



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Mittausepävarmuuden laskeminen ISO 19036 mukaisesti. Esimerkki: Campylobacter

Marjaana Hakkinen

Erikoistutkija, Elintarvike- ja rehumikrobiologia

**Mikrobiologisten tutkimusten
mittausepävarmuus**

18.3.2019



Mittausepävarmuus

- Mittaustulokseen liittyvä parametri, joka kuvaa mitattavan suureen arvojen hajontaa
 - Mikrobiologiassa kvantitatiivinen tulos on vain arvio todellisesta lukumäärästä
- Kvantitatiivinen arvio niistä rajoista, joiden sisällä mittaustulosten oletetaan olevan tietyllä todennäköisyydellä
 - voidaan arvioida tulosten luotettavuutta

Mikrobiologisen mittausepävarmuuden haasteet



- Analyyttinä on elävä organismi, jonka fysiologinen tila voi vaihdella suuresti
- Analyysin kohteena on eri bakteerikantoja, -lajeja ja –sukuja
- Monia mittausepävarmuuteen vaikuttavia tekijöitä on vaikea määrittää (esim. fysiologinen tila)
- Monien tekijöiden vaikutusta (esim. lämpötila, vesiaktiivisuus) ei voida kuvata riittävän tarkasti kvantitatiivisesti



Mittausepävarmuus mikrobiologiassa

- Suurimmat epävarmuustekijät:
 - Näytteenotto
 - Mikrobien epätasainen jakautuminen näytteessä
- Mittausepävarmuuden lähteitä:
 - matriisi
 - laboratorionäyte / laimentaminen ym. työvaiheet
 - analyysin suorittaja
 - työvälineet, elatusaineet, reagenssit
 - systemaattiset virheet
 - satunnaiset virheet



ISO/FDIS 19036

- Soveltamisalue: elintarvikkeet, rehut, elintarvikkeiden tuotanto- ja käsittelyympäristön näytteet, alkutuotannon näytteet
- Yhdistetty epävarmuus, jonka komponentit ovat:
 - Tekninen epävarmuus (= ISO/TS 19036:2006 globaali epävarmuus)
 - Matriisista johtuva epävarmuus
 - Mikrobien epätasaisesta jakautumisesta johtuva epävarmuus
 - Pesäkelaskentamenetelmissä Poisson-epävarmuus ($u_{Poisson}$)
 - MPN-menetelmiin liittyvä epävarmuus (u_{MPN})
 - Varmistukseen liittyvä epävarmuus (u_{conf})
- Mittausepävarmuus, kun tulos on alle määrittämissä rajoissa



Tekninen mittausepävarmuus (u_{tech})

- Analyysin teknisestä suorituksesta syntyvä epävarmuus
- Perustuu analyysituloksen uusittavuuden keskihajontaan
- Menetelmäkohtainen
- Seurattava jatkuvasti ja arvioitava uudelleen aina, kun jokin vaikuttava tekijä muuttuu

Teknisen mittausepävarmuuden määrittämisen vaihtoehdot



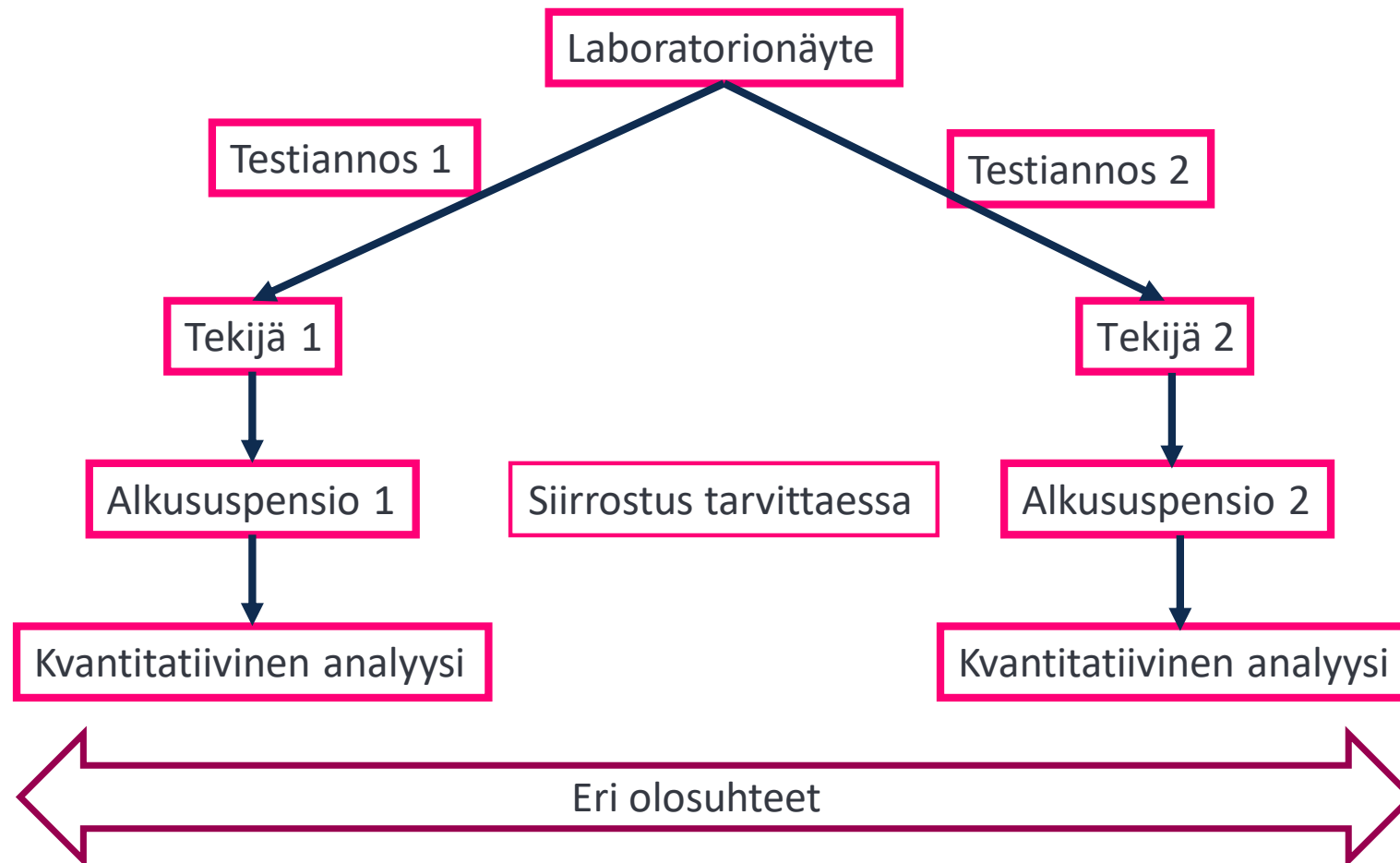
- 1. Laboratorion sisäinen uusittavuuden keskihajonta (s_{IR})**
 - Lasketaan keskihajonta analyysituloksista, kun analyysi toistetaan samassa laboratoriossa eri tekijöiden tekemänä, eri reagenssierillä, eri aikoina
 - Mahdollista tehdä menetelmän verifiointin yhteydessä
- 2. Kollaboratiivisessa tutkimuksessa menetelmälle määritettyä uusittavuuden keskihajontaa mahdollista käyttää tietyin ehdoin**
- 3. Interkalibrointitutkimuksessa määritettyä keskihajontaa mahdollista käyttää tietyin varauksin**



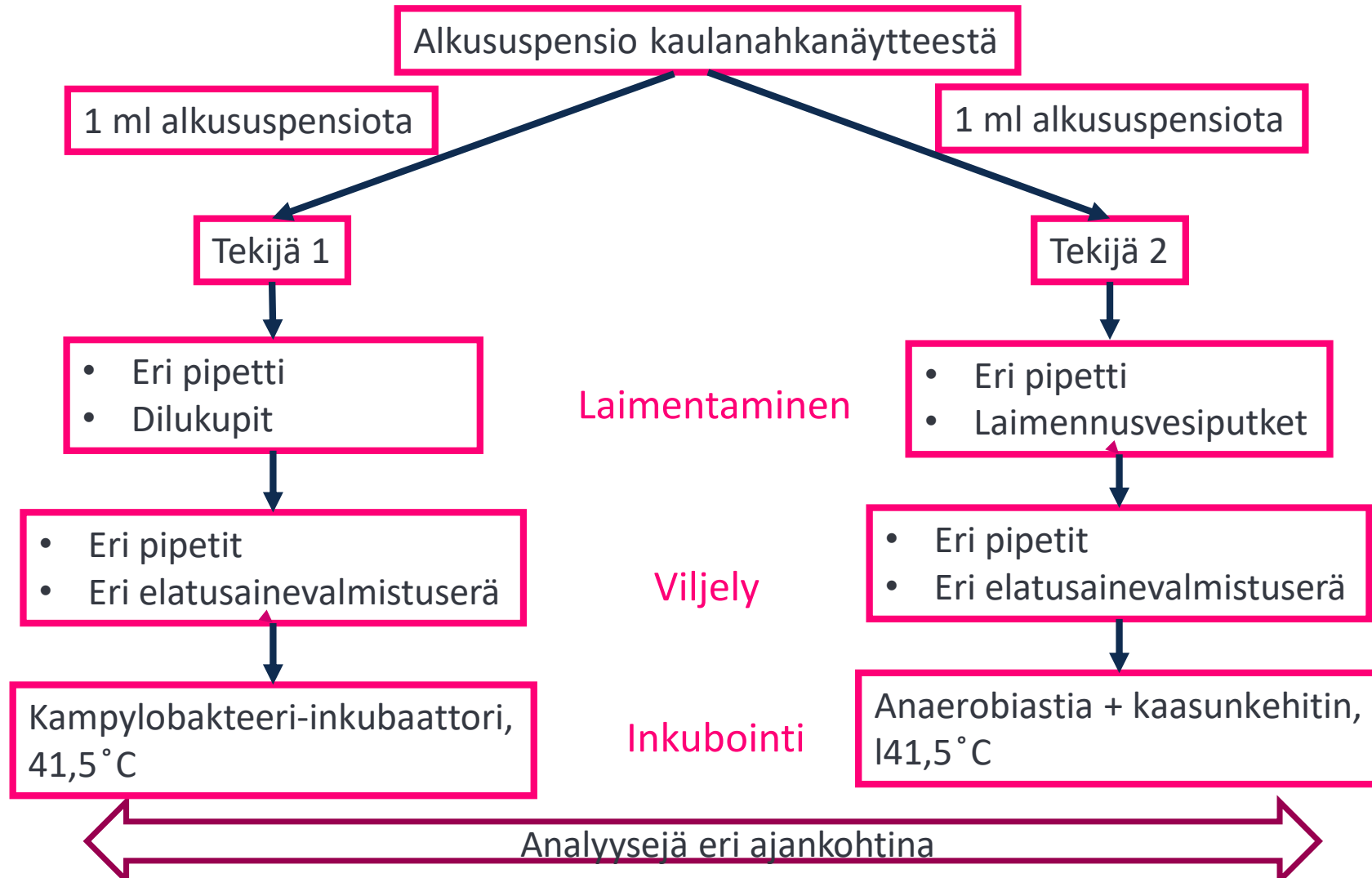
Teknisen mittausepävarmuuden määrittäminen

- Kullekin menetelmälle ainakin 10 näytettä; kullekin näytteelle kaksi hyväksyttävää tulosta
 - Laskettujen pesäkkeiden kokonaismäärä vähintään 30
- Analyysejä voi tehdä eri ajankohtina
- Käytetään laboratoriolle tyypillistä matriisia, joka on mahdollisimman homogeeninen (useiden matriisien käyttö ei ole tarpeen)
- Käytetään mahdollisimman kattavasti sellaisia pitoisuuksia, joita normaalisti analysoidaan
- Kaikki mahdollinen vaihtelu sisällytettävä:
 - Tekijä, elatusaine-erä, reagenssierät, sekoittajat, pH-mittarit, inkubaattorit jne.

Teknisen mittausepävarmuuden määrittäminen laboratorion sisäisesti



Esimerkki: Kampylobakteerin kvantitointi broilerin jauhelihasta





Laboratorion sisäinen uusittavuuden keskihajonta ($s_{IR:raw}$)

$$s_{IR:raw} = \sqrt{\frac{1}{2p} \sum_i^p (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

i = näyte

$p \geq 10$

Näyte i	Tekijän A tulos, x_A (pmy/g)	Tekijän B tulos, x_B (pmy/g)	$y_A = \log_{10} x_A$ (\log_{10} pmy/g)	$y_B = \log_{10} x_B$ (\log_{10} pmy/g)	$(y_A - y_B)^2$
1	5500	750	3,7404	2,8751	0,7487
2	15000	4100	4,1761	3,6128	0,3173
3	19000	7300	4,2788	3,8633	0,1726
4	7500	6600	3,8751	3,8195	0,0031
5	11000	8500	4,0414	3,9294	0,0125
6	1800	1400	3,2553	3,1461	0,0119
7	100000	75000	5,0000	4,8751	0,0156
8	2500	1200	3,3979	3,0792	0,1016
9	2300	1500	3,3617	3,1761	0,0345
10	255	700	2,4065	2,8451	0,1923

Laboratorion sisäinen uusittavuuden keskihajonta ($s_{IR:raw}$)



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

i = näyte

$p \geq 10$

Näyte i	Tekijän A tulos, x_A (pmy/g)	Tekijän B tulos, x_B (pmy/g)	$y_A = \log_{10} x_A$ (\log_{10} pmy/g)	$y_B = \log_{10} x_B$ (\log_{10} pmy/g)	$(y_A - y_B)^2$
1	5500	750	3,7404	2,8751	0,7487
2	15000	4100	4,1761	3,6128	0,3173
3	19000	7300	4,2788	3,8633	0,1726
4	7500	6600	3,8751	3,8195	0,0031
5	11000	8500	4,0414	3,9294	0,0125
6	1800	1400	3,2553	3,1461	0,0119
7	100000	75000	5,0000	4,8751	0,0156
8	2500	1200	3,3979	3,0792	0,1016
9	2300	1500	3,3617	3,1761	0,0345
10	255	700	2,4065	2,8451	0,1923



Laboratorion sisäinen uusittavuuden keskihajonta ($s_{IR:raw}$)

$$s_{IR:raw} = \sqrt{\frac{1}{2p} \sum_i^p (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

$i =$ näyte
 $p \geq 10$

Näyte i	Tekijän A tulos, x_A (pmy/g)	Tekijän B tulos, x_B (pmy/g)	$y_A = \log_{10} x_A$ (\log_{10} pmy/g)	$y_B = \log_{10} x_B$ (\log_{10} pmy/g)	$(y_A - y_B)^2$
1	5500	750	3,7404	2,8751	0,7487
2	15000	4100	4,1761	3,6128	0,3173
3	19000	7300	4,2788	3,8633	0,1726
4	7500	6600	3,8751	3,8195	0,0031
5	11000	8500	4,0414	3,9294	0,0125
6	1800	1400	3,2553	3,1461	0,0119
7	100000	75000	5,0000	4,8751	0,0156
8	2500	1200	3,3979	3,0792	0,1016
9	2300	1500	3,3617	3,1761	0,0345
10	255	700	2,4065	2,8451	0,1923



Laboratorion sisäinen uusittavuuden keskihajonta ($s_{IR:raw}$)

$$s_{IR:raw} = \sqrt{\frac{1}{2p} \sum_i^p (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

i = näyte

$p \geq 10$

Näyte i	Tekijän A tulos, x_A (pmy/g)	Tekijän B tulos, x_B (pmy/g)	$y_A = \log_{10} x_A$ (\log_{10} pmy/g)	$y_B = \log_{10} x_B$ (\log_{10} pmy/g)	$(y_A - y_B)^2$
1	5500	750	3,7404	2,8751	0,7487
2	15000	4100	4,1761	3,6128	0,3173
3	19000	7300	4,2788	3,8633	0,1726
4	7500	6600	3,8751	3,8195	0,0031
5	11000	8500	4,0414	3,9294	0,0125
6	1800	1400	3,2553	3,1461	0,0119
7	100000	75000	5,0000	4,8751	0,0156
8	2500	1200	3,3979	3,0792	0,1016
9	2300	1500	3,3617	3,1761	0,0345
10	255	700	2,4065	2,8451	0,1923

$$s_{IR:raw} = \sqrt{\frac{1}{20} (0,7497 + 0,3173 + 0,1726 + 0,0031 + 0,0125 + 0,0119 + 0,0156 + 0,1016 + 0,0345 + 0,1923)} = 0,2837$$



Matriisista johtuva epävarmuus (u_{matrix})

- Matriisista johtuva vaihtelu, kun analyysi toistetaan samasta laboratorionäytteestä otetuista testiannoksista samanlaisissa olosuhteissa
➔ toistettavuuden keskihajonta
- Mikrobit epätasaisesti näytteen eri osissa
 - Monista eri aineksista koostuvat näytteet, esim. valmisateriat
- Kun on määritetty jollekin matriisille, voidaan käyttää kyseisen matriisin kaikkien kvantitatiivisten analyysien mittausepävarmuuden osana
 - Matriisien luokittelu ISO/DIS 16140-3:2017, NMKL 32:2017
- Nestemäiset matriisit homogeenisia ➔ pieni epävarmuus

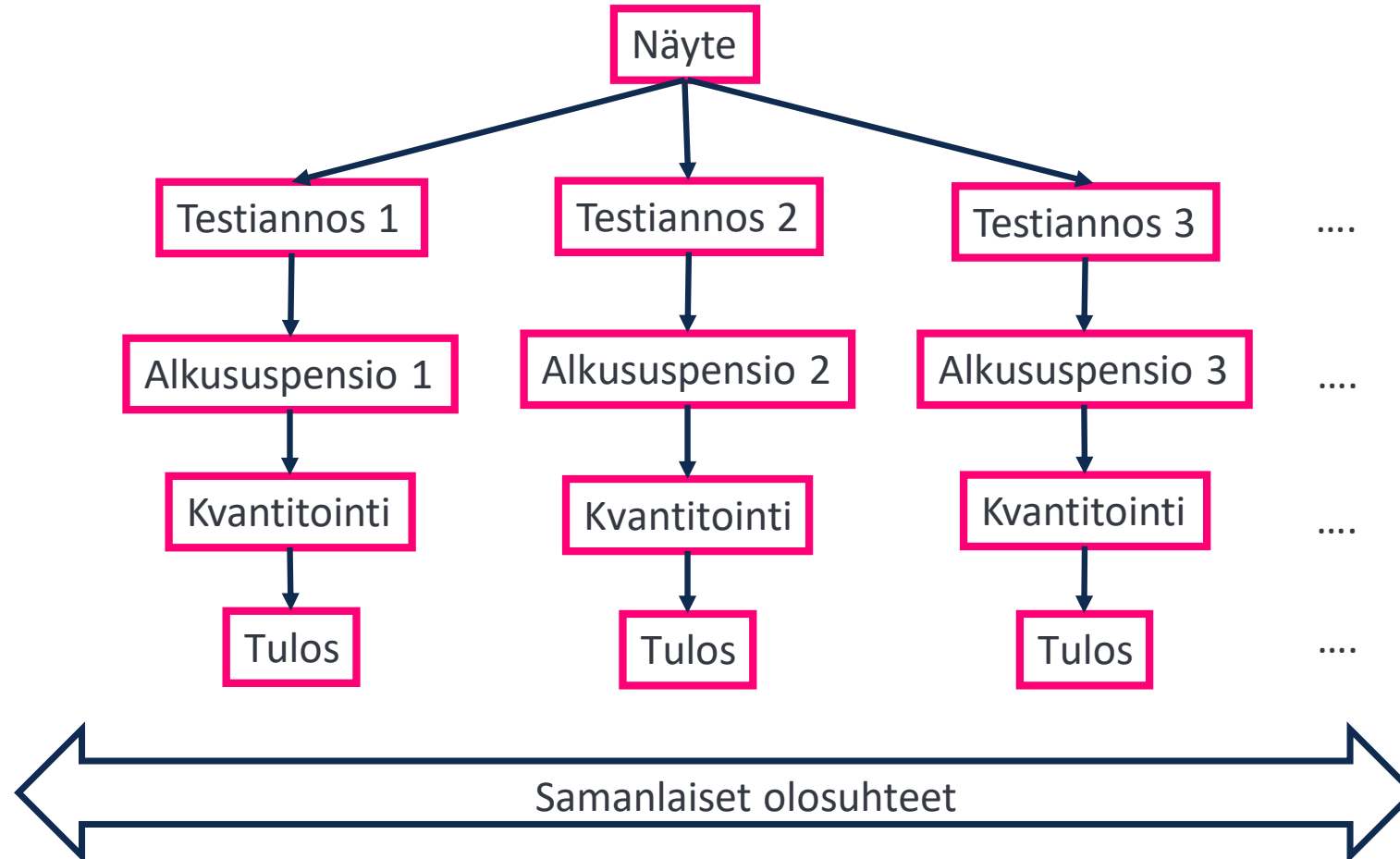


Matriisista johtuva epävarmuus (u_{matrix})

- Standardissa kolme lähestymistapaa:
 1. Jos laboratorionäyte on nestemäinen tai kiinteä laboratorionäyte on hyvin homogeenoitu ennen testiannoksen ottamista, voidaan käyttää kiinteää arvoa $u_{\text{matrix}}=0,1 \log_{10} \text{ pmy/g tai ml}$
 2. Määritetään laboratorion sisäisen toistettavuuden keskihajonta
 - Yliarvioi matriisista johtuvaa epävarmuutta, sillä sisältää aina myös teknistä epävarmuutta
 3. Voidaan käyttää aiempaa kokemukseen perustuvaa tietoa samankaltaisesta näytematriisista johtuvasta epävarmuudesta



Matriisista johtuva epävarmuus = laboratorion sisäisen toistettavuuden keskihajonta (s_r)





Laboratorion sisäisen toistettavuuden keskihajonta (s_r)

- Suositeltavaa määrittää luonnollisesti kontaminoituneista näytteistä
- Kvantitoidaan jokin ko. matriisissa yleinen mikrobi
- Testiannokset yhdestä tai useammasta laboratorionäytteestä; testiannosten kokonaismäärä vähintään 10 enemmän kuin laboratorionäytteiden määrä
 - Yksi laboratorionäyte ➡ vähintään 11 testiannosta
 - Kymmenen laboratorionäytettä ➡ vähintään 20 testiannosta
- Hyväksyttävät tulokset
 - Vähintään 30 pesäkettä laskettu
 - Jos menetelmän sisältyy pesäkkeiden varmistus, otettava huomioon
 - MPN-menetelmissä vähintään viisi positiivista tulosta



Hiukkastilastollisesta jakaumasta johtuva epävarmuus ($u_{Poisson}$)

- Homogeenisessäkin näytteessä mikrobit jakautuvat materiaaliin sattumanvaraisesti (Poisson-jakauman mukaisesti)
- Pesäkelaskentaan perustuvissa menetelmissä Poisson-epävarmuus ($u_{Poisson}$) riippuu laskettujen pesäkkeiden kokonaismäärästä ($\sum C$, ks. ISO 7218)

$$u_{Poisson} = \frac{1/\ln(10)}{\sqrt{\sum C}} = \frac{0,4343}{\sqrt{\sum C}}$$



MPN-epävarmuus (u_{MPN})

- määritettävissä käyttämällä laskuria <https://standards.iso.org/iso/7218>
- $u_{MPN} = SD \log_{10} MPN$

The screenshot shows the 'MPN calculation Excel program, version 5'. The interface includes a ribbon with various tools and a main workspace with two tables.

Input data table (Table C.5, row 1 (3x3)):

Dilution factor d	Volume in ml or g w	No. of tubes n	No. of positive tubes x
1,0	1,0	3	0
0,1	1,0	3	0
0,01	1,0	3	0

Results of the MPN calculations table:

No.	Test series / Matrix Designation	MPN	$\log_{10} MPN$	SD $\log_{10} MPN$	95% confidence limits Lower	95% confidence limits Upper	Rarity Index	Category
1	Table C.5, row 1 (3x3)	0		0,43	0	1,1	1,000	1
2	Table C.5, row 2 (3x3)	0,30	-0,52	0,44	0,041	2,3	0,087	1
3	Table C.5, row 3 (3x3)	0,36	-0,45	0,31	0,048	2,7	1,000	1
4	Table C.5, row 4 (3x3)	0,72	-0,14	0,17	0,17	3,0	0,021	2
5	Table C.5, row 5 (3x3)	0,74	-0,13	0,31	0,18	3,1	0,211	1
6	Table C.5, row 6 (3x3)	1,1	-0,056	0,26	0,35	3,7	0,021	2
7	Table C.5, row 7 (3x3)	0,92	-0,037	0,32	0,21	4,0	1,000	1
8	Table C.5, row 8 (3x3)	1,4	0,16	0,26	0,42	4,8	0,041	2
9	Table C.5, row 9 (3x3)	1,5	0,17	0,27	0,43	5,0	0,426	1
10	Table C.5, row 10 (3x3)	2,0	0,31	0,23	0,69	6,0	0,019	2
11	Table C.6, row 1 (3x5)	0		0	0	0,66	1,000	1
12	Table C.6, row 2 (3x5)	0,18	-0,74	0,43	0,025	1,3	0,092	1
13	Table C.6, row 3 (3x5)	0,20	-0,70	0,44	0,027	1,5	1,000	1
14	Table C.6, row 4 (3x5)	0,40	-0,40	0,31	0,097	1,6	0,020	2
15	Table C.6, row 5 (3x5)	0,40	-0,39	0,31	0,097	1,7	0,205	1
16	Table C.6, row 6 (3x5)	0,61	-0,21	0,25	0,19	2,0	0,024	2
17	Table C.6, row 7 (3x5)	0,45	-0,35	0,31	0,11	1,9	1,000	1
18	Table C.6, row 8 (3x5)	0,68	-0,17	0,25	0,21	2,2	0,034	2
19	Table C.6, row 9 (3x5)	0,68	-0,16	0,25	0,21	2,2	0,354	1
20	Table C.6, row 10 (3x5)	0,92	-0,036	0,22	0,33	2,5	0,015	2
21	Table C.7, row 1 (3x10)	0		0	0	0,33	1,000	1
22	Table C.7, row 2 (3x10)	0,090	-1,0	0,43	0,012	0,67	0,091	1
23	Table C.7, row 3 (3x10)	0,094	-1,0	0,43	0,013	0,70	0,990	1



Varmistukseen liittyvä epävarmuus (u_{conf})

- Pesäkelaskentaan perustuvissa menetelmissä, joissa pesäkkeitä varmistetaan
- Standardissa taulukko u_{conf} -arvoille eri määrille varmistettuja pesäkkeitä

Table 3 — Values of u_{conf} in \log_{10} for selected values of n_p and n_c

Number of colonies confirmed (n_c)	Number colonies tested (n_p)			
	5	10	15	20
1	0,3554	0,4302	0,4605	0,4769
2	0,2023	0,2627	0,2868	0,2999
3	0,1349	0,1946	0,2177	0,2300
4	0,0888	0,1541	0,1776	0,1900
5	0,0454	0,1254	0,1501	0,1628
6		0,1027	0,1293	0,1427
7		0,0834	0,1126	0,1268
8		0,0657	0,0986	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	0,0683
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

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

n_c = varmistuneiden pesäkkeiden lukumäärä

n_p = tutkittujen pesäkkeiden lukumäärä

Jos $n_c = 0$, käytetään laskussa arvoa $n_c = 1$



Yhdistetty epävarmuus, $u_c(y)$

- Yhdistetään erikseen lasketut osatekijät: tekninen, matriisiin liittyvä ja hiukkasten jakaumasta johtuva epävarmuus
 - Kun menetelmässä ei lasketa pesäkkeitä $u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2}$
 - Pesäkelaskentamenetelmille $u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{Poisson}^2}$
 - Kun menetelmään kuuluu varmistus $u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{Poisson}^2 + u_{conf}^2}$
 - MPN-menetelmille $u_c(y) = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{MPN}^2}$
- Standardi antaa mahdollisuuden käyttää pelkästään uusittavuuden keskihajontaa $u_c(y) = s_{IR:raw}$



Korjattu mittausepävarmuus

- Uusittavuuden keskihajonta → aliarvioi
- Yhdistetty mittausepävarmuus → yliarvioi
- Voidaan korjata vähentämällä ei-halutut komponentit → korjattu mittausepävarmuus

$$S_{IR:corr} = \sqrt{S_{IR:raw}^2 - (u_{matrix}^2 + u_{distrib}^2)}$$

$$S_{r:corr} = \sqrt{S_{r:raw}^2 - u_{distrib}^2}$$

- Yhdistetty epävarmuus $u_c(y)$ lasketaan käyttäen korjattuja komponentteja
- Jos jokin mittausepävarmuuden komponenteista on suuruudeltaan enintään viidesosa suurimmasta tekijästä, se voidaan jättää ottamatta huomioon



Laajennettu epävarmuus

$$U = k u_c(y)$$

k =kattavuuskerroin=2; vastaa suunnilleen 95%:n luottamustasoa



Ilmoittaminen tutkimuselosteessa

- $y \pm U \log_{10} \text{ pmy/g tai pmy/ml}$ \rightarrow $5,00 \pm 0,31 \log_{10} \text{ pmy/g}$
- $y \log_{10} \text{ pmy/g tai pmy/ml } [y-U; y+U]$ \rightarrow $5,00 \log_{10} \text{ pmy/g } [4,69; 5,31]$
- $x \text{ pmy/g tai pmy/ml } [10^{y-U}; 10^{y+U}]$ \rightarrow $1,0 \times 10^5 \text{ pmy/g } [4,9 \times 10^5; 2,0 \times 10^5]$
- Laajennettu epävarmuus on arvioitu standardin 19036 mukaan, ja standardiepävarmuuteen kerrottuna kattavuuskertoimella $k=2$, joka vastaa luottamustasoa 95%



Alle määrittäysrajan jäävät tulokset

- Esim. laskettujen pesäkkeiden määrä =0, varmistettujen pesäkkeiden määrä =0 tai MPN-menetelmässä ei positiivisia tuloksia
- Hiukkastilastollinen epävarmuus voidaan laskea ➡ voidaan laskea yhdistetty ja laajennettu mittausepävarmuus
- Jos tulos on 0 pmy/ml tai pmy/g ja se ilmoitetaan ilman logaritmuunnosta, yläraja lasketaan lisäämällä mittausepävarmuus menetelmän määrittäysrajaan ja alaraja =0
- Logaritmuunnetun tuloksen alaraja ilmoitetaan $<(\log_{10} x_{LOQ}) - U$