



UNI EN ISO 19036:2020  
MICROBIOLOGIA  
DELLA CATENA ALIMENTARE  
STIMA DELL'INCERTEZZA DI MISURA  
PER DETERMINAZIONI QUANTITATIVE

4 MAGGIO 2022

## PRESENTAZIONE

La norma UNI EN ISO 19036 specifica i requisiti e fornisce indicazioni per la stima e l'espressione dell'incertezza di misura associate ai risultati quantitativi nella microbiologia della catena alimentare. Ai fini dell'accreditamento, in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018, ai laboratori viene richiesto di associare al risultato di prova il valore dell'incertezza di misura in quanto rappresenta un elemento distintivo dell'adeguatezza del metodo analitico impiegato, contribuendo alla validità di tutte le informazioni correlate al risultato analitico stesso. La UNI EN ISO 19036 è stata revisionata nel 2020, aggiungendo nuove disposizioni per la stima dell'incertezza tecnica, così come per altre fonti pertinenti di incertezza coinvolte nelle prove microbiologiche quantitative. Nel presente corso vengono affrontate, con approccio logico, le novità introdotte dalla nuova revisione della norma e illustrate, con esempi pratici, i criteri di scelta delle diverse metodologie proposte dalla norma stessa per il calcolo dell'incertezza di misura.

## OBIETTIVI

Il corso ha lo scopo di illustrare le novità introdotte dalla UNI EN ISO 19036:2020 per il calcolo dell'incertezza di misura, per consentire ai laboratori che effettuano analisi sulla matrice alimenti, di allinearsi ai nuovi requisiti di norma.

## DESTINATARI

Il corso è rivolto al personale coinvolto nei processi di garanzia della validità dei risultati nei laboratori di prova microbiologici e al personale responsabile della formulazione dei giudizi di conformità nei rapporti di prova.

## DOCENTE

**MONICA MALAGOLI**- Consulente per la qualità e la sicurezza alimentare. Ispettore Accredia Dipartimento Certificazione e Ispezione

# CONDIVIDIAMO IL NOSTRO PATTO D'AULA

-Conosciamoci: iniziamo con un giro di presentazione. Ognuno di noi potrà dire di cosa si occupa, in quale ambito lavora, quali aspettative ha rispetto al corso. Se il corso si svolge da remoto rendiamoci riconoscibili scrivendo il nostro nome e cognome nella nostra finestra di Zoom

-Partecipiamo attivamente e confrontiamoci: il corso è un momento di apprendimento che passa anche dal confronto con il docente e i partecipanti. Facciamo domande, chiediamo chiarimenti, ascoltiamo i contributi di tutti

-Utilizziamo gli strumenti in modo consapevole: se il corso si svolge da remoto teniamo preferibilmente accesa la webcam; silenziamo il microfono quando non stiamo parlando; alziamo la mano per richiedere la parola; usiamo la chat se indicato dal docente. Se il corso si svolge in presenza, alziamo la mano per richiedere la parola

-Stabiliamo insieme le pause e rispettiamo le

-Evitiamo distrazioni: per quanto possibile, silenziamo il telefono ed evitiamo di leggere mail o messaggi. Durante le pause avremo modo di gestire eventuali urgenze

-Contribuiamo al miglioramento dei corsi UNITRAIN: al termine del corso, compiliamo il questionario di customer satisfaction e forniamo eventuali suggerimenti di miglioramento

-Per il rispetto della privacy di tutti, non ci è permesso effettuare registrazioni audio, video o acquisire screenshot

## IL TEAM UNITRAIN SI IMPEGNA A:

-Inviarvi il materiale didattico

-Elaborare ed inviare l'attestato di partecipazione a chi abbia frequentato almeno il 90% dell'ammontare ore del corso. UNITRAIN si riserva la facoltà di verificare, a campione, l'effettiva partecipazione al corso attraverso appelli intermedi.



# Obiettivi del corso

Il corso ha lo scopo di illustrare le novità introdotte dalla UNI EN ISO 19036:2020 per il calcolo dell'incertezza di misura, per consentire, ai laboratori che effettuano analisi sulla matrice alimenti, di allinearsi ai nuovi requisiti di norma.

# Programma del corso

Presentazione della nuova norma e della sua struttura  
Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020  
Focus sulle novità introdotte dalla nuova revisione

# Obiettivi del corso

Il corso ha lo scopo di illustrare le novità introdotte dalla UNI EN ISO 19036:2020 per il calcolo dell'incertezza di misura, per consentire, ai laboratori che effettuano analisi sulla matrice alimenti, di allinearsi ai nuovi requisiti di norma.

# Programma del corso

Presentazione della nuova norma e della sua struttura  
Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020  
Focus sulle novità introdotte dalla nuova revisione

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, ai fini dell'accreditamento dei laboratori di prova, richiede di associare al risultato di prova il valore dell'incertezza di misura, in quanto essa rappresenta un elemento distintivo dell'adeguatezza del metodo impiegato, contribuendo alla validità di tutte le informazioni correlate al risultato analitico.

ACCREDIA RT-08 rev. 4 del 9 Aprile 2018, Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori di prova, che definisce i criteri generali per l'accreditamento dei Laboratori di prova da parte del Dipartimento Laboratori di prova di ACCREDIA

# UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.8.3

## Requisiti specifici per i rapporti di prova

In aggiunta ai requisiti elencati al punto 7.8.2, i rapporti di prova devono comprendere, ove

necessario per l'interpretazione dei risultati, quanto segue:

a) informazioni circa particolari condizioni di prova, quali le condizioni ambientali;  
b) ove pertinente, una dichiarazione di conformità a requisiti specifici (vedere punto 7.8.6);

c) ove applicabile, l'incertezza di misura riportata nella stessa unità di misura del misurando

o in termini relativi rispetto al misurando stesso (per esempio in percentuale), quando:

- essa è rilevante per la validità o l'utilizzo dei risultati di prova;
- è richiesta dal cliente, o
- influisce sulla conformità rispetto ad un limite di specifica;
- ....

## UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.6.1

I laboratori devono identificare i contributi all'incertezza di misura. Quando si valuta l'incertezza di misura si deve tener conto di tutti i contributi significativi, compresi quelli derivanti dal campionamento, utilizzando appropriati metodi di analisi.

## UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.6.3

Un laboratorio che esegue prove deve valutare l'incertezza di misura. Quando il metodo di prova preclude una valutazione rigorosa dell'incertezza di misura, deve essere fatta una stima basata sulla conoscenza dei principi teorici o sull'esperienza pratica circa le prestazioni del metodo.

## ACCREDIA RT-08 rev. 4 p.to 7.6.1

Si applica il requisito di norma.

## ACCREDIA RT-08 rev. 4 p.to 7.6.3

Quando un metodo non sviluppato dal Laboratorio riporta i parametri statistici della validazione (scarto tipo di ripetibilità e scarto tipo di riproducibilità) e il Laboratorio decide di utilizzarli per il calcolo dell'incertezza di misura, deve verificare almeno che le proprie prestazioni sono compatibili con quelle indicate (es. ripetibilità, esattezza).

## UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.2.1.5

Il laboratorio deve verificare di essere in grado di eseguire correttamente i metodi prima di metterli in opera, assicurando di poter conseguire le prestazioni richieste. Devono essere conservate le registrazioni di tale verifica.

## ACCREDIA RT-08 rev. 4 p.to 7.2.1.5

Qualora le caratteristiche prestazionali dei metodi non siano state definite, il Laboratorio deve determinarle.

Il Laboratorio deve verificare di mantenere nel tempo le prestazioni richieste.

# UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.2.2.3

Le caratteristiche prestazionali dei metodi validati, come valutate per l'utilizzo previsto, devono tener conto delle esigenze del cliente ed essere coerenti con i requisiti specificati.

*Tra le caratteristiche prestazionali si possono citare, in termini non esaustivi: il campo di misura, l'**accuratezza**, l'**incertezza di misura dei risultati**, il limite di rivelabilità, il limite di quantificazione, la selettività del metodo, la linearità, la **ripetibilità o la riproducibilità**, la robustezza rispetto alle influenze esterne o la sensibilità incrociata rispetto alle interferenze dovute alla matrice del campione o dell'oggetto da sottoporre a prova, lo scostamento sistematico (*bias*).*

# Ripetibilità

Precisione in condizioni di ripetibilità.

## Condizioni di ripetibilità

Condizioni nelle quali risultati di prova indipendenti vengono ottenuti con lo stesso metodo su un identico materiale, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore, usando la stessa apparecchiatura e in intervallo di tempo brevi.

# Precisione

Grado di concordanza tra risultati di prova indipendenti ottenuti nelle condizioni stabilite.

- Dipende solo dalla distribuzione di errori casuali
- Espressa in termini di imprecisione
- Calcolata come **scarto tipo dei risultati di prova** (una precisione minore è rappresentata da uno scarto tipo più grande)

La precisione può essere calcolata come **scarto tipo di ripetibilità**, da una serie di misure ripetute in condizioni di ripetibilità

$$S_r = \sqrt{\sum (c_i - c_{\text{medio}})^2 / n - 1}$$

# Accuratezza

Grado di concordanza tra un risultato di prova e un valore di riferimento (valor vero).

- Dipende non solo dalla distribuzione di errori casuali ma anche da errori sistematici

Mentre la precisione indica la «distanza» dei valori di prova dal valore medio, l'accuratezza indica la «distanza» dal valore vero.

# Giustizia

Assenza di errori sistematici

## UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.2.1.5

Il laboratorio deve verificare di essere in grado di eseguire correttamente i metodi prima di metterli in opera, assicurando di poter conseguire le prestazioni richieste. Devono essere conservate le registrazioni di tale verifica.

Confronto del proprio  $S_r$  con quello del metodo

## ACCREDIA RT-08 rev. 4 p.to 7.2.1.5

Qualora le caratteristiche prestazionali dei metodi non siano state definite, il Laboratorio deve determinarle.

Il Laboratorio deve verificare di mantenere nel tempo le prestazioni richieste.

# Controlli intralaboratorio

Pianificare ed eseguire prove in doppio riportando i risultati in carte di controllo con i limiti specificati dal metodo o calcolati dal laboratorio (ripetibilità) o con valori di  $K_p$ .

Tramite queste verifiche periodiche, il laboratorio può dimostrare di mantenere nel tempo e nelle condizioni di routine le prestazioni determinate e/o verificate in sede di validazione/verifica dei metodi.

## UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.7.1

Il laboratorio deve disporre di una procedura per monitorare la validità dei risultati. I dati risultanti devono essere registrati in modo tale che le tendenze siano rilevabili e, ove praticabile, devono essere applicate tecniche statistiche per riesaminare i risultati. Tale monitoraggio deve essere pianificato e riesaminato e deve comprendere, ove appropriato, in termini non esaustivi, quanto segue:

a) utilizzo di materiali di riferimento o materiali di controllo qualità;

...

## UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.7.2

Quando possibile e appropriato, il laboratorio deve monitorare le proprie prestazioni mediante il confronto con i risultati di altri laboratori. Questo monitoraggio deve essere pianificato e riesaminato e deve comprendere, in termini non esaustivi, una delle attività di seguito elencate o entrambe:

- a) partecipazione a prove valutative interlaboratorio;
- b) partecipazione a confronti interlaboratorio diversi dalle prove valutative interlaboratorio.

# Controlli esterni

La partecipazione a **circuiti interlaboratorio** e l'utilizzo di **materiali di riferimento certificati** permette al laboratorio di avere una indicazione delle proprie prestazioni e di verificare la propria accuratezza confrontandosi, nel primo caso, con l'attività effettuata anche da altri laboratori.

# UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 p.to 7.7.1

Il laboratorio deve disporre di una procedura per monitorare la validità dei risultati. I dati risultanti devono essere registrati in modo tale che le tendenze siano rilevabili e, ove praticabile, devono essere applicate tecniche statistiche per riesaminare i risultati.

Gestione dei risultati con carte di controllo.

# INCERTEZZA DI MISURA

Il termine incertezza di misura (MU) è utilizzato per indicare la mancanza di accuratezza (giustezza e precisione) che può essere associata ai risultati di un'analisi.

In microbiologia quantitativa, fornisce una indicazione del grado di fiducia che può essere attribuito alle stime di laboratorio dei numeri di microrganismi negli alimenti e in altre matrici.

# Presentazione della nuova norma UNI EN ISO 19036:2020 della sua struttura

## Premessa ISO

La presente prima edizione annulla e sostituisce la ISO/TS 19036:2006, che è stata tecnicamente revisionata.

Riporta inoltre le principali modifiche

## Introduzione

Definizione di incertezza di misura (MU).

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

## Introduzione

La ISO/IEC Guide 98-3 (nota anche come "GUM") è un documento di riferimento ampiamente adottato. L'approccio principale della ISO/IEC Guide 98-3 è costruire un modello di misura matematico o computerizzato che descriva in modo quantitativo la relazione tra la grandezza misurata (il misurando) e ogni grandezza da cui essa dipende (grandezze in ingresso). Tale modello di misura è quindi utilizzato per dedurre l'incertezza nel misurando dalle incertezze delle grandezze in ingresso.

La ISO/IEC Guide 98-3 riconosce che potrebbe non essere possibile stabilire una relazione matematica esauriente tra il misurando e le singole grandezze in ingresso e che in questi casi l'effetto di più grandezze in ingresso può essere valutato come un gruppo. La ISO/IEC 17025 riconosce inoltre che la natura del metodo di prova può precludere il calcolo rigoroso dell'incertezza di misura.

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

## Introduzione

Nel caso dell'analisi microbiologica di campioni della catena alimentare, non è possibile costruire un modello di misura quantitativa esauriente, dato che non è possibile quantificare accuratamente il contributo di ciascuna grandezza in ingresso, dove:

- l'analita è un organismo vivente, il cui stato fisiologico può essere ampiamente variabile;
- l'obiettivo analitico comprende ceppi diversi, specie diverse o generi diversi;
- molte grandezze in ingresso sono difficili, se non impossibili, da quantificare (per esempio, stato fisiologico);
- per molte grandezze in ingresso (per esempio temperatura, attività dell'acqua), il loro effetto sul misurando non può essere descritto quantitativamente con adeguata precisione.

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

## Introduzione

Per i motivi sopra indicati, il presente documento utilizza principalmente un approccio dall'alto verso il basso o globale alla MU, nel quale il contributo di molte grandezze in ingresso è stimato come uno scarto tipo della riproducibilità del risultato finale del processo di misurazione, calcolato da risultati sperimentali con replica delle stesse analisi, come parte del processo di misurazione. Queste grandezze riflettono la variabilità operativa e il risultato nell'incertezza tecnica. Nella microbiologia quantitativa della catena alimentare, i valori assegnati o i valori delle grandezze di riferimento non sono solitamente disponibili, così lo scostamento (che esprime quantitativamente la mancanza di giustezza) non può essere stimato in modo affidabile e non è incluso nell'incertezza stimata dal presente documento.

# EURACHEM

## ACCREDITATION FOR MICROBIOLOGICAL LABORATORIES Ed. 2013 p.to 6.2

I metodi microbiologici generalmente rientrano nella categoria di quelli che precludono il rigoroso calcolo metrologicamente e statisticamente valido di incertezza di misura come descritto nella GUM. È generalmente appropriato basare la stima dell'incertezza di misura sui dati di ripetibilità e precisione intermedia (riproducibilità intralaboratorio). Le singole componenti dell'incertezza dovrebbero essere identificate, dimostrato di essere sotto controllo e valutato il loro contributo alla variabilità dei risultati. Alcune componenti (come pesatura, effetti di diluizione, incubazione) possono essere valutati al fine di dimostrarne il contributo trascurabile al valore complessivo dell'incertezza di misura.

# EURACHEM

## ACCREDITATION FOR MICROBIOLOGICAL LABORATORIES Ed. 2013 p.to 6.3

Ci si aspetta che i laboratori microbiologici accreditati, abbiano una buona consapevolezza della distribuzione degli organismi all'interno delle matrici testate e che ne tengano conto durante il sotto-campionamento seguendo buone pratiche di laboratorio e / o requisiti normativi ove applicabili. Tuttavia, non è sempre praticabile includere tale componente all'incertezza di misura, a meno che il cliente non richieda altrimenti. Queste sono le ragioni: 1) l'incertezza dovuta alla distribuzione dei microrganismi all'interno della matrice del prodotto non è un funzione delle prestazioni del laboratorio e può essere unica del campione testato; i metodi di prova dovrebbero specificare la dimensione del campione da utilizzare, in considerazione della scarsa omogeneità.

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

## Introduzione

Sebbene la riproducibilità fornisca una stima generale dell'incertezza associata al metodo di misurazione, essa potrebbe non riflettere le caratteristiche associate all'incertezza della matrice, risultante dalla distribuzione dei microrganismi nella matrice alimentare.

Inoltre, le misure microbiologiche spesso dipendono dalla conta o dalla ricerca di numeri molto piccoli di organismi, che sono distribuiti in modo più o meno casuale generando una variabilità intrinseca tra i replicati e una corrispondente incertezza della distribuzione. Per le tecniche di conta delle colonie, è determinata l'incertezza di Poisson, alla quale può essere sommata, in certi casi, un'incertezza collegata alle prove di conferma utilizzate per identificare organismi isolati.

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

## Introduzione

È inoltre richiesta una componente di incertezza aggiuntiva per le determinazioni del numero più probabile (MPN). Le componenti relative all'incertezza della distribuzione pertinenti, stimate dalla teoria statistica, sono calcolate da singoli dati sperimentali.

Questi tre diversi tipi di incertezza (incertezze tecnica, della matrice e della distribuzione) sono combinate utilizzando i principi della ISO/IEC Guide 98-3. Questo approccio è simile a quello seguito dalla ISO 29201 nel campo della microbiologia dell'acqua.

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

## Introduzione

L'incertezza tecnica è spesso la componente più rilevante delle tre ed è stimata da uno scarto tipo della riproducibilità, che include inevitabilmente alcuni contributi degli altri due tipi. La stima preferita dell'incertezza tecnica si basa sulla riproducibilità intralaboratorio, allo stesso modo della ISO 16140-3.

Se coerente con i protocolli del laboratorio e i requisiti del cliente, un valore generale di incertezza può essere riportato sulla base esclusivamente di uno scarto tipo della riproducibilità.

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

In altri punti (capitolo 4 p.to b; capitolo 8 p.to 8.1.1 e soprattutto p.to 8.1.3), la norma precisa che tale opzione per il calcolo della MU è applicabile *se coerente con i protocolli del laboratorio e i requisiti del cliente*. Si vuole pertanto sottolineare che tale scelta deve prevedere che ci sia una presa in carico della stessa da parte del laboratorio nelle proprie procedure e che lo stesso laboratorio trovi il consenso dei propri clienti.

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

Scopo e campo di applicazione

Il presente documento specifica i requisiti e fornisce indicazioni per la stima e l'espressione della MU associata ai risultati quantitativi nella microbiologia della catena alimentare.

È applicabile all'analisi quantitativa di:

- prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione degli animali;
- campioni ambientali nell'area della produzione e della manipolazione degli alimenti;
- campioni nella fase di produzione primaria.

L'analisi quantitativa è eseguita generalmente mediante la conta dei microrganismi utilizzando una tecnica di conta delle colonie.

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

## Scopo e campo di applicazione

Il presente documento inoltre è applicabile generalmente ad altre analisi quantitative, comprese:

- tecniche del numero più probabile (MPN);
- metodi strumentali, come per esempio impedometria adenosina trifosfato (ATP) e citometria di flusso;
- metodi molecolari, come per esempio metodi basati sulla reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR).

L'incertezza stimata mediante il presente documento non comprende gli effetti sistematici (scostamento).

# Presentazione della nuova norma e della sua struttura

Riferimenti	Non contiene riferimenti normativi
Termini, definizioni, simboli	Nell'elencazione dei termini, delle definizioni e dei simboli utilizzati fa riferimento alle fonti da cui sono tratti.
Considerazioni generali	Introduce le novità della norma

# Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020 e novità della nuova norma

La nuova edizione della UNI EN ISO 19036 modifica sensibilmente la metodologia di stima della MU rispetto alla precedente edizione. Combina e introduce infatti il calcolo di alcune componenti di incertezza quali quelle determinate da aspetti analitici, della matrice e della distribuzione delle cellule microbiche. Il campo della norma è stato inoltre esteso.

La presente prima edizione annulla e sostituisce la ISO/TS 19036:2006, che è stata tecnicamente revisionata.

# Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020 e novità della nuova norma

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

- sono state aggiunte delle disposizioni per la stima **dell'incertezza tecnica**, così come per altre fonti pertinenti di incertezza coinvolte nelle prove microbiologiche quantitative riguardanti:
  - **l'incertezza della matrice** (cioè l'incertezza relativa alla dispersione dei microbi all'interno dell'effettiva matrice di prova);
  - **l'incertezza di Poisson** nelle tecniche di conta delle colonie;
  - **l'incertezza di conferma** associata alle prove per confermare l'identità di specifici organismi a seguito di una conta di organismi presunti;
  - **l'incertezza** associata alle stime del **numero più probabile** (MPN);

# Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020 e novità della nuova norma

- il progetto sperimentale per la stima dello scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio descritto nel presente documento in relazione all'incertezza tecnica è ora lo stesso progetto descritto nella ISO 16140-3 per la verifica dei metodi quantitativi;
- sono stati aggiunti esempi pratici per illustrare i modi in cui le stime dell'incertezza dovrebbero essere generate e riportate;
- sono state aggiunte delle appendici per dettagliare alcune delle procedure importanti o alternative e alcuni dei problemi associati alla stima dell'incertezza.

# Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020 e novità della nuova norma

## Considerazioni generali

## Introduce le novità della norma

La MU associata ad ogni valore di misura comprende più componenti. Come indicato nello scopo e campo di applicazione (vedere punto 1), l'incertezza stimata mediante il presente documento non comprende contributi da effetti sistematici (scostamento). Nella microbiologia quantitativa della catena alimentare, i valori assegnati o i valori delle grandezze di riferimento non sono solitamente disponibili, così lo scostamento non può essere stimato in modo affidabile.

Il presente documento considera tre diversi tipi di componenti di incertezza:

- incertezza tecnica;
- incertezza della matrice;
- incertezza della distribuzione.

# Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020 e novità della nuova norma

**L'incertezza tecnica** deriva dalla variabilità operativa ed è stimata, utilizzando un approccio globale, da uno scarto tipo della riproducibilità del risultato finale del processo di misurazione (vedere punto 5). Questo approccio globale indica che la stima dell'incertezza tecnica deriva dai risultati di prova finali anziché dal calcolo che utilizza le stime dell'incertezza in ogni singola fase della prova.

**L'incertezza della matrice** deriva dall'imperfetta miscelazione del campione di laboratorio, con conseguente scarsa riproducibilità dei livelli microbici tra le porzioni di prova, che possono essere grandi per matrici solide, e specialmente per i prodotti alimentari composti. L'incertezza della matrice è stimata per ciascun tipo di matrice (vedere punto 6).

# Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020 e novità della nuova norma

Anche per i materiali omogenei, la distribuzione casuale dei microorganismi comporta l'**incertezza della distribuzione** (vedere punto 7), nel presente documento ne sono presi in considerazione tre potenziali tipi.

La rilevanza di ciascuno dipende dal metodo utilizzato:

- per le tecniche di conta delle colonie:
- incertezza di Poisson (vedere punto 7.2),
- incertezza di conferma (vedere punto 7.3);
- per tecniche MPN: incertezza dell'MPN (vedere punto 7.4).

L'incertezza per ciascuna fonte di incertezza della distribuzione è stimata matematicamente.

# Principali differenze tra le edizioni ISO/TS 19036:2006 e UNI EN ISO 19036:2020 e novità della nuova norma

Il presente documento presenta due opzioni per la stima dell'incertezza composta per una misura riportata.

- a) Le componenti di incertezza tecnica, della matrice e della distribuzione per un valore riportato possono essere stimate separatamente l'una dall'altra (vedere punti 5, 6 e 7), successivamente le tre componenti sono combinate (vedere punto 8.1.2).
- b) Un valore di incertezza generale può essere riportato sulla base esclusivamente di uno scarto tipo della riproducibilità, se coerente con i protocolli di laboratorio e i requisiti del cliente (vedere punto 8.1.3). L'incertezza tecnica è spesso la maggiore delle tre componenti di incertezza.

Il secondo approccio considera i dati di riproducibilità intralaboratorio come già previsto nella edizione 2006 della ISO/TS 19036, anche se l'applicazione risulta semplificata.

# Focus sulle novità introdotte dalla nuova

Capitolo 5

INCERTEZZA TECNICA

Capitolo 6

INCERTEZZA DI MATRICE

Capitolo 7

INCERTEZZA DELLA DISTRIBUZIONE

Capitolo 8

INCERTEZZA COMPOSTA ED ESTESA

Capitolo 9

ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA DI MISURA NEL RAPPORTO DI PROVA

Annex

APPENDICI

# INCERTEZZA TECNICA

Indipendentemente dall'approccio scelto, la stima della MU avviene sulla base dello scarto tipo di riproducibilità dei dati analitici.

Il protocollo proposto dalla norma per il calcolo dello scarto tipo di riproducibilità, esclude **campionamento** e l'errore sistematico dell'analisi (bias), non facile da valutare per le prove microbiologiche.

## Incertezza di campionamento

L'incertezza di campionamento, cioè quella associata al prelievo di un campione di laboratorio da un lotto o batch, può contribuire in modo significativo all'incertezza complessiva, ma non fa parte dell'incertezza legata alla misurazione stessa e non è trattata dalla norma ISO 19036.

L'incertezza della matrice che deriva dall'incapacità della porzione di prova di rappresentare perfettamente un campione di laboratorio o un campione di prova eterogeneo è trattata nel punto 6. L'entità di una tale incapacità può dipendere dalla dimensione della porzione di prova prelevata.

# INCERTEZZA TECNICA

Il protocollo proposto dalla norma per il calcolo dello scarto tipo di riproducibilità, esclude campionamento e l'errore sistematico dell'analisi (bias), non facile da valutare per le prove microbiologiche

## Errore sistematico (bias)

Differenza tra il valore medio dei risultati della misurazione e il valore di riferimento accettato

Generalmente non viene valutato in microbiologia come componente della MU. Questo in considerazione della natura empirica dei conteggi che non permettono di stabilire il valore di riferimento accettato che è richiesto per valutare lo scostamento.

Non essendo formalmente stimato come componente dell'incertezza, occorre dimostrare di tenere sotto controllo ad esempio mediante la partecipazione a circuiti interlaboratorio e/o con l'utilizzo di Materiale di Riferimento Certificati.

# INCERTEZZA TECNICA

## Fattori critici

Esempi di fattori tecnici critici che possono influenzare l'incertezza e necessitano di essere controllati comprendono: l'origine e il tipo dei terreni di coltura e/o di altri reagenti (come per esempio quelli utilizzati per la conferma), la diluizione, le procedure di inoculazione e incubazione, le tecniche di conta (manuali o automatizzate) e i cambi di operatore o del gruppo di operatori, ecc.

# INCERTEZZA TECNICA

L'incertezza tecnica è stimata usando un approccio globale, partendo dallo scarto tipo di riproducibilità  $S_R$  sul risultato finale della misurazione.

E' una caratteristica del metodo ed è stimata per uno specifico metodo di prova: non può essere applicata ad altri metodi.

E' quindi necessario effettuare una stima continua dell'incertezza per dimostrare che l'incertezza calcolata rimane adeguata e che i risultati ottenuti routinariamente sono validi.

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

# INCERTEZZA TECNICA

Nel presente documento sono presentate tre diverse possibilità per la stima dello scarto tipo della riproducibilità. Esse sono basate su misurazioni ripetute di materiale nominalmente identico. L'ordine di preferenza è il seguente:

- opzione 1: riproducibilità intralaboratorio, cioè riproducibilità stimata all'interno di un laboratorio (p.to 5.2.2);
- opzione 2: riproducibilità derivata dai risultati di uno studio interlaboratorio di validazione del metodo (p.to 5.2.3.1);
- opzione 3: riproducibilità derivata dai risultati di una prova valutativa (PT) interlaboratorio (p.to 5.2.3.2).

L'ordine delle opzioni indica la priorità – Le opzioni 2 e 3 presentano tuttavia aree di debolezza come anche la norma evidenza.

# INCERTEZZA TECNICA

Pertanto, l'approccio più frequentemente applicabile è rappresentato dalla opzione 1, in cui il laboratorio utilizza i dati derivanti da prove condotte in parallelo da 2 operatori diversi, sullo stesso campione.

Scarto tipo della riproducibilità derivato da esperimenti intralaboratorio,  $S_{IR}$   
p.to 5.2.2.1 e Figura 2

Il protocollo illustrato nella figura 2 prevede di eseguire l'analisi di due porzioni di prova per ciascun campione di laboratorio, per la quale i calcoli corrispondenti sono forniti nel punto 5.2.2.3. Per altri casi (cioè più di due porzioni di prova per alcuni o per tutti i campioni di laboratorio), il protocollo e i calcoli sono forniti nell'appendice A.

Per ciascun metodo di prova, eseguire il protocollo sperimentale della figura 2 per almeno dieci campioni di laboratorio e ripeterlo per fornire almeno due risultati accettabili per ciascun campione di laboratorio. Il punto 5.2.2.3.1 fornisce indicazioni di valori accettabili.

# INCERTEZZA TECNICA

Scarto tipo della riproducibilità derivato da esperimenti intralaboratorio,  $S_{IR}$   
p.to 5.2.2.1 e Figura 2 ... continua...

In funzione delle circostanze, ciò può richiedere più di dieci campioni di laboratorio e/o più di due porzioni di prova per ciascun campione di laboratorio.

I dati di diversi campioni di laboratorio sono raccolti durante un periodo di tempo come parte di un protocollo iniziato o come parte di una procedura di gestione della qualità di routine del laboratorio. In tale caso, si dovrebbe assicurare che siano seguiti i principi dei progetti sperimentali del presente punto.

# INCERTEZZA TECNICA

## Scelta dei campioni

La stima della riproducibilità intralaboratorio è progettata per escludere i contributi dall'eterogeneità all'interno del campione di laboratorio, pertanto non è necessario ripetere questa stima per matrici diverse e questa stima può essere basata su una singola matrice.

Il calcolo (vedere punto 5.2.2.3) utilizza dati trasformati in logaritmi per normalizzare la varianza della riproducibilità intralaboratorio, pertanto non è necessario ripetere il protocollo sperimentale per livelli di contaminazione diversi. Tuttavia, dove possibile,

## Campioni dei circuiti interlaboratorio

A condizione che:

- i campioni delle prove valutative siano rappresentativi dei campioni di routine analizzati dal laboratorio (tipo di matrice, dimensione della porzione di prova);
- il laboratorio esegua le stime su due, o più, porzioni di prova in condizioni di misurazione differenti, come indicato nel punto 5.2.2.2.6.

# INCERTEZZA TECNICA

## Preparazione dei campioni

Al fine di ridurre al minimo i contributi di incertezza della matrice, il campione di laboratorio o il campione di prova, nei casi in cui il campione di laboratorio sia troppo grande da omogeneizzare, dovrebbe essere reso il più omogeneo possibile. I campioni di laboratorio che comprendono quanto segue dovrebbero essere miscelati bene prima di prelevare le porzioni di prova:

- liquidi non viscosi e polveri (per esempio, latte, latte di cocco, latte in polvere);
- solidi macinati/finemente tagliati o sospensioni/emulsioni (per esempio carne macinata, carne separata meccanicamente, carne insaccata, carne trita, panna montata, gelati a base di latte, panna di soia);
- altri campioni da sottoporre ad analisi solo dopo procedure di omogeneizzazione adeguata.

Sospensione iniziale, contaminazione artificiale (se necessaria) e condizioni di analisi  
Figura 2.

# INCERTEZZA TECNICA

## Condizioni di analisi

Le condizioni di misurazione A e B per le due porzioni di prova (vedere la figura 2 o l'appendice A se sono esaminate più di due porzioni di prova) dovrebbero differire nel maggior numero di modi possibili. Idealmente, considerare variazioni in tutte le fonti di incertezza tecnica pertinenti (vedere punto 5.1) quante se ne potrebbero incontrare in giorni diversi all'interno del laboratorio. Queste generalmente comprendono, tra le altre, lotti di terreni di coltura, reagenti e filtri a membrana, miscelatore vortex o altro, pH metro, incubatori, tempi di analisi, ecc. Se possibile, le due porzioni di prova dovrebbero essere sottoposte a prova da almeno due tecnici diversi. Dato che la contaminazione del campione alimentare è raramente stabile nella microbiologia della catena alimentare, le ripetizioni delle misurazioni dovrebbero essere eseguite entro un breve periodo di tempo nello stesso giorno. Le ripetizioni possono essere eseguite in più giorni solo se si può dimostrare che i livelli di contaminazione sono stabili.

Il modello non dovrebbe però essere lo stesso per tutti i campioni: l'obiettivo è massimizzare la variabilità esistente tra misurazioni ripetute mantenendo, allo stesso tempo, una rappresentazione realistica dell'attività del laboratorio.

# INCERTEZZA TECNICA

## Calcoli

### Risultati accettabili

- Per tecnica di conteggio su piastra
- Per i metodi che prevedono conferma parziale
- Per tecnica MPN

### Scarto tipo della riproducibilità intralaboratorio

- Trasformare il risultato ottenuto da ciascuna porzione di prova da cfu/g o ml in  $\log_{10}$  cfu/g o ml prima di eseguire i calcoli.
- Il punto 5.2.2.3.2 descrive la procedura di calcolo quando sono utilizzati due valori da ciascun campione di laboratorio. Fare riferimento all'appendice A per la procedura di calcolo da utilizzare quando si hanno a disposizione più di due valori da ciascun campione di laboratorio. L'appendice A fornisce inoltre un calcolo alternativo per i due valori da ciascun campione di laboratorio.

# INCERTEZZA TECNICA

## Scarto tipo della riproducibilità intralaboratorio

- Per gli n (almeno 10) campioni di laboratorio da una data attuazione del protocollo (come da punto 5.2.2.2), i risultati ( $y_{1A}$  e  $y_{1B}$ ) per ciascuna delle porzioni di prova sono utilizzati per calcolare lo scarto tipo della riproducibilità intralaboratorio,  $S_{IR}$ , come mostrato nella formula:

$$S_{IR} = \sqrt{1/2n \sum_{i=1}^n (\log_{10}(x_{iA}) - \log_{10}(x_{iB}))^2}$$

dove:

$x_{iA}$  e  $x_{iB}$  sono, rispettivamente, primo e secondo risultato della prova sullo stesso campione;

n = numero di campioni di prova analizzati nelle condizioni A e B con  $n \geq 10$

i = 1, 2, ... p indice dei campioni sottoposti a prova

# INCERTEZZA TECNICA

L'appendice A descrive i calcoli per il caso generale quando si dispone di più di due valori da ciascun campione di laboratorio ed illustra inoltre come si possono eseguire i calcoli utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) nel caso generale di due e più valori da ciascun campione di laboratorio.

Lo scarto tipo della riproducibilità comprende inevitabilmente ognuna delle componenti della matrice e della distribuzione pertinenti ai dati della riproducibilità. Se l'incertezza di un risultato di prova è calcolata mediante la combinazione di questo scarto tipo della riproducibilità con le componenti della matrice e della distribuzione pertinenti al risultato di prova, si ottiene una sovrastima dell'incertezza. Il laboratorio può scegliere di evitare questa sovrastima, eseguendo calcoli più complicati, mediante la sottrazione di ognuna delle componenti pertinenti dell'incertezza della matrice e della distribuzione pertinenti dallo scarto tipo della riproducibilità. Questo approccio alternativo opzionale è descritto nell'appendice D, per fornire uno scarto tipo corretto,  $SIR:corr$

# INCERTEZZA TECNICA

## Scarto tipo della riproducibilità derivato da studi interlaboratorio

Quando un metodo utilizzato da un laboratorio è sottoposto a uno studio di validazione interlaboratorio, il laboratorio può utilizzare lo scarto tipo della riproducibilità del metodo come stima della sua MU tecnica, alla seguente condizione: le stime di ripetibilità e riproducibilità della precisione ottenuta da misurazioni interne al laboratorio non devono essere maggiori dei valori corrispondenti ottenuti nello studio interlaboratorio.

Diverse limitazioni, elencate dalla stessa norma.

Per questi motivi, l'utilizzo dello scarto tipo della riproducibilità da uno studio interlaboratorio del metodo è solo una seconda opzione, dopo lo scarto tipo della riproducibilità da esperimenti intralaboratorio.

# INCERTEZZA TECNICA

## Prove valutative intralaboratorio

Per la stima dell'incertezza, la stima della riproducibilità derivata dai laboratori di una prova valutativa può essere utilizzata solo nella seguente situazione:

- quando lo stesso metodo è stato utilizzato da tutti i laboratori di una prova di valutazione, un laboratorio il cui risultato sia stato valutato come soddisfacente dall'organizzatore della prova valutativa può stimare l'incertezza tecnica come lo scarto tipo di tutti i risultati valutati come soddisfacenti dall'organizzatore della prova valutativa.

Diverse limitazioni, elencate dalla stessa norma

Date queste limitazioni, l'utilizzo dello scarto tipo della riproducibilità da una prova valutativa interlaboratorio è solo una terza opzione, dopo lo scarto tipo della riproducibilità da esperimenti intralaboratorio e lo scarto tipo della riproducibilità da uno studio interlaboratorio del metodo.

# INCERTEZZA DELLA MATRICE

Un risultato di prova può essere influenzato dalla composizione della matrice e dalla distribuzione microbica. Nel presente documento, il termine “**incertezza della matrice**” si riferisce esclusivamente agli effetti della distribuzione microbica in una data matrice, cioè la variazione tra i risultati da diverse porzioni di prova prelevate dallo stesso campione di laboratorio. Questo corrisponde al caso in cui le singole porzioni di prova non siano rappresentative del campione di laboratorio complessivo.

L'incertezza della matrice differisce dall'incertezza di campionamento che non è trattata nel presente documento.

L'incertezza della matrice è riconosciuta essere indipendente dal metodo analitico **utilizzato**. Ciò significa che l'incertezza della matrice stimata per una matrice può essere applicata come il contributo di incertezza della matrice per tutte le prove quantitative in questa matrice.

# INCERTEZZA DELLA MATRICE

Se il materiale è effettivamente omogeneo, come per esempio liquidi ben miscelati (latte, acqua, bevande), ci si aspetta che l'incertezza della matrice sia bassa. Tuttavia, è risaputo che la contaminazione microbica naturale di determinati prodotti alimentari (specialmente prodotti solidi, trasformati o fermentati, ecc.) può essere altamente eterogenea e questo può costituire una componente di incertezza elevata. Ciò è particolarmente vero per prodotti multi-componente con diverse parti distinte, come pizze o pasti precotti pronti per il consumo. Può accadere anche con alimenti che includono polveri (per esempio latte in polvere), formaggi e verdure fresche pre-tagliate. Per materiali eterogenei di questo tipo, l'incertezza può essere ridotta prelevando una porzione di prova più grande.

Se la composizione del materiale è possibile che influenzi sostanzialmente la prestazione

L'appendice B (informativa) Effetto matrice e incertezza della matrice.

# INCERTEZZA DELLA MATRICE

Sono proposti 3 approcci per il calcolo dell'incertezza di matrice:

1. utilizzo di un valore fisso (vedere punto 6.2): per campioni di laboratorio (o di prova) omogenei ben miscelati, si prevede che l'incertezza della matrice sia bassa e può essere utilizzato un valore (minimo) fisso;
2. esame di più porzioni di prova da campioni di laboratorio (o di prova) dai quali possa essere determinata la varianza intracampione (vedere punto 6.3);
3. sono note caratteristiche pertinenti della matrice e del metodo e l'incertezza della matrice può essere stimata sulla base di conoscenze pregresse (vedere punto 6.4).

Nel **primo approccio** si assume che liquidi (fluidi leggeri, non viscosi) sono considerati essere omogenei e pertanto hanno un'incertezza della matrice relativamente bassa, generalmente:

$$U_{matrix} = 0,1 \log_{10} cfu/g \text{ o } ml$$

# INCERTEZZA DELLA MATRICE

Nel **secondo approccio** l'incertezza della matrice può essere stimata come scarto tipo della ripetibilità del campione intralaboratorio, mediante l'analisi di più porzioni di prova in condizioni di ripetibilità da uno o più campioni di laboratorio, utilizzando il progetto sperimentale della figura 3.

Il protocollo sperimentale applicabile è simile a quello applicato per il calcolo dello scarto tipo di riproducibilità di laboratorio, ma le condizioni in cui il laboratorio deve operare sono di ripetibilità stretta, in modo che altre componenti di variabilità incrementino l'incertezza di matrice.

Utilizzare campioni contaminati naturalmente, dato che è improbabile che la contaminazione artificiale rispecchi la reale incertezza della matrice. Poiché l'incertezza della matrice è considerata indipendente dal misurando e dal metodo di prova utilizzato, si dovrebbero scegliere misurandi per i quali si possano trovare campioni contaminati naturalmente. Buone scelte come prova da applicare possono essere la conta totale dei microrganismi mesofili aerobici, le Enterobacteriaceae o i microrganismi sporigeni termofili.

# INCERTEZZA DELLA MATRICE

Sono possibili **due protocolli**:

Tutte le porzioni di prova possono provenire da un campione di laboratorio. Ciò può essere particolarmente appropriato quando è analizzata una nuova matrice, per esempio una matrice non dello stesso tipo di quelle valutate precedentemente. Vedere il punto 6.4 per una guida su come considerare matrici dello stesso tipo.

In alternativa, le porzioni di prova possono provenire da più campioni di laboratorio che possano essere analizzate in un arco di tempo in modo da fornire una stima dell'incertezza della matrice più generalizzata.

In tutti i casi, almeno due porzioni di prova devono essere prelevate da ciascun campione di laboratorio e il numero totale di porzioni di prova deve essere almeno dieci in più del numero di campioni di laboratorio. Per esempio:

- 2 porzioni di prova sono prelevate da ciascuno dei 10 campioni di laboratorio;

# INCERTEZZA DELLA MATRICE

Nel primo caso, i risultati in logaritmo saranno trattati con le stesse modalità di calcolo applicate per lo scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio, e sarà calcolato lo scarto tipo di ripetibilità  $S_r$ , essendo le condizioni di ripetibilità.

Nel secondo caso prelevati gli 11 campioni di prova da uno stesso campione di laboratorio, questi saranno analizzati in condizioni di ripetibilità e sarà calcolato lo scarto tipo di ripetibilità  $S_r$  dei risultati trasformati in logaritmo decimale.

# INCERTEZZA DELLA MATRICE

Può infine essere applicata l'appendice A della norma per l'analisi della varianza.

Definizione dei dati accettabili.

Lo scarto tipo della ripetibilità comprende inevitabilmente tutte le componenti tecniche e della distribuzione pertinenti ai dati della ripetibilità. Si ottiene una sovrastima dell'incertezza, se l'incertezza di un risultato di prova è calcolata mediante la combinazione di questo scarto tipo della ripetibilità con le componenti tecniche della matrice e della distribuzione relative al risultato di prova. Il laboratorio può scegliere di evitare questa sovrastima, eseguendo calcoli più complessi sottraendo dallo scarto tipo di ripetibilità tutte le componenti di incertezza rilevanti. Questo approccio alternativo opzionale per fornire uno scarto tipo corretto,  $S_{r,corr}$ , è descritto nell'appendice D.

Terzo approccio: caratteristica nota della matrice.

# INCERTEZZA DELLA DISTRIBUZIONE

Condizione in microbiologia legata alla distribuzione casuale dei microrganismi in una matrice che segue la legge di Poisson.

Nella norma, le incertezze che derivano dalla distribuzione totalmente casuale delle particelle sono definite incertezze della distribuzione. In funzione delle caratteristiche del metodo analitico, calcolare queste incertezze della distribuzione a partire da valori che compongono ogni singolo risultato, in conformità ai punti da 7.2 a 7.4.

## 7.2 Tecnica di conta delle colonie – Incertezza di Poisson

Per i metodi basati su una tecnica di conta delle colonie, esiste un contributo minimo dell'incertezza della distribuzione in funzione del numero totale di colonie contate utilizzato nel calcolo del risultato,  $\Sigma C$ .

$$u_{\text{Poisson}} = 1/\ln(10)/\sqrt{\Sigma c} = 0,4343/\sqrt{\Sigma c}$$

# INCERTEZZA DELLA DISTRIBUZIONE

## 7.3 Tecnica di conta delle colonie - Incertezza di conferma

Alcuni metodi basati su una tecnica di conta delle colonie forniscono numeri presunti di organismi. Sono quindi utilizzate prove di conferma per correggere la conta presunta mediante la stima della proporzione di un numero selezionato di colonie che è confermato come l'organismo obiettivo utilizzando prove appropriate. È ragionevole considerare le colonie come uniformemente distribuite e la distribuzione binomiale è utilizzata per calcolare l'incertezza della distribuzione corrispondente specifica di un singolo risultato.

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

Al crescere del numero di colonie sottoposte a conferma, a parità di quelle confermate, l'incertezza tende a diminuire in modo significativo

# INCERTEZZA DELLA DISTRIBUZIONE

## 7.4 Tecnica MPN – Incertezza del numero più probabile

La tecnica del numero più probabile (MPN) permette di ottenere i numeri più probabili da una serie di risultati positiva/negativa. Questa tecnica include tecniche automatizzate di distribuzione su piastre microtitrer nella quale molti tubi possono essere valutati come positivi o negativi. Per una tecnica MPN, l'incertezza della distribuzione minima è maggiore dell'incertezza di Poisson semplice e dipende dai risultati dettagliati. Le procedure per la stima dell'incertezza tipo corrispondente in  $\log_{10}$ ,  $u_{MPN}$ , sono fornite **nell'appendice C**.

# INCERTEZZA COMPOSTA ED ESTESA

## INCERTEZZA TIPO COMPOSTA

### Considerazioni generali

L'incertezza tipo composta può essere basata su una delle due seguenti opzioni:

a) una combinazione (vedere punto 8.1.2) di incertezze stimate separatamente:

- 1) incertezza tipo tecnica,
- 2) incertezza tipo della matrice,
- 3) incertezze tipo della distribuzione;

b) se coerente con i protocolli di laboratorio e i requisiti del cliente, il solo scarto tipo della riproducibilità (vedere punto 8.1.3).

# INCERTEZZA COMPOSTA ED ESTESA

## INCERTEZZA TIPO COMPOSTA BASATA SU INCERTEZZE DISTINTE: TECNICA, DELLA MATRICE E DELLA DISTRIBUZIONE

Incertezza tecnica  $u_{\text{tech}}$

Stimata in conformità al punto 5 della norma come  $S_{IR}$ , che può essere corretto  $S_{IRCORR}$  per incertezze tipo della matrice e della distribuzione, come procedura alternativa opzionale, in conformità **all'appendice D**.

Incertezza della matrice  $u_{\text{matrix}}$

Stimata in conformità al punto 6 della norma e, in particolare, al punto 6.3 come  $S_r$  che può essere corretto  $S_{rcorr}$  per incertezza di distribuzione, come procedura alternativa opzionale, in conformità **all'appendice D**.

Tutte le incertezze della distribuzione pertinenti ( $u_{\text{Poisson}}$ ,  $u_{\text{conf}}$ ,  $U_{\text{MPN}}$ ) sono calcolate in conformità al punto 7 della norma.

# INCERTEZZA COMPOSTA ED ESTESA

Calcolare l'incertezza tipo composta come la radice quadrata della somma dei quadrati delle incertezze tipo tecnica, della matrice e di ogni distribuzione pertinente.

Si noti che non tutti i termini sono inclusi in un dato metodo, per esempio un metodo non include sia la conta delle colonie ( $u_{\text{Poisson}}$ ) sia l'MPN ( $u_{\text{MPN}}$ ).

È generalmente accettato che l'effetto di una componente sia trascurabile se la sua incertezza tipo non è maggiore di un quinto della grandezza dell'incertezza tipo della componente maggiore. Le componenti di incertezza della matrice e della distribuzione che sono trascurabili a confronto con l'incertezza tecnica, come mostrato negli esempi nel punto 8.3, possono essere ignorate. All'estremo, quando tutte le componenti di incertezza della distribuzione e della matrice sono trascurabili il confronto con l'incertezza tecnica, gli esempi di cui sopra si riducono a  $u_c(y) = u_{\text{tech}}$ .

# INCERTEZZA COMPOSTA ED ESTESA

## INCERTEZZA TIPO COMPOSTA BASATA SUL SOLO SCARTO TIPO DELLA RIPRODUCIBILITA'

Lo scarto tipo della riproducibilità è calcolato mediante uno dei tre metodi forniti nel punto 5.2.

Se coerente con i protocolli di laboratorio e i requisiti del cliente, l'incertezza tipo composta può essere stimata solo come lo scarto tipo della riproducibilità, senza la correzione descritta nell'appendice D, come mostrato dalla formula:

$$U_c(y) = S_{IR}$$

# INCERTEZZA ESTESA

Utilizzare la formula sotto riportata per ottenere l'incertezza estesa,  $U$ , dall'incertezza tipo composta,  $u_c(y)$ , (vedere punto 8.1) con un fattore di copertura,  $k$ , scelto, nel presente documento, come un valore di 2 (per corrispondere approssimativamente a un livello di confidenza del 95%):

$$U = 2 u_c(y)$$

# INCERTEZZA ESTESA

## Scarto tipo della riproducibilità intralaboratorio

- Trasformare il risultato ottenuto da ciascuna porzione di prova da cfu/g o ml in  $\log_{10}$  cfu/g o ml prima di eseguire i calcoli.
- Il punto 5.2.2.3.2 descrive la procedura di calcolo quando sono utilizzati due valori da ciascun campione di laboratorio. Fare riferimento all'appendice A per la procedura di calcolo da utilizzare quando si hanno a disposizione più di due valori da ciascun campione di laboratorio. L'appendice A fornisce inoltre un calcolo alternativo per i due valori da ciascun campione di laboratorio.
- Per gli  $n$  (almeno 10) campioni di laboratorio da una data attuazione del protocollo (come da punto 5.2.2.2), i risultati ( $y_{1A}$  e  $y_{1B}$ ) per ciascuna delle porzioni di prova sono utilizzati per calcolare lo scarto tipo della riproducibilità intralaboratorio,  $SIR$ , come mostrato nella formula:

# INCERTEZZA ESTESA

$$S_{IR} = \sqrt{1/2n \sum_{i=1}^n (\log_{10}(x_{iA}) - \log_{10}(x_{iB}))^2}$$

dove:

$x_{iA}$  e  $x_{iB}$  sono, rispettivamente, primo e secondo risultato della prova sullo stesso campione;

$n$  = numero di campioni di prova analizzati nelle condizioni A e B con  $n \geq 10$

$i = 1, 2, \dots, n$  indice dei campioni sottoposti a prova

## INCERTEZZA TIPO COMPOSTA BASATA SUL SOLO SCARTO TIPO DELLA RIPRODUCIBILITA'

Se coerente con i protocolli di laboratorio e i requisiti del cliente, l'incertezza tipo composta può essere stimata solo come lo scarto tipo della riproducibilità, senza la correzione descritta nell'appendice D, come mostrato dalla formula:

$$U_c(y) = S_{IR}$$

# INCERTEZZA ESTESA

Il calcolo dell'incertezza estesa per ogni metodo può essere calcolata utilizzando il valore di  $S_{IR}$  così calcolato applicando la formula

$$U = 2S_{IR}$$

dove

$U$  = incertezza estesa

$2$  = fattore di copertura  $k$  ( $p=95\%$ )

$S_{IR}$  = scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio

# ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA DI MISURA NEL RAPPORTO DI PROVA

La MU dovrebbe essere riportata nella stessa unità del risultato di prova.  
Come indicato nel punto 8.1.1, la MU riportata può essere basata su una delle due seguenti opzioni:

- scarto tipo della riproducibilità e stime separate delle incertezze della matrice e di ogni distribuzione pertinente;

oppure

- solo scarto tipo della riproducibilità.

Quando una stima della MU è richiesta nel rapporto di prova, includere nel rapporto una dichiarazione esplicita che la MU indicata è un'incertezza estesa, unitamente a una dichiarazione del livello di confidenza e a un'indicazione che la MU è stata stimata in conformità al presente documento.

# ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA DI MISURA NEL RAPPORTO DI PROVA

“L'incertezza di misura estesa riportata è stata stimata in conformità alla ISO 19036 ed è basata su un'incertezza tipo moltiplicata per un fattore di copertura di  $k = 2$ , fornendo un livello di confidenza approssimativamente del 95%.”

Se la MU è basata sul solo scarto tipo della riproducibilità, ciò deve essere espresso chiaramente nel rapporto di prova.

“L'incertezza di misura estesa riportata è stata stimata in conformità alla ISO 19036 ed è basata su un'incertezza tipo moltiplicata per un fattore di copertura di  $k = 2$ , fornendo un livello di confidenza approssimativamente del 95%. L'incertezza tipo composta è stata assunta come uguale allo scarto tipo della riproducibilità intralaboratorio.”

Gestione del numero di cifre significative e degli arrotondamenti.

# ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA DI MISURA NEL RAPPORTO DI PROVA

## Risultati inferiori al limite di quantificazione

Il paragrafo 9.2 della norma fornisce indicazioni sull'espressione dell'incertezza in caso di risultati inferiori al limite di quantificazione ( $< 1$  UFC/g,  $< 10$  UFC/g). Tali condizioni si possono avere per esempio:

- per un metodo di conta delle colonie, quando il numero di colonie contate è zero,  $\Sigma C = 0$ ;
- per un metodo di conta delle colonie con conferma parziale, quando il numero di colonie confermate è zero,  $n_c = 0$ ;
- per un metodo MPN, quando la ricerca dà zero risultati,  $x_i = 0$  per tutte le  $i$ .

In questi casi la norma indica di esprimere il limite inferiore dell'incertezza = 0 e il limite superiore come se il risultato fosse = LOQ

# ANNEX D

Correzione di scarti tipo sperimentali per componenti di incertezza indesiderata.

La norma propone la stima dell'incertezza tecnica e di matrice rispettivamente dallo scarto tipo di riproducibilità e di ripetibilità.

Questi scarti tipo includono altre componenti di incertezza che sovrastimano sia quella tecnica che quella di matrice.

Se la MU di un risultato riportato è basata sul solo scarto tipo della riproducibilità (p.to 8.1.3), allora  $S_{IR}$  è probabilmente una sottostima dell'incertezza tipo composta. Le incertezze della matrice e della distribuzione dei dati della riproducibilità sono probabilmente minori di quelle del risultato riportato.

Tuttavia, se la MU di un risultato riportato include incertezze della matrice e della distribuzione del risultato riportato stimate separatamente (p.to 8.1.2), allora le sovrastime di  $u_{tech}$  e  $u_{matrix}$  portano a una sovrastima dell'incertezza tipo composta.

# ANNEX D

Per ridurre tale sovrastima, le componenti indesiderate dei gruppi di dati della riproducibilità e della ripetibilità possono essere sottratte dagli scarti tipo per

La procedura per correggere uno scarto tipo per le componenti indesiderate è la seguente:

Calcolare i valori delle componenti indesiderate per ciascun risultato nella serie di dati che compongono lo scarto tipo:

- per  $S_{IR}$  e  $s_r$  ciò include tutte le componenti della distribuzione pertinenti;  $u_{\text{Poisson}}$ ,  $u_{\text{conf}}$ ,  $u_{\text{MPN}}$ , p.ti 7.2, 7.3 e 7.4 come appropriato;
- per  $S_{IR}$ , ciò include anche l'incertezza della matrice,  $s_{\text{matrix}}$ , che è spesso assunta come 0,1 perché i campioni di laboratorio sono stati resi omogenei, p.ti 5.2.2.2.4 e

Elevare al quadrato ciascun valore e sommarli per ottenere la somma dei quadrati delle componenti indesiderate,  $S_{\text{unwanted}}$ .

# ANNEX D

Dividere per il numero di risultati,  $N$ , per ottenere il quadrato dell'incertezza tipo composta delle componenti indesiderate  $u^2_{\text{unwanted}}$ .

Sottrarre questo dal quadrato dello scarto tipo per ottenere il quadrato dello scarto tipo corretto:

$$S^2_{\text{IR:corr}} = S^2_{\text{IR}} - u^2_{\text{unwanted}} \quad \text{oppure} \quad S^2_{\text{r:corr}} = S^2_{\text{r}} - u^2_{\text{unwanted}}$$

Calcolare la radice quadrata per ottenere lo scarto tipo corretto

$$S_{\text{IR:corr}} = \sqrt{S^2_{\text{IR:corr}}}$$

oppure

$$S_{\text{r:corr}} = \sqrt{S^2_{\text{r:corr}}}$$

# ANNEX D

Il valore corretto di  $S_{IR:corr}$  rappresenta una stima corretta di  $u_{tech}$

Quest'ultima deriva da operazioni analitiche come la presa della porzione di prova, la preparazione della sospensione iniziale, l'allestimenti delle diluizioni, l'inoculo, l'incubazione, il conteggio in piastra, ecc.

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

# ANNEX D

Il valore corretto di  $S_{IR:corr}$  rappresenta una stima corretta di  $u_{tech}$

È generalmente accettato che l'effetto di una componente sia trascurabile se la sua incertezza tipo non è maggiore di un quinto della grandezza dell'incertezza tipo della componente maggiore. Le componenti di incertezza della matrice e della distribuzione che sono trascurabili a confronto con l'incertezza tecnica, come mostrato negli esempi nel punto 8.3, possono essere ignorate. All'estremo, quando tutte le componenti di incertezza della distribuzione e della matrice sono trascurabili il confronto con l'incertezza tecnica, gli esempi di cui sopra si riducono a  $u_c(y) = u_{tech}$ .

# CAMPIONI AMBIENTALI

Matrici trascurate!!!

Campionamento delle superfici in aree di produzione e manipolazione degli alimenti:

Presenza di un liquido e dopo la fase di omogeneizzazione si assume che i microrganismi dispersi nel diluente rappresentano i microrganismi sulla superficie campionata.

Calcolo incertezza metodo A: applicazione della ISO 8199

Calcolo incertezza metodo B: applicazione della UNI EN ISO 19036 o della ISO 29201

Limitazione: stabilire la modalità più corretta della applicazione alla matrice superfici, dovendo coinvolgere 2 operatori nell'analisi per la stima di  $S_{IR}$

# CAMPIONI AMBIENTALI

**Schema B1:** contaminazione di una superficie da campionare, possibile solo artificialmente con materiali di riferimento; prelievi indipendenti su superfici contigue da 2 operatori diverse; 10 campionamenti indipendenti, a livelli di contaminazione diversi; calcolo dello  $S_{IR}$

**Schema B2:** considerare la sospensione microbica nel diluente del tampone o spugna come campione sul quale 2 operatori prelevano in modo indipendente un inoculo da seminare in piastra.

Campionamento delle superfici in aree di produzione e manipolazione degli alimenti: ISO 18593 mediante uso di piastre a contatto

Tecniche diverse di campionamento – Diversi risultati: importante riportare sul RdP il supporto di campionamento.

**Calcolo incertezza:** applicazione della UNI EN ISO 7218 per il calcolo dell'intervallo di confidenza.

# CAMPIONI AMBIENTALI

Campionamento di carcasse animali:  
ISO 17604: Prelievo distruttivo e Prelievo non distruttivo

Prelievo distruttivo: Protocollo UNI EN ISO 19036

Prelievo non distruttivo: utilizzo di campionamento mediante tamponi/spugne oppure risciacquo esterno delle carcasse animali

Calcolo incertezza: applicazione della ISO 8199, UNI EN ISO 19036 o della ISO 29201

# CAMPIONI AMBIENTALI

Campionamento dell'aria:  
Campionamento attivo e Campionamento passivo

Campionamento attivo: Protocollo UNI EN ISO 19036 o della ISO 29201

Campionamento attivo: applicazione della ISO 8199

Campionamento passivo: applicazione della UNI EN ISO 19036 o della ISO 29201

GRAZIE PER L'ATTENZIONE



**UNITRAIN**  
Conoscere e applicare gli standard

– Via Sannio, 2 – 20137 Milano

02 70024379 - 228



[formazione@uni.com](mailto:formazione@uni.com)



[www.uni.com](http://www.uni.com)