza del risultato finale.
- Nell'**approccio globale** l'incertezza operativa e l'incertezza di distribuzione (variabilità intrinseca) sono stimati insieme.



11

ISO 29201:2012

La norma prevede il calcolo della **variabilità intrinseca o incertezza relativa di distribuzione** (valido per entrambi gli *approcci globale e per componenti*) nei seguenti allegati:

- **ANNEX C** Calcolo della variabilità intrinseca per conta in piastra (su piastra singola o su più piastre)
- **ANNEX D** Calcolo della variabilità intrinseca per metodi MPN
- **ANNEX E** Calcolo della variabilità intrinseca **per conte confermate**



12

ISO 29201:2012

Incertezza relativa di distribuzione di una singola conta (singola piastra)

La **varianza relativa** è **inversamente proporzionale** al numero di colonie contate su una singola piastra:

$$u_{d,rel}^2 = \frac{1}{n_c}$$

dove n_c è la singola conta cioè il numero di colonie osservate su di una singola piastra.

In scala logaritmica decimale, diventa:

$$u_{d(lg)}^2 = 0,1886 \times u_{d,rel}^2 = \frac{0,1886}{n_c}$$



13

ISO 29201:2012

Incertezza relativa di distribuzione di una somma di conte (p.e. piastre parallele)

Si applica al caso in cui più porzioni di campione sottoposte a prova provengono dalla stessa sospensione finale (è il caso ad esempio di piastre parallele).

La **variabilità intrinseca di distribuzione** è **inversamente proporzionale** alla somma delle conte:

$$u_{d,rel}^2 = \frac{1}{\sum n_{ci}}$$

Dove $\sum n_{ci}$ corrisponde alla somma del numero di colonie presenti nelle piastre prese in considerazione per il calcolo del risultato.

Per la conversione in scala logaritmica decimale si moltiplica la variabilità intrinseca per 0,1886.



14

ISO 29201:2012

Conferma colonie presunte positive

Scelta di un numero casuale di colonie

E' la scelta più frequente. Si seleziona casualmente un numero n_z di colonie da testare ($n_z < n_c$) dal totale delle colonie presunte positive n_c .

Il numero stimato di colonie confermate per piastra è dato dalla seguente equazione:

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

Il numero di colonie presunte positive (n_c) è legato alla presunta concentrazione nel campione, con un'incertezza governata dalla distribuzione di Poisson.

La **frazione di colonie confermate** rispetto al numero di **colonie sottoposte a conferma** (n_k/n_z), fornisce una stima della proporzione delle colonie positive nel campione con un'incertezza che segue una distribuzione binomiale.



15

ISO 29201:2012

Perciò la variabilità intrinseca (incertezza relativa di distribuzione) delle colonie confermate è data dalla seguente relazione (**formula semplificata**):

$$u_{rel,x} = \sqrt{\frac{1}{n_c} \frac{n_z - n_k}{n_k n_z}}$$

Si può applicare anche la seguente relazione (**formula esatta**) derivante da teorie statistiche più sofisticate:

$$u_{rel,x} = \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{(n_k + 0,5)(n_z - n_k + 0,5)n_z^2}{(n_z + 1)^2(n_z + 2)n_k^2}}$$

Con quest'ultima relazione la stima della variabilità intrinseca delle conte confermate è in molti casi più piccola rispetto al valore che si ottiene applicando la prima equazione.



16

ISO 29201:2012

ANNEX F – Approccio globale per la determinazione della varianza operativa e dell'incertezza composta

L'approccio globale, in linea con quanto previsto nella ISO/TS 19036:2006, è quello di stimare l'incertezza composta da associare al risultato finale mediante un esperimento basato sulla duplicazione dell'intero processo analitico dalla preparazione della sospensione iniziale fino al conteggio finale.

Non è necessario quantificare singolarmente le fonti dell'incertezza.

Tali componenti vengono considerate globalmente e non come contributi separati. Il presupposto per applicare l'approccio globale è quello di dare dimostrazione di tenere sotto controllo le principali componenti di incertezza.

Se disponibili dovrebbero essere utilizzati per la sperimentazione campioni naturalmente contaminati.

Il valore di incertezza stimato con l'approccio globale è valido per la ricerca di un determinato microrganismo, in una definita matrice e con un determinato metodo.



17

ISO 29201:2012

Dovrebbero essere analizzati almeno 30 campioni per avere un risultato attendibile, ma già con 10 campioni è possibile effettuare una prima stima dell'incertezza operativa!!!

L'approccio globale originale previsto dalla ISO 19036 però **non è adatto alle basse conte, ai metodi MPN e alle conferme parziali**, situazioni che contribuiscono ad aumentare l'incertezza di distribuzione.

Per tale motivo nella ISO 29201 è proposto un **approccio globale modificato**. **Praticamente l'incertezza operativa, la parte prevedibile dell'incertezza, è ottenuta «sottraendo» l'incertezza di distribuzione alla riproducibilità intralaboratorio.**

Nel protocollo sperimentale per il calcolo dell'incertezza operativa è consigliabile non utilizzare basse conte e le conferme parziali di colonie oppure aumentare il numero di campioni da analizzare.

Una volta stimata l'incertezza operativa è possibile utilizzare le basse conte e le conferme parziali.



18

ISO 29201:2012

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Dallo stesso campione, due diversi operatori prelevano ciascuno una porzione di campione (*sottocampione*), con il quale preparano la propria sospensione iniziale ed effettuano le analisi.

Da ogni campione si ottengono due risultati, uno per ciascun operatore che dovrebbe usare attrezzature e materiali diversi per l'analisi.

Le condizioni di analisi dovrebbero includere ogni possibile variazione in termini di operatori, lotti di terreni di coltura e reagenti, attrezzature e tempi di analisi (condizioni di riproducibilità intralaboratorio).



19

ISO 29201:2012

Il calcolo della riproducibilità intralaboratorio si effettua utilizzando i dati in scala logaritmica decimale.

Il calcolo in scala logaritmica assicura che il valore dei parametri non dipenda dal livello di contaminazione.

I campioni devono essere scelti in modo da rappresentare i diversi livelli di contaminazione (quelli usuali del laboratorio).

Il calcolo dello scarto tipo di riproducibilità non è fatto per livelli di concentrazione. Il calcolo di s_R con i dati trasformati in logaritmo stabilizza la varianza di riproducibilità/livelli di contaminazione perciò non è necessario stimare s_R per livello di concentrazione!



20

ISO 29201:2012

F.5.1 Esempio 1: Metodo di conta (calcolo con logaritmi decimali)

6 campioni sono stati analizzati indipendentemente da due analisti.

Da ciascun campione, ciascun analista ha prelevato un sottocampione con il quale ha allestito la sospensione iniziale e le successive diluizioni.

F.5.1 - Es. 1 Metodo di conta: Calcolo con logaritmi comuni

Prova	Diluizione	n_{c1}	n_{c2}	$\log n_{c1}$	$\log n_{c2}$	u_R^2	u_d^2	u_o^2			
1	-4	5	8	0,6990	0,9031	0,0208	0,0290	-0,0082			
2	-3	15	11	1,1761	1,0414	0,0091	0,0145	-0,0054			
3	-4	11	19	1,0414	1,2788	0,0282	0,0126	0,0156			
4	-6	21	39	1,3222	1,5911	0,0361	0,0063	0,0299			
5	-5	68	45	1,8325	1,6532	0,0161	0,0033	0,0127			
6	-4	151	203	2,1790	2,3075	0,0083	0,0011	0,0072	u_o		
Media						0,0198	0,0111	0,0086	0,092879	$u_{o,rel}$	21%

Non si considerano le diluizioni se si trasformano i dati di conta in logaritmo.

L'utilizzo dei logaritmi assicura che il valore del parametro non sia sensibile al livello di contaminazione (diluizione).



21

ISO 29201:2012

La **varianza di riproducibilità** è calcolata per ogni campione con la seguente formula:

$$u_R^2 = \frac{(\lg n_{c1} - \lg n_{c2})^2}{2}$$

dove:

n_{c1} = numero di colonie della prima replica

n_{c2} = numero di colonie della seconda replica

Il parametro determinato per ciascun campione è una stima della varianza di riproducibilità.

La **variabilità intrinseca di distribuzione**, dovuta alla distribuzione delle particelle nel campione, in scala logaritmica decimale è data dalla seguente equazione:

$$u_{d_i}^2 = \frac{2 \times 0,1886}{n_{c_{1i}} + n_{c_{2i}}} = \frac{0,1886}{\bar{n}_{c_i}}$$

Dove

\bar{n}_{c_i}

è la media delle colonie contate per piastra di ciascun campione analizzato.



22

ISO 29201:2012

Il parametro che viene inizialmente determinato è l'incertezza chiamata **riproducibilità intralaboratorio** $u_{R'}^2$ (in logaritmo decimale).

La stima della **varianza operativa** è ottenuta per sottrazione della varianza intrinseca di distribuzione dalla riproducibilità intralaboratorio (varianza globale).

$$u_o^2 = u_{R'}^2 - u_d^2$$

Dove

u_o = incertezza operativa (per un dato tipo di campione e di parametro)

u_d = incertezza intrinseca di distribuzione

$u_{R'}$ = incertezza globale, riproducibilità intralaboratorio



23

ISO 29201:2012

1 - Dalla radice quadrata della varianza operativa si ottiene l'incertezza operativa u_o .

Dopo conversione dell'incertezza operativa in logaritmo naturale, si ottiene:

$$u_{o,rel} = u_o * 2,303$$

dove

$u_{o,rel}$ è l'incertezza relativa operativa ottenuta in condizioni di riproducibilità intralaboratorio

NB: l'incertezza calcolata in logaritmo naturale è approssimativamente uguale all'incertezza relativa in scala aritmetica.



2 - L'**incertezza composta** del risultato finale si ottiene combinando la variabilità operativa con la variabilità intrinseca che corrisponde ai risultati di conteggio (conte, colonie confermate o MPN) del campione i-esimo.

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

dove

$u_{d,rel}$ è l'incertezza relativa intrinseca di distribuzione

24

ISO 29201:2012

Metodo alternativo di calcolo!

Metodo della regressione per il calcolo della varianza operativa relativa

(nota 2 paragrafo 6.2 della ISO 29201)

E' un approccio che può essere utilizzato nel caso in cui la varianza operativa risulti zero o negativa con il metodo per sottrazione.

Approccio applicabile se sono disponibili numerosi dati nel campo di misura del metodo.

Si calcola la media, la varianza di ciascuna coppia di dati ed il rapporto varianza-media (K).

Una stima della varianza operativa si ottiene calcolando la **pendenza della retta di regressione** costruita mettendo in ascissa la conta media delle colonie n_c e in ordinata il rapporto varianza-media (K)

$$K = a + u_{0,rel}^2 \bar{n}_C$$

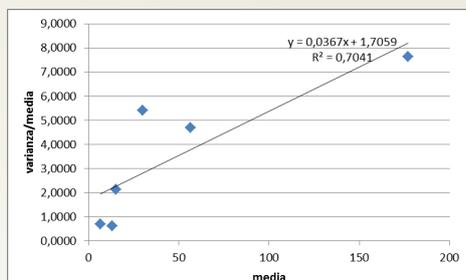
dove $u_{0,rel}^2$ è la stima della varianza operativa relativa.



25

ISO 29201:2012

F.5.1 - Es. 1		Metodo di conta				
Prova	Diluizione	n_{c1}	n_{c2}	media	varianza	varianza/media
1	-4	5	8	7	4,50	0,6923
2	-3	15	11	13	8,00	0,6154
3	-4	11	19	15	32,00	2,1333
4	-6	21	39	30	162,00	5,4000
5	-5	68	45	57	264,50	4,6814
6	-4	151	203	177	1352,00	7,6384



$u_{0,rel}$ 0,1916 19% OK



26

ISO 29201:2012

ANNEX G – Approccio per componenti per la valutazione dell'incertezza composta relativa in condizioni di riproducibilità intralaboratorio

L'incertezza relativa composta del risultato finale si calcola nello stesso modo previsto dall'approccio globale:

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

dove:

$u_{o,rel}$ = incertezza relativa operativa

$u_{d,rel}$ = incertezza relativa intrinseca (incertezza di distribuzione)

Anche la variabilità intrinseca è la stessa in entrambi i casi.

Cambia il modo in cui è determinata la variabilità operativa che nell'approccio globale è determinata per metodo, microrganismo e matrice.



27

ISO 29201:2012

Nell'approccio step-by-step, le componenti operative (*sottocampionamento, diluizione, inoculo, incubazione e lettura*) sono valutate separatamente in condizioni di riproducibilità intralaboratorio e combinate matematicamente usando la legge di propagazione dell'incertezza (ISO/IEC Guide 98-3:2008).

La varianza operativa relativa è ottenuta dalla somma delle varianze relative di ogni componente.

$$u_{o,rel}^2 = u_{rel,M}^2 + u_{rel,F}^2 + u_{rel,V}^2 + u_{rel,L}^2 + u_{rel,I}^2$$



28

ISO 29201:2012

Annex N – Espressione ed uso dell'incertezza di misura

Incertezza composta – Conta di colonie

- ❖ L'incertezza composta espressa **in scala aritmetica** è data dalla seguente equazione:

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

dove:

n_z è il numero di colonie contate

$u_{o,rel}^2$ è la varianza operativa relativa



29

ISO 29201:2012

- ❖ L'incertezza composta espressa in **forma relativa** e **in logaritmo naturale** è data da:

$$u_{c,rel} = \sqrt{\frac{1}{n_z} + u_{o,rel}^2}$$

dove:

n_z è il numero di colonie osservate

$u_{o,rel}^2$ è la varianza operativa relativa, che nell'approccio per componenti è dato da:

$$u_{o,rel}^2 = u_{rel,M}^2 + u_{rel,F}^2 + u_{rel,V}^2 + u_{rel,L}^2 + u_{rel,I}^2$$

e $u_{d,rel}^2$

$$u_{d,rel}^2 = \frac{1}{n_z}$$

è la varianza di distribuzione.

Per ottenere il valore di incertezza composta si deve moltiplicare il risultato per

$u_{c,rel}$.



30

ISO 29201:2012

Incertezza composta – Conta di colonie confermate

L'incertezza composta espressa in **forma relativa** e in **logaritmo naturale** è data da:

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

oppure da

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{o,rel}^2 + \frac{1}{n_c} + \frac{(n_k + 0,5)(n_z - n_k + 0,5)n_z^2}{(n_z + 1)^2(n_z + 2)n_k^2}}$$

dove:

n_c è il numero di colonie presunte

n_z è il numero di colonie presunte sottoposte a conferma

n_k è il numero di colonie confermate

$u_{o,rel}^2$ è la varianza operativa relativa

Il valore relativo può essere trasformato in scala aritmetica $u_c = n_c u_{c,rel}$

dove n_c è il numero di colonie stimate positive dopo conferma



31

ISO 29201:2012

Valutazione dei limiti fiduciali

- **Limiti simmetrici**

Si possono calcolare **limiti simmetrici attorno al valore osservato in scala aritmetica, ipotizzando che il valore osservato sia una stima della media.**

I limiti si ottengono dalle seguenti equazioni:

$$T_0 = n_z - 2\sqrt{n_z + u_{o,rel}^2 n_z^2}$$

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



32

ISO 29201:2012

Dove:

T_1 è il limite più alto dell'intervallo di confidenza

T_0 è il limite più basso dell'intervallo di confidenza

$u_{o,rel}^2$ è la varianza operativa relativa

n_z è il numero delle colonie contate

u_c in scala aritmetica è

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

Generalmente per la matrice acqua l'incertezza operativa è raramente maggiore di 0,1 e comunque non eccede 0,25.

Perciò per l'analisi dell'acqua, i limiti simmetrici in scala aritmetica sono una buona approssimazione.



33

ISO 29201:2012

• Limiti relativi

La stima dei **limiti relativi** può essere appropriata **se l'incertezza operativa è maggiore di 0,25 specialmente in combinazione con alte conte.**

Se l'incertezza composta è espressa in termini relativi o in scala logaritmica naturale, i limiti di confidenza al 95% sono calcolati con le seguenti formule:

- per l'intervallo superiore

$$T_1 = n_z \exp(2u_{c,rel})$$

- per l'intervallo inferiore

$$T_0 = \frac{n_z}{\exp(2u_{c,rel})}$$



34

ISO 29201:2012

Quando l'incertezza composta è espressa in logaritmo decimale, i limiti sono calcolati come segue:

▪ per l'intervallo superiore $T_1 = n_z \cdot 10^{2u_c(\lg)}$

▪ per l'intervallo inferiore $T_0 = \frac{n_z}{10^{2u_c(\lg)}}$

dove
 n_z è il numero di colonie contate.



35

Linea guida EURACHEM AML 2023

Matrice alimenti

ISO 7218:2007 e ISO 7218:2007/Amd. 1:2013, ISO 19036:2019

ISO 7218 ... Incertezza dei risultati

Si rimanda alla norma **ISO 19036** per indicazioni sulla stima e l'espressione dell'incertezza di misura dei risultati dei metodi microbiologici quantitativi.



36

ISO 19036:2019

La norma ISO 19036:2019 sostituisce le norme ISO/TS 19036:2006 e ISO/TS 19036:2006/Amd.1:2009.

Le principali modifiche rispetto all'edizione precedente sono le seguenti:

1. è prevista la stima dell'**incertezza tecnica** e anche di altre fonti di incertezza riguardanti:

- l'**incertezza della matrice** ovvero l'incertezza dovuta alla dispersione dei microrganismi all'interno della matrice;
- l'**incertezza di Poisson** relativa ai metodi di conta delle colonie in piastra;
- l'**incertezza di conferma** associata ai test per confermare l'identità di microrganismi specifici a seguito della conta di microrganismi presunti positivi;
- l'**incertezza associata ai metodi MPN**;

Incertezza di distribuzione

unicim

37

ISO 19036:2019

Le prove microbiologiche quantitative sono generalmente condotte utilizzando la **tecnica di conta delle colonie**.

L'approccio presentato dalla nuova ISO 19036 è applicabile anche ad altre tipologie di analisi quantitative che includono:

- **Metodi MPN**;
- **Metodi strumentali (p.e. la citofluorimetria, etc.)**;
- **Metodi molecolari (p.e. qPCR)**.

unicim

38

ISO 19036:2019

I tre diversi tipi di incertezza (incertezza tecnica, di matrice e di distribuzione) vengono sommati come varianze utilizzando l'approccio previsto dalla Guida ISO/IEC 98-3.

E' un approccio simile a quello proposto dalla ISO 29201 per il calcolo dell'incertezza di misura delle prove microbiologiche relative alla matrice acqua.

L'**incertezza tecnica** è spesso la più grande delle tre ed è calcolata come scarto tipo di riproducibilità.



39

ISO 19036:2019

Considerazioni generali

L'incertezza calcolata con l'approccio ISO 19036 non include i due seguenti contributi:

- l'**incertezza di campionamento**;
- lo **scostamento o errore sistematico (bias)**, vista l'impossibilità di conoscere la vera quantità dell'analita in un campione o in una porzione, in quanto il numero di colonie osservate è un'approssimazione del numero di particelle viventi.

Anche se il bias come componente dell'incertezza di misura non è formalmente stimato, bisogna dimostrare di tenerlo sotto controllo ad esempio mediante la partecipazione a circuiti interlaboratorio e/o con l'utilizzo di Materiali di Riferimento Certificati.



40

ISO 19036:2019

L'**incertezza tecnica** deriva dalla variabilità operativa associata alle fasi tecniche della procedura analitica. Include la variabilità data da: il prelievo, la miscelazione, la diluizione del campione test utilizzato per la preparazione della sospensione iniziale e le successive diluizioni. Include anche gli effetti dell'incubazione e dei terreni di coltura.

E' stimata, usando un approccio globale, dallo scarto tipo di riproducibilità del risultato finale di un processo di misurazione.

L'**incertezza della matrice** deriva dalla miscelazione imperfetta del campione, con conseguente scarsa riproducibilità dei livelli microbici tra le porzioni test, che può essere grande per le matrici solide e in particolare per i prodotti alimentari composti.

L'incertezza della matrice è stimata **per ogni tipo di matrice**.



41

ISO 19036:2019

Anche per matrici omogenee, la distribuzione casuale dei microrganismi genera **incertezza di distribuzione** in relazione alla tecnica di prova utilizzata:

1. *per le tecniche di **conta delle colonie**:*
 - incertezza di Poisson
 - incertezza di conferma
2. *per le tecniche **MPN**:*
 - incertezza MPN

L'incertezza di distribuzione è calcolata matematicamente.



42

ISO 19036:2019

La norma presenta due opzioni per calcolare l'incertezza composta:

OPZIONE 1

Le componenti dell'incertezza (incertezza tecnica, incertezza di matrice, incertezza di distribuzione) possono essere stimate separatamente e poi combinate tra loro.

OPZIONE 2

Purché compatibile con i protocolli di laboratorio e le esigenze del cliente, l'incertezza può essere basata solo sullo scarto tipo di riproducibilità. L'incertezza tecnica è infatti spesso la più grande delle tre componenti dell'incertezza.



43

ISO 19036:2019

CALCOLO DELL'INCERTEZZA TECNICA

L'incertezza tecnica s_R è stimata, usando un approccio globale, dallo scarto tipo di riproducibilità del risultato finale di un processo di misurazione.

Per questa ragione l'incertezza tecnica è una caratteristica del metodo. L'incertezza tecnica stimata per un metodo di prova non può essere applicata ad altri metodi. Deve essere calcolata per ciascun tipo di microrganismo target.

La rivalutazione della stima dell'incertezza deve essere effettuata a seguito di modifiche a qualsiasi **fattore critico** che possa incidere in modo significativo sui risultati ottenuti.



44

ISO 19036:2019

Fattori critici

Esempi di fattori tecnici critici che possono influenzare l'incertezza e che devono essere controllati includono:

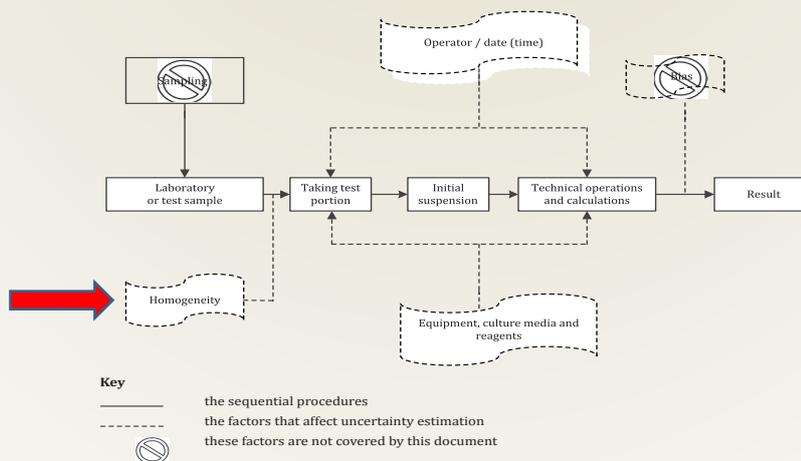
1. il tipo di **terreno di coltura** e/o altri **reagenti** (come quelli utilizzati per la conferma);
2. le procedure di **diluizione**, di **inoculo** e di **incubazione**;
3. le tecniche di **conteggio** (manuale o automatizzato);
4. le modifiche all'**operatore** o al gruppo di operatori.



45

ISO 19036:2019

Principali fonti di incertezza previste dalla norma ISO 19036:2019



46

ISO 19036:2019

Opzione 1: Calcolo dello scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio

- Si deve allestire l'esperimento nelle condizioni di **massima variabilità** del laboratorio perché in questo modo si tiene conto del maggior numero possibile di fonti di incertezza.
- Si lavora in condizioni di riproducibilità intralaboratorio, indicate nella norma ISO 19036 come condizione A e condizione B. Le condizioni devono essere il più rappresentative possibile delle variazioni che si possono avere nei diversi giorni in laboratorio (operatori, attrezzature, reagenti, etc.).
- *L'approccio più frequentemente applicabile si ha quando il laboratorio utilizza i dati derivanti da prove condotte in parallelo da due operatori diversi, sullo stesso campione, tra quelli di routine analizzati dal laboratorio.*



47

ISO 19036:2019

Protocollo sperimentale

Il protocollo sperimentale prevede l'analisi di due porzioni test per ciascun campione. Per altri casi (*ovvero più di due porzioni test per alcuni o tutti i campioni*), il protocollo e i calcoli sono riportati nell'Annex A della norma.

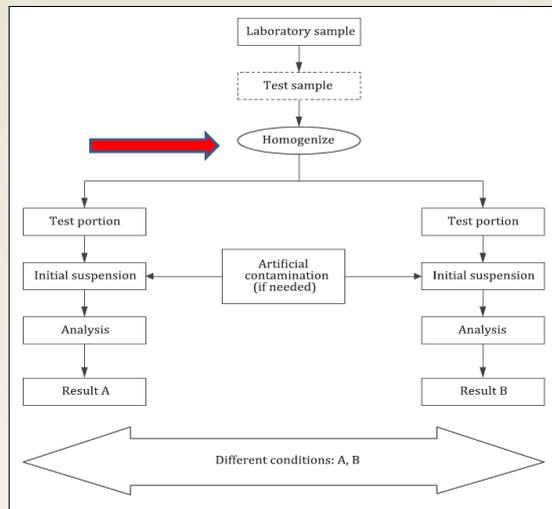
Per ciascun metodo di prova, si deve eseguire il protocollo sperimentale di seguito riportato analizzando almeno **dieci campioni**.

I dati vengono raccolti per un periodo di tempo stabilito dal laboratorio per calcolare l'incertezza di misura o durante l'attività di routine del laboratorio.



48

ISO 19036:2019



Protocollo sperimentale per il calcolo dello scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio.
Due determinazioni per ciascun campione



49

ISO 19036:2019

Scelta dei campioni di laboratorio

La sperimentazione è progettata per **escludere i contributi dati dall'eterogeneità del campione, quindi non è necessario ripetere la sperimentazione per matrici diverse.**

Il calcolo dello scarto tipo di riproducibilità può essere perciò effettuato su una singola matrice, l'importante è che i campioni di prova siano resi omogenei.

Il calcolo utilizza i dati trasformati in logaritmo decimale per normalizzare la varianza della riproducibilità intralaboratorio, quindi **non è necessario ripetere il protocollo sperimentale per diversi livelli di contaminazione.**

Tuttavia, ove possibile, i campioni dovrebbero essere scelti in modo da rappresentare i diversi livelli di contaminazione (quelli usuali dei campioni che analizza il laboratorio).



50

ISO 19036:2019

Preparazione dei campioni

Al fine di ridurre i contributi dell'incertezza di matrice, **il campione** di laboratorio o il campione test, nei casi in cui il campione di laboratorio sia troppo grande per essere omogeneizzato, **deve essere reso il più omogeneo possibile.**



51

ISO 19036:2019

Descrizione dell'attività sperimentale

- Da un alimento tra quelli di routine, reso il più possibile omogeneo per miscelazione o se solido, sottoposto a macinazione, sono ricavati 2 campioni di prova distribuiti ciascuno ad un analista diverso...

Sospensione iniziale, contaminazione artificiale (se necessario) e condizioni di analisi

- ... che provvederà a preparare la propria sospensione iniziale da cui allestire la prova.
- Se è necessaria la contaminazione artificiale, si esegue nella sospensione iniziale.
- Eseguire le analisi su ciascuna porzione test come nell'analisi di routine (ad es. preparazione di una serie di diluizioni decimali, inoculo di una o due piastra/e per diluizione, etc.).



52

ISO 19036:2019

Risultati accettabili

I risultati delle conte basati su meno di 30 colonie dovrebbero essere esclusi, così come conte al di sopra del numero massimo per piastra (nella maggior parte dei casi 300 UFC/piastra o un numero inferiore come specificato nel metodo di prova).

NOTA 1 Il limite di 30 colonie si riferisce alla somma del numero totale di colonie contate su tutte le piastre prese in considerazione per esprimere il risultato (ΣC).

NOTA 2 Il limite di 30 colonie è specifico del protocollo sperimentale per stimare lo scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio.

Per i **metodi che prevedono la conferma parziale**, tutti i risultati per i quali sono state confermate (cioè sono risultate positive all'identificazione) meno della metà delle colonie presunte positive devono essere esclusi.

Si raccomanda di escludere risultati per i quali $n_c < n_p / 2$!



53

ISO 19036:2019

Calcolo della riproducibilità intralaboratorio (s_{IR})

Prima di eseguire i calcoli, trasformare il risultato ottenuto dall'analisi di ciascuna porzione test in UFC/g o ml in \log_{10} UFC/g o ml.

Per n (almeno 10) campioni di laboratorio, i risultati (y_{iA} e y_{iB}) ottenuti per ciascuna delle porzioni test vengono utilizzati per calcolare lo scarto tipo di riproducibilità, s_{IR} , con la seguente formula:

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

Dove:

- i è il numero del campione, $i=1$ a n ($n \geq 10$)
- y_{iA} - y_{iB} sono i risultati in \log_{10} UFC/g o ml ottenuti nelle due condizioni di misurazione A e B rispettivamente.

Vediamo di seguito un esempio:



54

ISO 19036:2019

Tabella 1 - Calcolo dello scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio
Esempio di conteggio della flora mesofila aerobica in carne di pollame mista con un replicato per ciascuna delle due diluizioni testate

Campione	Porzione test	diluizione (d) colonie contate (C)				Totale colonie contate	Risultato in cfu/g o ml (ISO 7218)	log ₁₀ cfu/g o ml	Differenza risultati log ₁₀	Quadrato delle differenze	Gradi di libertà
		d ₁	C ₁	d ₂	C ₂						
1	A	3	102	4	8	110	1,00E+05	5,0000			
1	B	3	59	4	4	63	5,73E+04	4,7579	0,2421	0,05859	1
2	A	5	61	6	6	67	6,09E+06	6,7847			
2	B	5	66	6	8	74	6,73E+06	6,8278	-0,0432	0,00186	1
3	A	4	168	5	18	186	1,69E+06	6,2281			
3	B	4	86	5	7	93	8,45E+05	5,9271	0,3010	0,09062	1
4	A	5	266	6	25	291	2,65E+07	7,4225			
4	B	5	140	6	16	156	1,42E+07	7,1517	0,2708	0,07332	1
5	A	6	45	7	5	50	4,55E+07	7,6576			
5	B	5	129	6	15	144	1,31E+07	7,1170	0,5406	0,29226	1
6	A	4	129	5	12	141	1,28E+06	6,1078			
6	B	4	117	5	10	127	1,15E+06	6,0624	0,0454	0,00206	1
7	A	2	92	3	8	100	9,09E+03	3,9586			
7	B	2	131	3	13	144	1,31E+04	4,1170	-0,1584	0,02508	1
8	A	3	139	4	13	152	1,38E+05	5,1405			
8	B	3	143	4	15	158	1,44E+05	5,1573	-0,0168	0,00028	1
9	A	1	49	2	5	54	4,91E+02	2,6910			
9	B	1	129	2	13	142	1,29E+03	3,1109	-0,4199	0,17631	1
10	A	4	142	5	13	155	1,41E+06	6,1489			
10	B	3	227	4	26	253	2,30E+05	5,3617	0,7872	0,61970	1

Somma 1,3401 10

1,340 1/(2 × 10) = 0,0670

sIR = √0,067 = 0,2589



55

ISO 19036:2019

INCERTEZZA DI MATRICE

L'incertezza della matrice è legata solo agli effetti della distribuzione dei microrganismi in una data matrice, anche se resa omogenea.

E' legata alla variabilità tra i risultati ottenuti dai sottocampioni prelevati dallo stesso campione di laboratorio.

Il laboratorio deve elencare le matrici alimentari che più comunemente analizza e per ciascuna di esse deve definire la propria incertezza di matrice.

L'incertezza della matrice è indipendente dal metodo analitico utilizzato e dal misurando (specie microbica). Ciò significa che l'incertezza di matrice stimata per una matrice può essere utilizzata come contributo dell'incertezza di matrice per tutti i test quantitativi relativi alla stessa matrice.



56

ISO 19036:2019

Si devono **utilizzare campioni contaminati naturalmente**, poiché la contaminazione artificiale non riflette la reale incertezza di matrice.

Poiché l'incertezza della matrice è considerata indipendente dal misurando e dal metodo di prova utilizzato, è necessario scegliere misurandi per i quali sono disponibili **campioni contaminati naturalmente** e applicare metodi di prova ad esempio per il conteggio della Carica mesofila, delle Enterobatteriacee o dei microrganismi termofili che formano spore, etc..



57

ISO 19036:2019

INCERTEZZA DI DISTRIBUZIONE

Metodi di conta in piastra - Incertezza di Poisson

La successiva tabella riporta i valori dell'incertezza di Poisson, $u_{Poisson}$, in \log_{10} , per i valori di conta (ΣC) da 1 a 40. Nel caso in cui $\Sigma C=0$, cioè nel caso in cui non ci siano colonie, $u_{Poisson}=0,434$.

ΣC	$u_{Poisson}$						
1	0,434	11	0,131	21	0,095	31	0,078
2	0,307	12	0,125	22	0,093	32	0,077
3	0,251	13	0,120	23	0,091	33	0,076
4	0,217	14	0,116	24	0,089	34	0,074
5	0,194	15	0,112	25	0,087	35	0,073
6	0,177	16	0,109	26	0,085	36	0,072
7	0,164	17	0,105	27	0,084	37	0,071
8	0,154	18	0,102	28	0,082	38	0,070
9	0,145	19	0,100	29	0,081	39	0,070
10	0,137	20	0,097	30	0,079	40	0,069

$u_{Poisson}$ per altri valori di ΣC può essere calcolata utilizzando la formula:

$$u_{Poisson} = \frac{1/\ln(10)}{\sqrt{\Sigma C}} = \frac{0,4343}{\sqrt{\Sigma C}} \quad \text{if } \Sigma C = 100, u_{Poisson} = \frac{0,4343}{\sqrt{100}} = \frac{0,4343}{10} = 0,04343.$$

Per valori elevati di ΣC , la componente di incertezza di Poisson può essere trascurabile se le altre componenti di incertezza sono più elevate.



58

Metodi di conta in piastra - Incertezza di conferma

L'incertezza di conferma u_{conf} può essere calcolata utilizzando la seguente formula, che deriva dalla corrispondente formula presente nella ISO 29201:2012.

NB: nel caso in cui $n_c=0$, si calcola u_{conf} considerando $n_c=1$

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

Tabella 3 — Incertezza di conferma (u_{conf}) in log10 per numero di colonie sottoposte a conferma (n_p) e numero di colonie confermate (n_c)

Numero di colonie confermate (n_c)	Numero di colonie sottoposte a conferma (n_p)			
	5	10	15	20
0	0,3553	0,4302	0,4605	0,4768
1	0,3553	0,4302	0,4605	0,4768
2	0,2023	0,2626	0,2868	0,2998
3	0,1349	0,1946	0,2177	0,2300
4	0,0888	0,1541	0,1776	0,1899
5	0,0454	0,1253	0,1501	0,1628
6		0,1027	0,1293	0,1427
7		0,0834	0,1126	0,1267
8		0,0657	0,0985	0,1136
9		0,0478	0,0862	0,1024
10		0,0261	0,0750	0,0926
11			0,0646	0,0838
12			0,0544	0,0757
13			0,0441	0,0682
14			0,0329	0,0611
15			0,0183	0,0543
16				0,0475
17				0,0406
18				0,0333
19				0,0251
20				0,0141



59

ISO 19036:2019

In aggiunta all'incertezza tecnica e di matrice, si devono tenere in considerazione anche eventuali altre incertezze ($u_{Poisson}$, u_{conf} , u_{MPN}).

Quindi si calcola l'incertezza composta come radice quadrata della somma dei quadrati delle singole incertezze.

Vediamo alcuni esempi:

Esempio	Incertezza composta
Metodo strumentale, senza colonie o cellule contate	$u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2}$
Metodo di conta, senza conferma parziale	$u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{Poisson}^2}$
Metodo di conta, con conferma parziale	$u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{Poisson}^2 + u_{conf}^2}$
Metodo MPN	$u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{MPN}^2}$



60

ISO 19036:2019

INCERTEZZA ESTESA

Moltiplicando l'incertezza composta $u_c(y)$ per il fattore di copertura $k=2$ (che corrisponde ad un livello di confidenza di 95%) si ottiene l'incertezza estesa U , con la seguente formula:

$$U = 2 u_c(y)$$

L'incertezza di misura deve essere riportata nel Rapporto di Prova:

- nella stessa unità di misura del misurando;
- come **incertezza estesa** insieme ad una dichiarazione del livello di confidenza e ad un'indicazione che l'incertezza è stata stimata in conformità alla norma ISO 19036.

Se l'incertezza di misura si basa unicamente sullo scarto tipo di riproducibilità, questo deve essere riportato nel Rapporto di Prova.



61

Linea guida EURACHEM AML 2023



Allegato C – Calcolo dei limiti di confidenza

Lo scopo è quello di introdurre il calcolo degli intervalli di confidenza asimmetrici per i metodi microbiologici.

Quando l'incertezza estesa è superiore al 30%-40% si raccomanda di indicare intervalli di confidenza asimmetrici invece di riportare l'incertezza estesa per il risultato del conteggio in % o logaritmo.

Ad es. 50 UFC \pm 42% può anche essere riportato come 50 [33, 76] UFC dove da 33 a 76 è l'intervallo di confidenza asimmetrico per il risultato di 50 UFC.



62

Linea guida EURACHEM AML 2023

In microbiologia le principali componenti dell'incertezza di misura sono, secondo le norme ISO 29201 e ISO 19036:

1. u_o - incertezza relativa operativa (tecnica) dovuta alle fasi tecniche della procedura di prova;
2. u_d - incertezza di distribuzione relativa. E' data dalla distribuzione casuale delle particelle nelle sospensioni perfettamente miscelate. L'incertezza di distribuzione è descritta dalla Legge di Poisson;
3. u_{conf} - incertezza relativa di conferma che per le conferme parziali delle colonie presunte positive che si somma all'incertezza di distribuzione.



63

Linea guida EURACHEM AML 2023

Ulteriore contributo di incertezza per campioni solidi e fluidi viscosi è dato da:

u_{matrix} - incertezza relativa di matrice che dipende dalla non omogenea distribuzione dei microrganismi nel campione. A condizione che l'intero campione possa essere reso omogeneo, u_{matrix} può essere considerata uguale a $0,10 \log_{10} \text{CFU/g}$ ($0,10 * 2,303 = 23\%$) secondo il paragrafo 6.2 della norma ISO 19036.

La linea guida introduce anche la componente dovuta all'incertezza di campionamento:

u_{samp} - **incertezza relativa di campionamento** (come riportato nell'Allegato D)



64

Linea guida EURACHEM AML 2023

L'incertezza (analitica) composta relativa u_c può essere calcolata a partire dai singoli componenti di incertezza relativa:

$$u_c = \sqrt{u_d^2 + u_o^2 + u_{\text{conf}}^2 + u_{\text{matrix}}^2}$$

È possibile escludere dal calcolo dell'incertezza composta, uno dei componenti se la sua incertezza è inferiore di 1/5 (<0,20) dell'incertezza del componente più grande.



65

Linea guida EURACHEM AML 2023

L'intervallo di confidenza asimmetrico al 95% di probabilità del valore misurato n può essere calcolato secondo il paragrafo *N.3.4 Calcolo dei limiti relativi della norma ISO 29201* a partire dall'incertezza composta relativa in %.

L'incertezza calcolata in scala logaritmica naturale è numericamente sovrapponibile ad un'incertezza relativa in scala aritmetica.

Il limite massimo è dato da:

$$U_{\text{max}} = n \times \exp\left(\frac{2u_c}{100}\right)$$

Il limite minimo è dato da:

$$U_{\text{min}} = n / \exp\left(\frac{2u_c}{100}\right)$$

n =valore misurato



66

Linea guida EURACHEM AML 2023

Questa modalità di calcolo dell'intervallo asimmetrico di confidenza utilizza un **Fattore di incertezza (FU)** che divide o moltiplica il valore misurato n.

Per un'incertezza composta relativa (%) il fattore di incertezza è:

$$FU = \exp\left(\frac{2u_c}{100}\right)$$

Perciò il limite massimo è:

$$U_{max} = n \times FU$$

E il limite minimo è dato da:

$$U_{min} = n/FU$$



67

Linea guida EURACHEM AML 2023

Ad esempio, per n = 15 UFC e un'incertezza composta relativa $u_c = 30\%$, il fattore di incertezza è $FU = 1,82$.

Infatti:

$$FU = \exp\left(\frac{2 \cdot 30}{100}\right) = \exp^{0,6} = 1,822$$

L'intervallo di confidenza può quindi essere calcolato come:

$$U_{max} = 15 \cdot 1,822 = 27 \text{ CFU}$$

$$U_{min} = 15/1,822 = 8 \text{ CFU}$$



68

Linea guida EURACHEM AML 2023

C3 Calcolo dell'incertezza (%) per la tecnica di conta in piastra (UFC) per la matrice acqua e calcolo dei limiti di confidenza asimmetrici

La tabella C1 riporta un esempio di calcolo degli intervalli di confidenza asimmetrici basati sull'incertezza estesa relativa per un metodo di conta con un'incertezza operativa relativa $u_o=15\%$.

$$u_d=1/\sqrt{n} \quad (n=\text{colonie contate})$$

$$u_c=\sqrt{u_o^2 + u_d^2}$$

$$U=2*u_c$$

I limiti fiduciali sono stati calcolati con le *formule dei limiti relativi*.



69

Linea guida EURACHEM AML 2023

Tabella C1 – Calcolo dell'incertezza estesa considerando l'incertezza operativa (u_o) e l'incertezza di distribuzione (u_d) e calcolo dell'intervallo di confidenza asimmetrico al 95 % di probabilità con i limiti U_{min} e U_{max}

Conte	u_o	u_d	u_c	U	U min	U max
UFC	%	%	%	%	UFC	UFC
3	15%	58%	60%	119%	1	10
4	15%	50%	52%	104%	1	11
5	15%	45%	47%	94%	2	13
6	15%	41%	43%	87%	3	14
8	15%	35%	38%	77%	4	17
9	15%	33%	37%	73%	4	19
10	15%	32%	35%	70%	5	20
15	15%	26%	30%	60%	8	27
25	15%	20%	25%	50%	15	41
50	15%	14%	21%	41%	33	76
300	15%	6%	16%	32%	218	414



70

Linea guida EURACHEM AML 2023

Nella tabella C1 si può notare che con un'incertezza operativa del 15% l'incertezza distribuzione è il contributo che pesa di più nell'intervallo di conte fino a $n=10$.

Ad esempio, calcolare l'incertezza composta utilizzando solo l'incertezza di distribuzione del 32% per $n=10$ UFC restituisce un intervallo di confidenza di [5,19] che è molto simile all'intervallo [5,20] indicato nella tabella C1 ottenuto considerando anche un'incertezza operativa del 15%.

Un esempio di come utilizzare la tabella C1 per un metodo di prova con un'incertezza operativa $u_o=15\%$ che prevede la conferma parziale delle colonie presunte positive è riportato nella tabella C2 e nella tabella C3. Il numero di colonie presunte positive è $n_c=25$ UFC.



71

Linea guida EURACHEM AML 2023

Tabella C2 – Risultati ottenuti prima della conferma a partire dalla tabella C1

Count (CFU)	u_o (%)	u_d (%)	u_c (%)	U (%)	U_{min} (CFU)	U_{max} (CFU)
25	15	20	25	50	15	41

Conferma parziale di colonie presunte positive

Vengono sottoposte a test di conferma 10 colonie (n_z) su 25 colonie presunte positive (n_c). Delle 10 colonie (n_z) testate, 8 colonie (n_k) sono confermate positive. Il conteggio confermato (n) è quindi di 20 colonie calcolato secondo la formula:

$$n = n_c * n_k / n_z = 25 * 8 / 10 = 20$$



72

Linea guida EURACHEM AML 2023

Tabella C3 – Risultati ottenuti dopo la conferma (n. colonie stimate positive=20)

Count (CFU)	u_o (%)	u_d^1 (%)	u_{conf}^2 (%)	u_c (%)	U (%)	U_{min} (CFU)	U_{max} (CFU)
20	15	20	16	30	59	11	36

Dove:

$$u_d = 1/\sqrt{25}=0,2=20\% \quad (1)$$

$$u_{conf} = \sqrt{\frac{n_z - n_k}{n_z * n_k}} = \sqrt{\frac{10 - 8}{10 * 8}} = 16\% \quad (2)$$

$$u_c = \sqrt{u_d^2 + u_{conf}^2 + u_o^2} = \sqrt{0,20^2 + 0,16^2 + 0,15^2} = 29,68\% \cong 30\%$$

$$U = 2 * 29,68\% = 59,36\% \cong 59\%$$



73

Linea guida EURACHEM AML 2023

C4 Calcolo dell'incertezza (\log_{10}) per la tecnica di conta in piastra (UFC) per la matrice alimenti e calcolo dei limiti di confidenza asimmetrici

La tabella C4 riporta gli intervalli di confidenza asimmetrici basati sul calcolo dell'incertezza in \log_{10} per la conta di colonie con un'incertezza operativa relativa $u_o=35\%$ ($0,35 * 0,4343 = 0,15 \log_{10}$) e un'incertezza relativa di matrice $u_{matrix}=23\%$ ($0,23 * 0,4343 = 0,10 \log_{10}$).



74

Linea guida EURACHEM AML 2023

NB: un'incertezza relativa percentuale (inferiore al 50%) è numericamente sovrapponibile ad un'incertezza in logaritmo naturale, come riportato nella norma ISO 29201.

Ad esempio, un'incertezza relativa del 20% è approssimativamente uguale a 0,20 in logaritmo naturale (ln) e a 0,087 ($0,20 \cdot 0,4343 = 0,08686$) in logaritmo decimale (\log_{10}).

- Per passare da logaritmo naturale a logaritmo decimale, bisogna moltiplicare il logaritmo naturale per 0,4343.
- Per passare da logaritmo decimale a logaritmo naturale, bisogna moltiplicare il logaritmo decimale per 2,303.



75

Linea guida EURACHEM AML 2023

Gli algoritmi utilizzati nel calcolo utilizzati sono i seguenti:

$$u_d = \sqrt{\frac{0,1886}{n}} \quad (n = \text{colonie contate})$$

$$u_c = \sqrt{u_o^2 + u_d^2 + u_{matrix}^2}$$

$$U = 2 \cdot u_c$$

I limiti fiduciali sono stati calcolati con le *formule dei limiti relativi* in logaritmo decimale (\log_{10}).



76

Linea guida EURACHEM AML 2023

Per il calcolo dell'incertezza composta in logaritmo decimale (\log_{10}) si utilizzano le seguenti formule di calcolo.

Il limite minimo è dato da:

$$U_{\min} = n/10^{2u_c}$$

Il limite massimo si calcola con la formula:

$$U_{\max} = n \times 10^{2u_c}$$

n=valore misurato



77

Linea guida EURACHEM AML 2023

Tabella C4 – Calcolo dell'incertezza estesa considerando l'incertezza operativa (u_o), l'incertezza di distribuzione (u_d) e l'incertezza di matrice (u_{matrix}) in \log_{10} e calcolo dell'intervallo di confidenza asimmetrico al 95 % di probabilità con i limiti U_{\min} e U_{\max}

Conte	u_o	u_d	u_{matrix}	u_c	U	U min	U max	U min	U max
UFC	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	UFC	UFC
3	0,15	0,25	0,10	0,309	0,618	0,0	1,1	1	12
4	0,15	0,22	0,10	0,282	0,564	0,0	1,2	1	15
5	0,15	0,19	0,10	0,265	0,530	0,2	1,2	1	17
6	0,15	0,18	0,10	0,253	0,506	0,3	1,3	2	19
8	0,15	0,15	0,10	0,237	0,474	0,4	1,4	3	24
9	0,15	0,14	0,10	0,231	0,462	0,5	1,4	3	26
10	0,15	0,14	0,10	0,227	0,453	0,5	1,5	4	28
15	0,15	0,11	0,10	0,212	0,425	0,8	1,6	6	40
20	0,15	0,10	0,10	0,205	0,410	0,9	1,7	8	51
50	0,15	0,06	0,10	0,190	0,381	1,3	2,1	21	120
300	0,15	0,03	0,10	0,182	0,364	2,1	2,8	130	694



78

Linea guida EURACHEM AML 2023

Di seguito si riporta un esempio per un metodo di prova con:

- un'incertezza operativa (tecnica) $u_o=0,15 \log_{10}$ CFU/g;
- un'incertezza di matrice $u_{matrix}=0,10 \log_{10}$ CFU/g.

Le prove sono state allestite in piastra singola, in due diluizioni successive (10^{-3} e 10^{-4}).

Volume di inoculo= 1 ml

I risultati ottenuti sono di seguito riepilogati:

Fattore di diluizione	Conte UFC
1,0E+03	102
1,0E+04	8
Risultato	1,0E+05 (102+8)/1.1*1000 UFC/g

Risultato	5,0E+00 \log_{10} UFC/g
-----------	---------------------------

u_o	u_d	u_{matrix}	u_c	U	U min	U max	U min	U max
\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	\log_{10}	UFC	UFC
0,15	0,041	0,10	0,185	0,370	4,63	5,37	4,3E+04	2,3E+05



79

Linea guida EURACHEM AML 2023



C7 Calcolo dell'incertezza operativa dai dati di controllo qualità

L'incertezza operativa (tecnica) relativa può essere calcolata dai **dati di controllo della qualità** sottraendo l'incertezza di distribuzione (u_d) dallo scarto tipo (s_{QC}^2) dei risultati della misurazione di un campione di controllo (QC).

Per esempio, se lo scarto tipo relativo delle misurazioni di un campione di controllo con un valore medio di 42 UFC è $s_{QC}^2=17,6\%$ e l'incertezza relativa di distribuzione è $u_d=15,4\%$ ($u_d=1/\text{radq}(42)=0,154=15,4\%$), l'incertezza operativa relativa calcolata con la formula di seguito riportata è 8,5%.

$$u_o = \sqrt{s_{QC}^2 - u_d^2}$$

$$u_o = \sqrt{0,176^2 - 0,154^2} = \sqrt{0,00726} = 0,0852 = 8,52\%$$



80



C8 Calcolo dell'incertezza operativa da dati duplicati (in presenza di dati negativi)

L'incertezza operativa (tecnica) può essere calcolata, secondo la norma ISO 29201 o la norma ISO 19036, da risultati duplicati in condizioni di riproducibilità intralaboratorio.

L'incertezza operativa è successivamente stimata, come proposto nell'approccio globale della norma ISO 29201, sottraendo la varianza di distribuzione media dalla varianza di riproducibilità media (varianza globale).



81



Con l'approccio per sottrazione, può succedere che la varianza operativa sia negativa, come ad esempio nel caso di basse conte o per campioni molto omogenei.

In questo caso l'incertezza operativa non può essere stimata.

Nella tabella C7 è riportato il limite di confidenza superiore (UCL=upper confidence limit) dell'incertezza operativa relativa calcolato sperimentalmente con un numero di prove duplicate da 10 a 100, per valori di conte (mediana) variabili da 30 a 100 UFC.

I dati di incertezza operativa riportati nella tabella, derivano da un numero di prove duplicate per distribuzione ripetuto per 2000-5000 volte.



82

Linea guida EURACHEM AML 2023

NEW

Tabella C7

Numero di duplicati	Mediana (UFC)	ud (%)	\hat{u}_o (%)
10	30	18	15
20	30	18	11
30	30	18	9
10	50	14	11
20	50	14	8
30	50	14	6
10	75	11,5	9
20	75	11,5	7
30	75	11,5	6
10	100	10	8
20	100	10	6
30	100	10	5
100	100	10	3

\hat{u}_o è il limite di confidenza superiore (UCL) approssimato dell'incertezza operativa, quando la varianza operativa è zero o negativa.

unicim

83

Linea guida EURACHEM AML 2023

Esempio

Nella sperimentazione per il calcolo dell'incertezza operativa per sottrazione, con con conte variabili tra 25 UFC e 75 UFC ed una conta (mediana) di 50 CFU (mediana), è stato ottenuto un risultato negativo.

Nella tabella C7 alla riga corrispondente ad un numero di duplicati 30 e UFC = 50, il limite di confidenza superiore (UCL) approssimato dell'incertezza operativa u_o è $\leq 6\%$.

Il valore di incertezza operativa è compreso tra 0% e 6%,.

Il valore massimo di incertezza operativa (in questo caso $u_o=6\%$), può essere utilizzato nel calcolo dell'incertezza di misura da associare al risultato.

unicim

84

Linea guida EURACHEM AML 2023

INCERTEZZA DI CAMPIONAMENTO ...

... come calcolarla?

E' possibile utilizzare gli **approcci di calcolo** riportati in:

1. le linee guida applicabili alle prove chimiche (*Eurachem Guide - Measurement uncertainty arising from sampling, 2nd edition, 2019*);
2. la norma ISO 29201:2012 per le prove microbiologiche per il calcolo dell'incertezza di sottocampionamento o *incertezza di matrice*;
3. la linea guida **Eurachem 2023 Accreditation for Microbiological Laboratories (Third Edition)**.



85

Incetezza di campionamento - ISO 29201:2012

L'*incetezza di matrice* dipende dalla non omogenea distribuzione dei microrganismi nel campione ed è valutabile applicando gli algoritmi di calcolo riportati nell'Annex H della norma ISO 29201:2012.

Per calcolarla, devono essere:

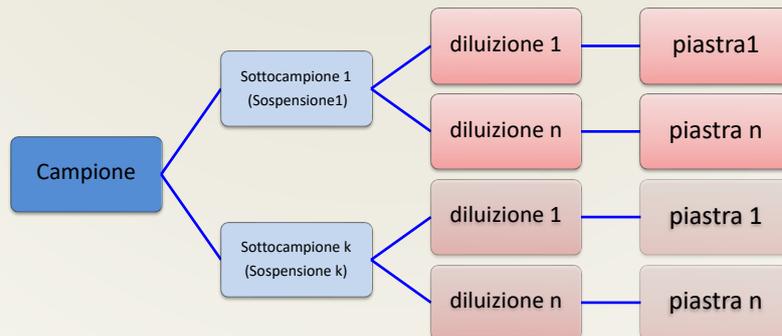
- ✓ analizzati almeno **10 campioni** di prova **dello stesso tipo**, in condizioni di ripetibilità stretta (stesso operatore, stesse condizioni analitiche, materiali, apparecchiature, etc.).
- ✓ **Da ciascun campione** devono essere prelevati almeno **2 sottocampioni**.
- ✓ **Da ciascun sottocampione** devono essere allestite almeno **2 serie di diluizioni in parallelo (prova in doppio)**.



86

Incertezza di campionamento - ISO 29201:2012

INCERTEZZA DI MATRICE



87

Incertezza di campionamento - ISO 29201:2012

Per stimare l'*incertezza di campionamento*, si può utilizzare l'approccio della norma ISO 29201:2012 Annex H, apportando le seguenti modifiche:

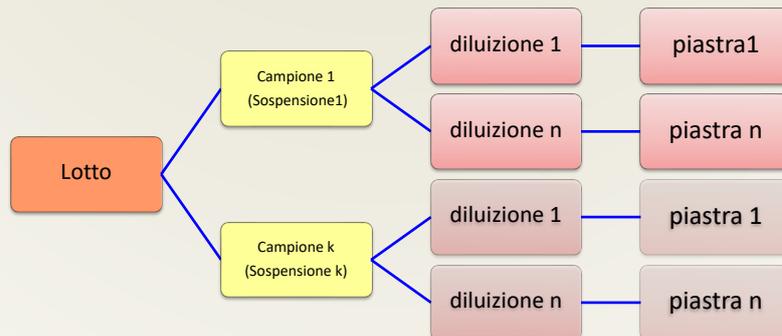
- ✓ Si deve estendere la valutazione ai campioni provenienti da almeno **10 lotti di produzione dello stesso tipo** (p.e. lotti di produzione dello stesso alimento).
- ✓ **Da ciascun lotto**, si prelevano almeno **2 campioni**.
- ✓ **Da ciascun campione**, preventivamente omogeneizzato, si preleva una porzione di prova con cui si prepara la sospensione iniziale.
- ✓ Dalla sospensione iniziale si allestiscono almeno **2 serie di diluizioni in parallelo (prova in doppio)** che costituiscono le due repliche dell'analisi.
- ✓ Le analisi devono essere condotte in condizioni di ripetibilità. La lettura dei risultati di un campione dovrebbe essere effettuata da un solo operatore. I campioni possono essere analizzati da più operatori.



88

Incertezza di campionamento - ISO 29201:2012

INCERTEZZA DI CAMPIONAMENTO



89

Incertezza di campionamento - ISO 29201:2012

Lo stesso protocollo può essere applicato anche a matrici diverse dagli alimenti come ad esempio le superfici. Per queste ultime, i lotti sono **tipologie diverse di superficie**: taglieri, contenitori, coltelli, etc.

Da ciascuna superficie, si prelevano almeno **2 campioni**.

Tamponi

Se il campionamento avviene con tampone, il **campione di prova è la sospensione microbica** ottenuta dall'immersione del tampone nel diluente, Dalla sospensione iniziale si allestiscono almeno **2 serie di diluizioni in parallelo** (prova in doppio) che costituiscono le due repliche dell'analisi.

Piastre a contatto

Se il campionamento avviene con piastra a contatto, il **campione di prova è la piastra** ottenuta dal campionamento della superficie. Ciascuno dei due prelievi può essere condotto usando **2 piastre a contatto, posizionate vicine** sulla superficie da campionare.



90

Incertezza di campionamento - ISO 29201:2012

I dati sperimentali devono essere convertiti in logaritmo naturale, come indicato nella norma ISO 29201:2012, per normalizzare statisticamente la distribuzione dei dati.

Applicando l'Analisi della varianza è possibile differenziare:

- il contributo della **varianza tra i campioni** che costituisce una stima della **precisione del campionamento**,
- dal contributo della **varianza tra le repliche** che è una stima della **precisione analitica**.



91

Tab. H1

Analisi della varianza ad una via (ANOVA), con logaritmi naturali

Risultati di 6 campioni ottenuti da un lotto

Campioni	Serie di diluizioni	Conte, n_c	$\ln n_c$	$(\ln n_c)^2$	Somma di $\ln n_c$	Quadrato della somma di $\ln n_c$
1	1	34	3,5264	12,435		
	2	45	3,8067	14,491	7,3330	53,7732
2	1	50	3,9120	15,304		
	2	61	4,1109	16,899	8,0229	64,3669
3	1	60	4,0943	16,764		
	2	72	4,2767	18,290	8,3710	70,0738
4	1	82	4,4067	19,419		
	2	70	4,2485	18,050	8,6552	74,9127
5	1	58	4,0604	16,487		
	2	64	4,1589	17,296	8,2193	67,5573
6	1	40	3,6889	13,608		
	2	59	4,0775	16,626	7,7664	60,3172
Somma			48,3679	195,669		391,001

$n = 2$

$K = 6$

CT

Fattore correttivo

194,9544

SS	somma quadrati totale	0,7148
	somma quadrati tra i campioni	0,5462
	somma quadrati tra le repliche	0,1686



92

Incertezza di campionamento - ISO 29201:2012

Tab. H.2 **Analisi della varianza**

Source of variation	DF	DF	SS	MS	Stima	F ^{stat}	P
Tra campioni	(k - 1) = 5	5	0,5462	0,1092	$s^2 + n s_B^2$	3,89	0,06435
Tra le repliche	k (n-1) = 6	6	0,1686	0,0281	s^2		
Totale	(kn - 1) = 11	11	0,7148				

DF	gradi di libertà	0,0406	varianza di campionamento
SS	Somma dei quadrati	20,1%	Incertezza relativa di campionamento
MS	Media dei quadrati		

La varianza s^2 è una *misura della variazione media tra diluizioni duplicate della stessa sospensione iniziale* che comprende l'incertezza distribuzione e tutti gli altri componenti operativi di incertezza tranne l'incertezza di campionamento.

La varianza di campionamento s_B^2 si ottiene dal calcolo

$$s_B^2 = \frac{0,1092 - 0,0281 \cdot 2}{2} = 0,0406$$

ed essendo espressa in logaritmo naturale, s_B corrisponde **all'incertezza relativa di campionamento**.

$$u_{rel,M} = 0,20 = 20 \%$$



93

Incertezza di campionamento - ISO 29201:2012

Per avere un valore rappresentativo dell'incertezza relativa di campionamento, che tenga conto del contributo dei 10 lotti per gli alimenti o delle 10 superfici diverse, **si deve effettuare la radice quadrata della media delle 10 varianze di campionamento**.

Il passaggio al logaritmo decimale si effettua dividendo il risultato per 2,303.

L'incertezza di campionamento può essere sommata alle altre componenti di incertezza di misura (operativa, matrice, distribuzione, etc.).

La somma tra i diversi contributi avviene come somma di varianze.

Dalla radice quadrata della somma, si ottiene l'incertezza composta.

$$u_c(y) = \sqrt{u_{tec}^2 + u_{matrix}^2 + u_{poisson}^2 + u_{camp}^2}$$



94

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

Allegato D – Incertezza di campionamento

Per basse conte ($UFC < 20$) l'incertezza analitica $u_{analitica}$ è elevata; quindi, nella maggior parte dei casi l'incertezza di campionamento può non essere considerata nel calcolo dell'incertezza di misura.

L'incertezza del campionamento è calcolata come differenza rispetto alla variabilità totale, u_{meas} secondo l'equazione di seguito riportata:

$$u_{samp} = \sqrt{u_{meas}^2 - u_{anal}^2}$$

$$\text{where } u_{anal} = \sqrt{u_a^2 + u_o^2 \dots}$$



95

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

Il numero minimo di campioni duplicati da analizzare è 8, ma se u_{samp} è inferiore a $u_{analitica}$ si consiglia l'analisi di più campioni duplicati (30-40).

L'incertezza analitica $u_{analitica}$ in microbiologia spesso è relativamente elevata, per questo può essere difficile da stimare l'incertezza del campionamento u_{samp} .

Se l'incertezza analitica ($u_{analitica}^2$) è maggiore dell'incertezza di misura (u_{meas}^2) si ottiene per sottrazione un valore negativo di incertezza di campionamento u_{samp} .

La sperimentazione per stimare l'incertezza del campionamento consiste nel prelevare diversi campioni duplicati che vengono analizzati in doppio.

Si riporta di seguito un esempio con un'incertezza di campionamento uguale a «zero».



96

Incerteza di campionamento – AML Eurachem 2023

D3 Stima dell'incerteza di campionamento

Esempio

- **Campione di acqua di sorgente contaminata, campionata dallo stesso pozzo.**
- 10 campioni sono stati prelevati in doppio (C1 e C2) in 10 giorni diversi.
- Ciascun campione C1 e C2 è stato testato in parallelo (C1.1/C1.2; C2.1/C2.2). Analisi effettuata da parte di diversi operatori, utilizzando lo stesso lotto di materiali di consumo e lo stesso incubatore.
- Parametro determinato: Batteri coliformi mediante filtrazione su membrana (ISO 9308-1:2014)
- I risultati sono riportati nella Tabella D 1. La media aritmetica è 35 UFC e la mediana è 31 UFC.



97

Incerteza di campionamento – AML Eurachem 2023

Table D 1 – Test results for ten different samples taken in duplicate on 10 different days. Each sample C1 and C2 was tested in parallel, for Coliform bacteria with membrane filtration

Sample C 1		Sample C 2	
CFU C _{1.1}	CFU C _{1.2}	CFU C _{2.1}	CFU C _{2.2}
63	45	41	45
37	26	28	30
21	23	31	30
18	20	24	18
18	14	14	18
68	45	40	67
62	42	42	46
29	20	17	19
41	28	41	32
61	50	50	48



98

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

D4 Calcoli

I risultati ottenuti sono stati inseriti nel **foglio di calcolo RANOVA3** (scaricabile liberamente dal sito <https://www.rsc.org>). In microbiologia è raccomandato l'utilizzo del test **ANOVA classico**.

I contributi di incertezza di campionamento, analitica (incertezza di distribuzione e operativa) e di misura (incertezza analitica e di campionamento) sono riportati di seguito. Si è ottenuta un'incertezza di campionamento pari a "zero".

Figure D 1 – Output from AMC software RANOVA3 using data in Table D 1 as input

Classical ANOVA				
Mean	35.3	No. Targets		10
Total Sdev	16.473			
	<u>Btn Target</u>	<u>Sampling</u>	<u>Analysis</u>	<u>Measure</u>
Standard deviation	14.299	0	8.1792	8.1792
% of total variance	75.35	0.00	24.65	24.65
Expanded relative uncertainty (95%)		0.00	46.34	46.34
	Uncertainty Factor (95%)	1	1.4683	1.4683



99

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

Assumendo una distribuzione log-normale, si utilizza il *Fattore di incertezza* FU calcolato con l'approccio **ANOVA classico** per calcolare l'incertezza analitica.

Per calcolare l'incertezza analitica composta in logaritmo decimale si utilizza la seguente equazione:

$$u_{anal.log10} = (\log^F U) / 2 = (\log 1.47) / 2 = 0.084$$

E in logaritmo naturale si ottiene:

$$u_{anal} = u_{anal.log10} \times \ln(10) = 0.084 \times 2.303 = 0.19$$

... che corrisponde ad un'incertezza analitica composta relativa del 19%.

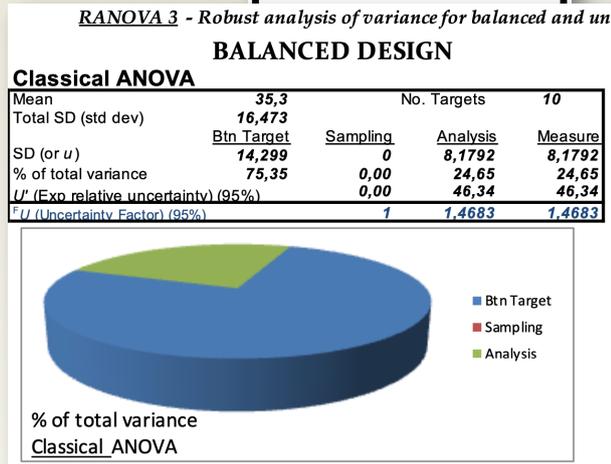


100

Incertezza di campionamento
AML Eurachem 2023

Data input area

ID (Opt)	Sample 1		Sample 2	
	Analysis1	Analysis2	Analysis1	Analysis2
1	63	45	41	45
2	37	26	28	30
3	21	23	31	30
4	18	20	24	18
5	18	14	14	18
6	68	45	40	67
7	62	42	42	46
8	29	20	17	19
9	41	28	41	32
10	61	50	50	48



101

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

D5 Stima del limite superiore di confidenza dell'incertezza di campionamento quando l'incertezza di campionamento è «zero».

L'incertezza di campionamento estesa è probabilmente inferiore a un determinato valore. Questo valore è il *limite superiore di confidenza* dell'incertezza di campionamento uguale a «zero».

Il software **foglio di calcolo RANOVA3** calcola anche i limiti di fiducia per le incertezze estese (CI RANOVA). La figura D2 riporta i limiti di confidenza per l'incertezza di campionamento.

Figure D 2 – Output from AMC software RANOVA3 where confidence limits are added as additional information

Classical ANOVA		No. Targets	
Mean	35.3	Confidence limits	Confidence limits
Total Sdev	16.473 (11.945, 27.498)		
	Btn Target	Sampling	
Standard deviation	14.299 (9.2055, 26.537)	0 (0, 8.5372)	
% of total variance	75.35	0.00	
Expanded relative uncertainty (95%)		0.00 (0, 48.37)	
Uncertainty Factor (95%)		1 (0, 1.4932)	



102

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

Assumendo una distribuzione log-normale, si utilizza *il limite superiore di confidenza del Fattore di incertezza $^F U$* per calcolare *il limite superiore di confidenza dell'incertezza di campionamento*.

Per calcolare tale limite superiore in logaritmo decimale si utilizza la seguente equazione:

$$\hat{u}_{\log} = (\log^F U)/2 = (\log 1.49)/2 = 0.087$$

E in logaritmo naturale il limite superiore di confidenza dell'incertezza di campionamento è:

$$\hat{u}_{\text{samp}} = \hat{u}_{\log} \times \ln(10) = 0.087 \times 2.303 = 0.20 \approx 20 \%$$



103

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

Questa stima ***non è l'incertezza di campionamento***.

Si è inizialmente stimata un'incertezza di campionamento di «zero» che è probabilmente compresa tra 0% e 20%.

Per ridurre tale range, si devono prelevare più campioni duplicati.

Prelevando e analizzando 40 campioni in duplicato anziché 10, nelle stesse condizioni sperimentali, con una media di 35 UFC, il limite superiore di confidenza di campionamento risulta circa uguale all'11 %.



104

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

In conclusione ...

- L'incertezza di campionamento può essere stimata con il test ANOVA utilizzando i risultati di campioni duplicati.
- Tuttavia, poiché l'incertezza di campionamento è calcolata come differenza tra incertezza di misura e incertezza analitica, è difficile stimare un'incertezza di campionamento quando l'incertezza analitica è elevata (ad esempio nel caso di basse conte).
- Per tale ragione l'incertezza di campionamento ha quindi un'elevata «incertezza».
- Quando l'incertezza di campionamento è «zero» è possibile riportare solo un limite di confidenza superiore. Ciò significa che l'incertezza di campionamento è compresa tra zero e il limite di confidenza superiore.



105

Incertezza di campionamento – AML Eurachem 2023

La norma consiglia di procedere come segue per il calcolo dell'incertezza di campionamento:

1. analizzare campioni con valori di UFC più elevati. L'incertezza di distribuzione (che fa parte dell'incertezza analitica) diminuisce con conte più alte;
2. analizzare almeno 30 campioni duplicati.

Quando l'incertezza di campionamento è «zero» anche utilizzando più campioni duplicati, ad esempio 40, il contributo dell'incertezza di campionamento può essere considerato trascurabile.

Se ad esempio il contributo dell'incertezza analitica corrisponde a 19 % e l'incertezza di campionamento è pari a 11%, l'incertezza di misura (campionamento + analitica) sarà

solo del 22 % ($u_{meas} = \sqrt{u_{camp}^2 + u_{analitica}^2} = \sqrt{0,11^2 + 0,19^2} = 0,22 = 22\%$).

In questo caso, si può assumere che $u_{meas} \approx u_{analitica}$.



106

Grazie per l'attenzione!

unicim

107