MITTATEKNIIKAN KESKUS

Julkaisu J1/2001

MIKROBIOLOGIAN KVANTITATIIVISTEN VILJELYMÄÄRITYSTEN MITTAUSEPÄVARMUUS

Seppo I. Niemelä

METROLOGIAN NEUVOTTELUKUNTA
KEMIAN JAOSTO
Mikrobiologian työryhmä

Helsinki 2001

MITTATEKNIIKAN KESKUS

Julkaisu J1/2001

MIKROBIOLOGIAN KVANTITATIIVISTEN VILJELYMÄÄRITYSTEN MITTAUSEPÄVARMUUS

Seppo I. Niemelä

METROLOGIAN NEUVOTTELUKUNTA
KEMIAN JAOSTO
Mikrobiologian työryhmä

Helsinki 2001

ALKUSANAT

Mikrobiologisten mittausten epävarmuustekijöistä ja virhelähteistä on runsaasti havaintoja ja analyyseistä vastuussa olevat mikrobiologian asiantuntijat pyrkivätkin ottamaan epävarmuuden huomioon tulosten tulkinnassa. Tämä on kuitenkin yleensä sormituntumaan perustuvaa, koska täsmällisiä virhe-estimaatteja ei ole ollut riittävästi käytettävissä.

Metrologian neuvottelukunnan kemian jaoston mikrobiologian työryhmä laati selvityksen mikrobiologisen metrologian tilanteesta ja esitti kehittämissuunnitelman (Mittatekniikan keskuksen julkaisu J5/1999). Tässä raportissa tärkeänä kehittämiskohteena esitettiin oppaan laatimista mikrobiologisten menetelmien mittausepävarmuudesta. Professori emeritus Seppo Niemelä, jolla on kymmenien vuosien kokemus kvantitatiivisista mikrobiologisista mittauksista ja niitä koskevasta mittausepävarmuudesta, on laatinut yhteistyössä mikrobiologian työryhmän kanssa tämän oppaan.

Oppaan ohjeiden avulla on mahdollista laskea numeeriset arvot mikrobiologisten viljelymenetelmien näytekohtaisille mittausepävarmuuksille. Lisäksi on mahdollista korjauskertoimien avulla laskea tulokset siten, että systemaattiset virheet on otettu huomioon. Eri virhelähteiden keskinäisen merkityksen esiin saaminen antaa viitteitä siitä, miten mittausten luotettavuutta tulisi parantaa.

Mikrobiologian työryhmä toivoo oppaan tulevan laajaan käyttöön ja osaltaan edistävän mikrobiologista analytiikkaa.

Helsingissä 25.10.2000

Maarit Niemi
Mikrobiologian työryhmän puolesta

ESIPUHE

Tämä opas palvelee ensisijaisesti ns. rutiinimäärityksiä, missä tutkimuksen tilaaja yleensä saa laboratoriolta yhden mittaustuloksen näytettä kohti. Tulokseen halutaan liittää epävarmuuden arvio. Tarkoituksena on tarjota perusteet epävarmuuden arvojen laskemiseksi ja ilmaisemiseksi.

Jotta kirjoitus ei paisuisi liikaa, oli tietoinen valinta jättää vaille perusteellista käsittelyä tilastomenettelyt, joita soveltaen laajoista koemateriaaleista voidaan eristää erilaisia epävarmuuskomponentteja.

Mikrobien tunnistus on monien mikrobiologisten laboratorioiden keskeinen analyysityyppi ja siihen liittyy huomattavaa epävarmuutta. Tunnistus ei kuitenkaan ole rinnastettavissa varsinaisiin mittauksiin ja on jätetty tämän oppaan ulkopuolelle. Sen epävarmuus on ilmaistavissa vain tunnistuksen ja erottelun todennäköisyyksinä. Tunnistuksen ja muiden kompleksisten 'mittausten' epävarmuus ansaitsee oman monografiansa. Tässä kirjoituksessa käsitellään ainoastaan lukumääriin perustuvia mittaustuloksia.

Metrologian neuvottelukunta on valtioneuvoston asettama asiantuntijaelin, joka toimii kauppa- ja teollisuusministeriön, turvatekniikan keskuksen ja Mittatekniikan keskuksen apuna metrologisten asioiden käsittelyssä. Sen alaisuudessa toimii kemian jaosto, joka on perustanut mikrobiologian työryhmän. Tämän oppaan laatimisessa on avustanut mikrobiologian työryhmän perustama mittausepävarmuustyöryhmä, johon kuuluivat prof. Seppo Niemelä puheenjohtaja, Suvi Bühler (HYKS Diagnostiikka), Sari Hemminki (Turvatekniikan keskus), Seija Kalso (Helsingin ympäristökeskus) ja Antti Nissinen (Keski-Suomen keskussairaala) jäseninä sekä Maarit Niemi sihteerinä. Kommentteja oppaan luonnokseen on antanut myös mittausepävarmuuspaja, johon osallistuivat epävarmuustyöryhmän puheenjohtaja ja sihteerin lisäksi Seija Kalso, Kirsti Lahti (Suomen ympäristökeskus), Tuula Pirhonen (Eläinlääkintä- ja elintarvikelaitos) ja Pirjo Rajamäki (Helsingin yliopisto, soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos).

SISÄLLYSLUETTELO

1 MITTAUSEPÄVARMUUS, MITTAUSTULOS JA MITTAUS

Mittausepävarmuus on metrologian perus- ja yleistermien sanaston mukaan (SFS 3700:1998) **mittaustulokseen liittyvä parametri, joka kuvaa mittaussuureen arvojen oletettua vaihtelua**. Se on keskihajonnan tyyppinen suure, jonka määrittämiseksi on kaksi päämenetelmää. Niistä käytetään nimityksiä A ja B (ks. 2).

Termi **mittaustulos** varataan tässä kirjoituksessa tarkoittamaan lopullista lukuarvoa, joka analyysiprosessin päätteeksi ilmoitetaan tutkimuksen tilaajalle. Mittaustulos ja sen epävarmuus ovat yhdistelmä useista mittauksista tai havainnoista ja niiden epävarmuudesta. Termiä **mittaus** käytetään tarkemmin määrittelemättä eri tasoilla.

1.1 Kirjainsymboliikka

Mittausepävarmuutta koskevissa oppaissa (ISO 1995, Eurachem 1995) on valittu kirjainsymboli u (standard uncertainty) kuvaamaan yllä esitettyä parametria silloin kun se suuruudeltaan vastaa jakauman keskihajontaa. Siitä käytetään nimitystä **standardiepävarmuus**. u saattaa kuitenkin yhtä hyvin tarkoittaa suhteellista keskihajontaa (vaihtelukerrointa). Tässä kirjoituksessa on tehty se poikkeava ratkaisu, että suhteellisen keskihajonnan tavalliset akronyymit (RSD tai CV) korvataan johdonmukaisesti symbolilla u, kun taas kokeellisesti todetulle, mittaustuloksen kanssa samaa laatua olevalle standardiepävarmuudelle (otoskeskihajonnalle) käytetään sen perinteistä symbolia s.

Kun mittaustuloksen epävarmuus saadaan yhdistelemällä monen osatekijän mittausepävarmuudesta, puhutaan **yhdistetystä standardi epävarmuudesta**. ISO (1995) ja Eurachem (1995) ilmaisevat sen alaindeksillä c (combined standard uncertainty, u_c). Tässä oppaassa alaindeksi c varataan muihin tarkoituksiin ja korvataan y:llä mittaustuloksen yhdistettyä epävarmuutta ilmoitettaessa. Syynä on se, että jatkossa lopullista mittaustulosta kaikkien laimennus- ym. korjausten jälkeen merkitään y:llä.

Erityisesti silloin, kun mittaustulosta käytetään terveyteen tai turvallisuuteen liittyvässä päätöksenteossa, on aiheellista antaa epävarmuuden arvo, joka kattaa huomattavan osan koko odotettavissa olevasta havaintojoukosta. Silloin käytetään ns. **laajennetun epävarmuuden** (expanded uncertainty) käsitettä. Laajennettua epävarmuutta merkitään yleensä isolla kirjaimella U. Se tarkoittaa epävarmuutta, joka saadaan kertomalla yhdistetty standardiepävarmuus u_c **kattavuuskertoimella *k***. Käsite on sukua luottamusväliajattelulle. Noin 95 % odotettavissa olevasta vaihtelusta sisältyy laajennetun epävarmuuden piiriin silloin, kun kattavuuskertoimelle valitaan arvo 2. Tässä oppaassa laajennettu epävarmuus merkitään kirjaimella S ja sen suhteellinen arvo kirjaimella U.

1.2 Mittausepävarmuuden ilmaiseminen

ISO (1995) esittää neljä tapaa ilmaista mittaustuloksen mittausepävarmuus. Näistä ainoastaan kolmea ensimmäistä suositellaan käytettäväksi standardiepävarmuuden yhteydessä.

Olkoon mitattu esimerkiksi bakteeripitoisuuden arvoksi y ja sen yhdistetyksi standardiepävarmuudeksi s_y. Vaihtoehtoiset tavat ovat (sulkeissa olevat **sanat** voi jättää pois):

1) $y = 1250$ ml^{-1} (yhdistetyllä standardiepävarmuudella) $s_y = 500$ ml^{-1}.

2) $y = 1250(500)$ ml^{-1}, missä sulkeisiin merkitty luku tarkoittaa mittauksen yhdistettyä standardiepävarmuutta s_y kohdistettuna ilmoitetun tuloksen kolmelle viimeiselle numerolle.

3) $y = 1250(500)$ ml^{-1}, missä sulkeisiin merkitty lukuarvo on (yhdistetty standardiepävarmuus) s_y ilmaistuna mittaustuloksen yksiköissä.

Edellä esitettyjä luontevampaa mikrobiologisten tulosten yhteydessä olisi epävarmuuden ilmaiseminen suhteellisena u_y tai prosentuaalisesti $100u_y$ %. Esimerkiksi $y = 1250$ ml^{-1} (u_y = 40 %) on suositeltava tapa.

Jos mittausarvoon halutaan liittää laajennettu epävarmuuden arvo U, voi olla tarpeellista hyvinkin seikkaperäisesti selostaa mistä epävarmuuden arvo on peräisin. Esimerkiksi seuraavaa tapaa suositellaan:

$y = (6400 \pm 1620)$ ml^{-1}, missä ± merkin jälkeinen lukuarvo on (laajennettu epävarmuus) $S = ks_y$ arvioituna pesäkelukumäärään 64 liittyvästä Poisson-jakauman standardiepävarmuudesta $s = 8$ ml^{-1} ($u = 0{,}125$), siirrostilavuuden suhteellisesta standardiepävarmuudesta $u = 0{,}02$ ja kattavuuskertoimesta $k = 2$.

Yhdistetty epävarmuus saattaa koostua yli kymmenestäkin tunnistettavissa olevasta osasta. Niiden kaikkien luetteleminen edellä osoitettuun tapaan käy ajan oloon hankalaksi. Siinä tapauksessa, että yhdistetty epävarmuus rakennetaan osistaan on parasta esittää eri komponenttien arvot luettelomaisesti tuloslomakkeessa, esimerkiksi liitteessä D ehdotettuun tapaan.

1.2.1 Suuret tulos- ja epävarmuusarvot mikrobiologiassa

Näytteen mikrobipitoisuudet saattavat olla miljoonia tai satoja miljoonia grammaa kohti. Mittaustulokset ilmoitetaan mieluiten tyyliin $y = x \cdot 10^k$, missä x on usein desimaaliluku. Tulos $y = 1300000$ g^{-1}, jonka mittausepävarmuus on ±15 % esitettäisiin suositeltuja ilmaisuja noudattaen (numerot 2 ja 3 yllä) esimerkiksi seuraavasti: $y = 1{,}3(0{,}20) \times 10^6$ g^{-1}. Suositusta 1 noudatettaessa arvot ilmoitetaan selkeästi erikseen $y = 1{,}3 \times 10^6$ g^{-1} ja $s_y = 0{,}20 \times 10^6$ g^{-1} tai u_y = 15 %.

Perinteisiä MPN-menetelmiä käytettäessä suhteellinen mittausepävarmuus on säännöllisesti suurempi kuin 0,5 (50 %). Muissakin tapauksissa yhdistetty epävarmuus voi nousta näin suureksi. Tällöin laajennettu epävarmuus U>1 (>100 %), joten sen arvo on suurempi kuin mittaustuloksen arvo ja luottamusvälin alaraja tulee miinusmerkkiseksi.

Niin kauan kuin ei ole määritelty mihin tarkoitukseen ja miten epävarmuusarvoja käytetään, niihin voi suhtautua raportoitavina irrallisina lisämäärityksinä, eikä negatiivisesta alarajasta ole haittaa.

1.2.2 Merkitsevät numerot

Mikrobiologiassa on harvoin edellytyksiä ilmoittaa lopullista mittaustulosta paremmalla kuin kahden merkitsevän numeron tarkkuudella. Myös epävarmuus on syytä ilmoittaa kahden numeron tarkkuudella, vaikka se merkitsisi useampaa desimaalia kuin itse mittaustuloksessa (ks. numeroarvoja kohdassa 1.2.1). Pyöristys kahden merkitsevän numeron tarkkuuteen tehdään vasta lopullista mittaustulosta ilmoitettaessa; ei milloinkaan perushavaintoon eli havaittuun pesäkelukumäärään.

2 MITTAUSEPÄVARMUUDEN MÄÄRITYSPERIAATTEET

Mittaustuloksen epävarmuus johtuu yleensä monista tekijöistä; mikrobiologiassa aina vähintään kolmesta, siirrostilavuuden epävarmuudesta, pesäkelukumäärän hiukkastilastollisesta hajonnasta ja tuloksen lukemisen epävarmuudesta. Joidenkin epävarmuuskomponenttien suuruus voidaan arvioida tilastollisin menetelmin sarjasta rinnakkaisia mittauksia, jolloin niitä kuvataan havaintojen otoskeskihajonnalla. Toiset komponentit, joita myöskin kuvataan keskihajonnalla, arvioidaan oletetuista todennäköisyysjakaumista tai kokemuksen tai muun tiedon perusteella. ISO (1995) käyttää näistä kahdesta periaatteellisesti erilaisesta arviointityypistä nimityksiä tyyppi A ja tyyppi B. A-tyyppinen evaluointi voi koskea koko analyysiprosessin lopputulosta tai jotakin osamittausta (esim. pipetointia). B-tyypin evaluointi koskee lähinnä vain yksittäisiä epävarmuuskomponentteja.

2.1 Perustyyppi A

A-tyyppinen keskihajonta (standardiepävarmuus) saadaan *n*:n riippumattoman rinnakkaismittauksen $x_1, x_2,...,x_n$ kokeellisen keskihajonnan (otoskeskihajonnan) kaavasta, missä $\bar{x}$ tarkoittaa keskiarvoa

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

A-tyypin epävarmuuden laskemiseksi mittaus pitää toistaa niin monta kertaa, että tuloksen otoshajonnasta saadaan luotettava arvio. Pääasiallinen ongelma on siinä, että aivan pieni otos ei tahdo riittää kunnollisen epävarmuusestimaatin saamiseksi. Jopa 30 rinnakkaismittauksen keskiarvon otoskeskihajonnan suhteellinen epävarmuus on normaalijakaumaa noudattavissa mittauksissa vielä noin 13 %; kahteen rinnakkaiseen perustuvan keskihajonnan epävarmuus peräti 76 % (ISO 1995).

Mittausepävarmuuden arvon halutaan yleensä edustavan materiaalia eikä vain yhtä näytettä. Rinnakkaishavainnot eivät edusta materiaalia riippumattomasti, jos ne ovat peräisin samasta näytteestä. On tärkeä selvästi tiedostaa minne saakka mittaustuloksen juuret ulottuvat, ja suunnitella toistot sieltä alkaviksi.

2.2 Perustyyppi B

ISO:n (1995) mukaan B-tyyppinen epävarmuuden arvo saadaan muilla keinoin kuin rinnakkaishavaintojen tilastollisilla analyyseillä. Epävarmuusvarianssi u^2 tai standardiepävarmuus u pohjataan koko siihen tieteelliseen tietoon (paitsi rinnakkaismittauksiin), joka on olemassa mittaussuureen mahdollisesta vaihtelusta. Tieto voi olla peräisin tilastollisesta teoriasta, aikaisemmista vastaavanlaisista mittauksista, kokemuksesta tai yleisistä käsityksistä mittalaitteiden ja materiaalien ominaisuuksista, valmistajan spesifikaatioista, kalibrointi- ja sertifiointiraporteissa julkaistuista vertailuarvoista tai käsikirjojen antamista epävarmuusarvioista.

B-tyyppinen epävarmuusarvio saattaa olla jopa luotettavampi kuin vähäiseen rinnakkaisten määrään perustuva A-tyyppinen epävarmuus.

2.3 Yhdistetty epävarmuus

Ei yleensä ole käytännössä mahdollista tehdä jokaisessa mittaustilanteessa riittäviä toistoja tapauskohtaisen A-tyyppisen epävarmuuden määrittämiseksi. Silloin joko uskotaan jonkin aikaisemmin tehdyn epävarmuusmäärityksen pätevän yleisesti (esim. usko toistettavuus- ja uusittavuus-parametreihin) tai koostetaan yhdistetty epävarmuus analyysiprosessiin liittyvien osamittausten eri tavoin määritetyistä mittausepävarmuuden arvoista.

Yhdistetty epävarmuus koostetaan osista siten, että tunnistetaan ja luetteloidaan kaikki tai ainakin tärkeimmät analyysin eri vaiheissa vaikuttavat epävarmuustekijät. A- tai B-tyypin menettelyllä arvioidaan kunkin suuruus ja eri epävarmuuskomponenttien arvot yhdistetään matemaattisesti.

Yhdistetty epävarmuuden matemaattista mallia yhtä hyvin kuin sen A-tyyppistä toistomääritystä suunniteltaessa on päätettävä mitkä kaikki epävarmuustekijät otetaan mukaan. Tärkein valinta koskee sitä sisällytetäänkö näytekohteessa (materiaalissa) esiintyvä mikrobipitoisuuden otosvaihtelu epävarmuusestimaattiin vai tarkoitetaanko epävarmuudella ainoastaan yhden näytteen laboratorioanalyysin hajontaa.

Kun kaikki merkittävästi vaikuttavat epävarmuustekijät on oikein tunnistettu ja arvioitu, niin matemaattisesti koostetun yhdistetyn epävarmuuden estimaatin ja rinnakkaishavaintoihin perustuvan A-tyypin estimaatin pitäisi olla saman suuruisia. Mikäli niin ei ole, niin rinnakkaishavaintoihin ilmeisesti vaikuttaa yksi tai useampi tunnistamaton epävarmuustekijä, jota ei ole ymmärretty sisällyttää matemaattiseen epävarmuusmalliin. Mikrobiologiassa kaikkein tavallisin hajontaa lisäävä syy on jokin 'vahinko' (kontaminaatio, värinmuutos tai pesäkkeiden leviäminen), jolle ei ole mitään ennustettavissa olevaa todennäköisyyttä eikä matemaattista mallia.

Komponenttien arviointi erikseen auttaa tunnistamaan suurimmat epävarmuustekijät, joihin puuttuminen vaikuttaa eniten yhdistettyyn epävarmuuteen.

Yhdistetyn epävarmuuden arvio olisi mikrobiologisissa analyyseissä aihetta tehdä tapauskohtaisesti, koska tapauskohtaisesti vaihteleva pesäkelukumäärä, jota ei voida etukäteen ennustaa, usein dominoi epävarmuuden arvoa.

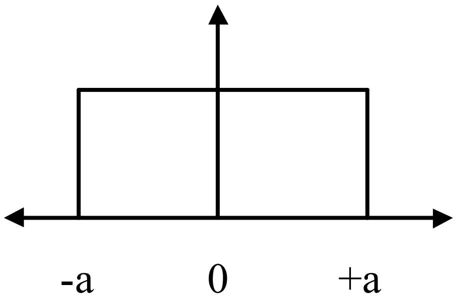
2.4 Epävarmuuskomponenttien tietolähteet

Mittausepävarmuuden komponentteja voidaan saada paitsi omista toistomittauksista myös tieteellisestä kirjallisuudesta sekä vanhojen, muita tarkoituksia varten koottujen aineistojen varianssianalyyseistä.

Tarvittaessa käytetään muitakin arviointikeinoja kuten matemaattista teoriaa (Poisson- tai binomijakauma) tai eräitä erikoisia approksimaatioita kuten tasaista tai kolmiojakaumaa (2.4.1, 2.4.2). Puhdas kokemukseen perustuva arvauskin on hyväksyttävien keinojen joukossa, kunhan epävarmuusarvoja raportoitaessa selvästi osoitetaan mistä arvot on saatu.

2.4.1 Tasainen jakauma

On tapauksia, missä lähtösuureen arvojen tiedetään voivan vaihdella joissakin rajoissa (esim. -*a*...+*a*), mutta ei ole käsitystä arvojen todennäköisyysjakaumasta. Tyypillisiä esimerkkejä ovat pipetin valmistajan ilmoittamat spesifikaatiot ja näytteiden säilytyksen aikaiset pitoisuusmuutokset. Yksi mahdollisuus on pitää jokaista arvoa välillä -*a*...+*a* yhtä mahdollisena. Silloin "todennäköisyysjakauma" on ns. tasainen jakauma (Kuva 1).



Kuva 1. *Tasainen jakauma. Jokaista arvoa välillä -a...+a pidetään yhtä mahdollisena (yhtä todennäköisenä).*

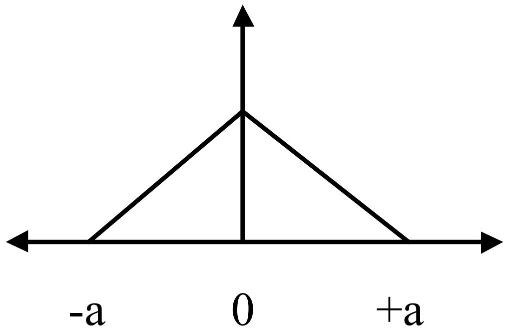
Tasaisen jakauman standardiepävarmuuden arvo on (ISO 1995)

$$s = \frac{a}{\sqrt{3}} \qquad (2)$$

Koska mikrobiologiassa on luontevinta esittää muutokset suhteellisina (esimerkiksi *a* %), niin silloin laskettu keskihajonnan arvo saadaan suoraan suhdeyksiköissä eli suhteellisena keskihajontana.

2.4.2 Kolmiojakauma

Tuntematonta todennäköisyysjakaumaa voidaan ajatella toisinkin. Pidetään luultavimpana, että arvo on lähellä ilmoitettua tai että pitoisuus ei muutu, mutta toisaalta hyväksytään mahdolliseksi enintään suuruudeltaan ±*a* oleva ero. "Todennäköisyysjakaumaa" kuvataan tasakylkisellä kolmiolla, jonka huippu on kohdassa 0 (tai arvaamalla valitussa kohdassa *w*) ja kannan päätepisteet arvoissa -*a* ja +*a* (tai –*a* + *w* ja *a* + *w*) (Kuva 2).



Kuva 2. *Kolmiojakauma. Kaikki arvot välillä -a...+a katsotaan mahdollisiksi, mutta nollan lähellä olevia arvoja pidetään luultavimpina.*

Kolmiojakauman standardiepävarmuus on suunnilleen (ISO 1995)

$$s = \frac{a}{\sqrt{6}} \tag{3}$$

Se kelpaa sellaisenaan korjauskertoimen suhteellisen keskihajonnan arvoksi, kun *a* on ilmoitettu suhteellisena (esim. %).

3 MIKROBIOLOGISET KVANTITATIIVISET VILJELYMENETELMÄT METROLOGISELTA KANNALTA

Kvantitatiivisten viljelymenetelmien analyysiprosessi etenee siten, että näyte homogenoidaan ensin huolellisesti ja laimennetaan tarvittaessa "mittalaitteen" toiminta-alueelle. Sen jälkeen menetelmään sopivat tilavuudet siirrostetaan kyseiseen mittalaitteeseen. Sitä laimennussarjan suspensiota, josta saadaan ensimmäiset käyttökelpoiset tulokset nimitetään jatkossa **päätesuspensioksi**.

Mittalaite eli "detektioinstrumentti" koostuu usein monesta yksittäisestä detektorista, joita on kahta tyyppiä: pesäkeluku- ja liuosdetektorit (petrimalja, liuosputki).

3.1 Viljelymääritysten yhteinen peruskaava

Kvantitatiivisten viljelymääritysten kaikille yhteinen matemaattinen peruskaava on

$$y = Fx \tag{4}$$

missä

x = päätesuspension mikrobipitoisuus ja
F = päätesuspension laimennuskerroin.
(Kun laimennusta ei tarvita, $F = 1$.)

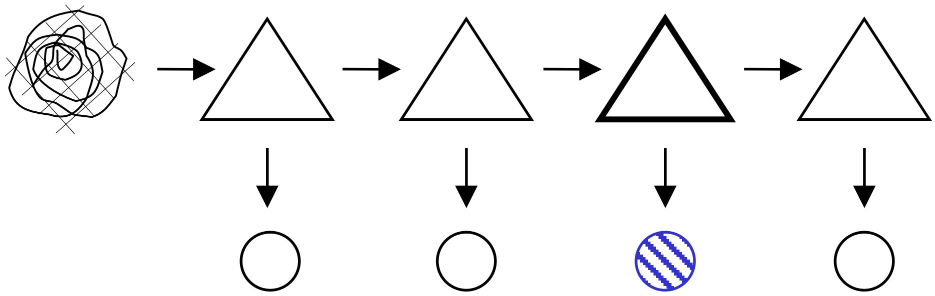
3.2 Metrologiset tyypit

Päätesuspension tiheyden määrittämiseksi on käytössä neljä instrumenttityyppiä. (Harvinainen 'spiral plate' on viides tyyppi mutta jätetään käsittelyn ulkopuolelle.)

3.2.1 Yhden maljan instrumentti

Mikrobipitoisuuden arvio perustuu yhden maljan pesäkelukumäärään c, joka on havaittu päätesuspension siirrostilavuudesta v (Kuva 3).

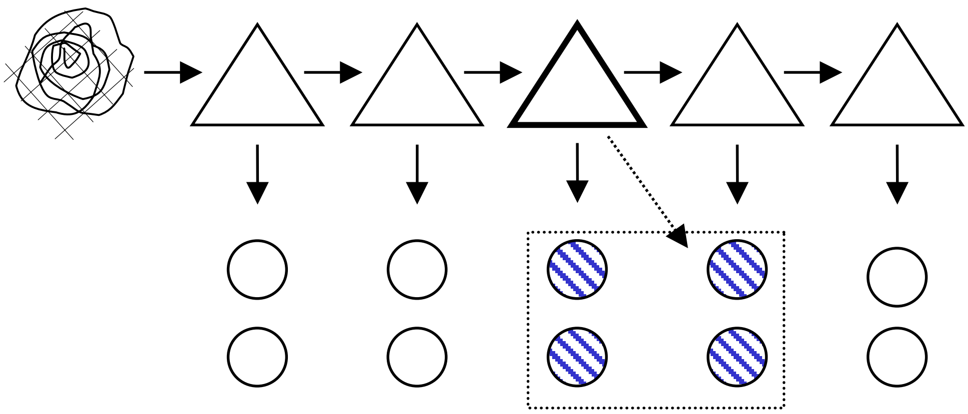
$$x = \frac{c}{v} \tag{5}$$



Kuva 3. *Yhden maljan instrumentti. Sotku kuvaa tutkittavaa materiaalia, kolmiot suspensiopulloja (laimennussarjaa), ympyrät petrimaljoja, nuolet pipetointeja. Monista valmistetuista maljoista huolimatta tulokset lasketaan vain yhdestä maljasta (varjostettu). Päätesuspensio (lihavoitu) on se laimennos, josta tulos luetaan. Varjostamattomat maljat on karsittu mahdottomina tai jonkin maljakohtaisia pesäkemääriä rajoittavan sopimuksen takia.*

3.2.2 Monen maljan instrumentti

Mikrobipitoisuuden arvio perustuu pesäkelukumääriin, jotka ovat peräisin saman suspension eri tilavuuksista (laimennoksista) ja/tai samojen laimennosten rinnakkaismaljoista (Kuva 4).



Kuva 4. *Monimaljainen instrumentti. Useasta laimennoksesta viljeltyjen maljojen joukosta on valittu osa (varjostettu) laskettaviksi. Niistä muodostuu detektioinstrumentti, jonka päätesuspensioksi määräytyy ensimmäinen laimennos, josta saadaan laskettavia maljoja (lihavoitu). On tarkoituksenmukaista ajatella eri laimennoksista mitattuja siirroksia päätesuspension erisuurina tilavuuksina (katkoviivanuoli).*

Päätesuspension mikrobipitoisuuden ns. painotettu keskiarvo on

$$x = \frac{\Sigma c_i}{\Sigma v_i} = \frac{C}{V} \tag{6}$$

c_i = *i*:nnen maljan pesäkeluku,
v_i = *i*:nnen mittausannoksen tilavuus päätesuspension tilavuusyksikköinä.

Kaavassa pienillä kirjaimilla (c, v) on osoitettu yhden maljan pesäkelukumääriä ja siirrostilavuuksia ja isoilla kirjaimilla (C, V) niiden summia.

3.2.3 Yhden putkisarjan MPN-instrumentti

Sarja (n) yhtäsuuria tilavuuksia (v) tutkittavasta (pääte)suspensiosta siirrostetaan kukin omaan steriiliin kasvukennoonsa kehittymään. Kvantitatiivisen tuloksen saannin edellytyksenä on se, että osa kasvukennoista jää steriileiksi.

Päätesuspension mikrobipitoisuus arvioidaan kaavasta

$$x = \frac{1}{v} \ln \left(\frac{n}{s} \right) \tag{7}$$

v = yhden mittausannoksen tilavuus,
n = kasvukennojen kokonaislukumäärä,
s = steriileiksi jääneiden kasvukennojen lukumäärä.

3.2.4 Usean laimennustason MPN-instrumentti

Usean laimennustason MPN-arvo lasketaan iteratiivisen laskutoimituksen avulla (esim. Halvorson ja Ziegler, 1933), jota ei voida esittää eksplisiittisen laskukaavan muodossa. Näinollen tiheysarvio on

$$x = MPN = f(n_i, p_i, k) \tag{8}$$

missä MPN-tulos saadaan taulukoista tai tietokoneohjelmista laimennusten lukumäärän (k), putkisarjojen pituuden (n_i) ja eri sarjojen positiivisten putkien lukumäärän (p_i) funktiona. Vastaa monen maljan instrumenttia (3.2.2).

3.3 Varmistetut mittaustulokset

Monissa selektiivisissä menetelmissä edellytetään lopullisen mittaustuloksen olevan ns. varmistettu tulos.

On pesäkemenetelmiä, joissa varmistus tapahtuu reagenssilisäyksellä koko maljaan tai membraanisuodattimen siirrolla reagenssialustalle. Tällöin kaikkiin (myös alustavasti negatiivisiin) pesäkkeisiin tulee tehdyksi varmistava mittaus. Lopputulos lasketaan pelkästään tietyllä tavalla reagoivien pesäkkeiden lukumäärän perusteella. Metrologisessa suhteessa tällaiset **kokonaisvarmistetut** ('*in situ*'-varmistetut) pesäkeluvut ovat rinnastettavissa kokonaispesäkelukuihin. Kysymys on ainoastaan 2-vaiheisesta prosessista, missä kaikki tietyllä tavalla reagoivat pesäkkeet katsotaan varmistetuiksi ja lasketaan.

Myös silloin, kun kaikki viljelmän alustavat pesäkkeet varmistetaan yksitellen, on kysymys kokonaisvarmistetusta lukumäärästä. Kokonaisvarmistuksessa saadaan tapauskohtainen korjaus, jossa ei kertoimia tarvita.

Otosvarmistetuissa menetelmissä turvaudutaan osittaiseen varmistukseen. Näissä tapauksissa selvitetään ensin alustava (varmistamattomien) positiivisten pesäkkeiden lukumäärä. Ainoastaan alustavat positiiviset pesäkkeet tai satunnainen otos niistä testataan. Varmistetun mittaustuloksen laskemiseksi alustava tulos kerrotaan **varmistuvuudella** eli tosipositiivisten suhteellisella osuudella. Varmistuvuutta merkitään jatkossa p:llä.

Otosvarmistettujen tulosten korjaus voidaan tehdä missä lopputuloksen laskemisen vaiheessa tahansa. Joko pesäkeluku c (tai C), tiheysarvio x tai lopullinen tulos y kerrotaan p:llä. Varmistuvuus on tavallaan yksi systemaattisten "virheiden" korjauskertoimista, joista muut esitetään luvussa 8.

MPN-menetelmien yhteydessä on periaatteessa kolme varmistamisen tasoa. Jos kaikki kasvua osoittavat (myös vailla positiivista reaktiota olevat) putket siirrostetaan varmistukseen, tilanne vastaa kokonaisvarmistettua pesäkelukua. Jos vain alustavasti positiiviset viljelmät siirrostetaan varmistukseen, kysymyksessä on otosvarmistettu tyyppi, joka vastaa pesäkemenetelmissä sitä, että maljan kaikki alustavasti positiiviset pesäkkeet varmistetaan. On myös mahdollista, että vain osa positiivisista viljelmistä varmistetaan. Tällöin MPN-menetelmissäkin lopputulos korjataan jälkikäteen positiivisten otoksesta lasketulla varmistuvuudella. Kahdessa edellisessä tapauksessa tulosten varmistus on menetelmän sisäistä siinä mielessä, että varmistettu mittaustulos lasketaan tai haetaan varmistuneiden putkien lukumäärän perusteella.

3.4 Eri metrologisten tyyppien yhdistetyt epävarmuudet. Periaatteet.

Mittaustuloksen yleiset laskukaavat sisältävät kaksi tai kolme tulon tekijää. Kokonaispesäkeluku- ja kokonaisvarmistustyyppien tulos lasketaan kaavalla

$$y = Fx \tag{9}$$

ja otosvarmistustyypin kaavalla

$$y = Fpx \tag{10}$$

F = laimennuskerroin,
x = päätesuspension mikrobipitoisuus,
p = varmistuvuus.

Kokonaisepävarmuus koostetaan tekijöiden epävarmuuksista, joten kokonaispesäkeluku- ja MPN-estimaattien epävarmuus on funktio laimennuskertoimen (F) ja tiheysestimaatin (x) epävarmuuksista ja otosvarmistettujen estimaattien epävarmuus on funktio tiheysestimaatin (x), laimennuskertoimen (F) ja varmistumisosuuden (p) epävarmuuksista.

Tiheysestimaatteja on neljä metrologisesti erilaista tyyppiä (ks. 3.2), joten mittausepävarmuuden käsittely hajoaa moneen osaan.

3.4.1 Lukemaepävarmuus

Kvantitatiivisten viljelymenetelmien mittaustuloksen taustalla on positiivisten pesäkkeiden tai putkien lukumäärä. Kokonaan riippumatta siitä onko lukema lähellä tosiarvoa tai kaukana siitä, itse lukeman otto on jossakin määrin epävarmaa. Jos henkilö laskisi pesäkkeet tai putket toistamiseen, tulos ei välttämättä olisi täsmälleen sama kuin ensimmäisellä kerralla.

Toistettavuuden puutteesta käytetään seuraavassa nimitystä lukemaepävarmuus. Merkintänä käytetään yhden maljan tapauksessa u_z (pieni *z*) ja usean maljan pesäkesumman tapauksessa u_Z (iso *Z*). Lukemaepävarmuus on eri asia kuin se epävarmuus, mikä liittyy eri henkilöiden systemaattisiin lukemaeroihin samassa tehtävässä.

Henkilö pystyy yleensä toistamaan oman lukemansa parin prosenttiyksikön sisällä (u_z = 0,01...0,03). Vaikeissa näytetyypeissä ja hankalia menetelmiä käytettäessä lukemaepävarmuus voi olla paljon suurempikin. Niissä tapauksissa se on varteenotettava epävarmuuskomponentti.

4 YHDISTETYN EPÄVARMUUDEN MATEMAATTINEN KOOSTAMINEN

Yhdistetty epävarmuus koostetaan osistaan vektorisumman periaatteella; tekijöiden matemaattisista yhteyksistä riippuen joko suhde- (log-) tai välimatka-asteikossa. Sitä tarkoitusta varten lopullisen mittaustuloksen suhde lähtösuureisiin on pystyttävä ilmaisemaan matemaattisen kaavan muodossa. Kaavan pitäisi sisältää kaikki tarvittavat välitulokset sekä korjaukset ja korjauskertoimet, jotka saattavat vaikuttaa merkittävästi mittaustulokseen ja sen epävarmuuteen.

Jos kaikki epävarmuuskomponentit ovat toisistaan riippumattomia (korreloitumattomia, ortogonaalisia), niin vektorisumman arvo on sama kuin ns. euklidinen etäisyys eli geometrinen summa (neliöjuuri varianssien summasta).

Jos jonkin epävarmuuskomponentin arvo riippuu jonkin toisen epävarmuuskomponentin arvosta, niin nämä epävarmuustekijät ovat korreloituneita. Niiden yhteisvaikutusta arvioitaessa on otettava huomioon myös niiden välinen korrelaatio (kovarianssi). (Ks. lähemmin ISO 1995 ja Eurachem 1995.)

Onneksi mikrobiologisen määrityksen epävarmuuskomponentit ovat suurimmaksi osaksi riippumattomia. Euklidisen summan periaatetta voidaan soveltaa ilman mainittavia epäilyksiä.

Summan ja erotuksen riippumattomat epävarmuuskomponentit yhdistetään absoluuttisina (välimatka-asteikossa) ja tulon ja osamäärän epävarmuuskomponentit suhteellisina (suhde- tai log-asteikossa).

Mikrobiologisissa määrityksissä matemaattinen epävarmuuden arviointi edellyttää usein liikkumista mitta-asteikosta toiseen. Siitä mahdollisesti seuraavien epäselvyyksien vähentämiseksi on tässä oppaassa valittu eri symbolit mittasuureen välimatka-asteikossa mitatulle standardiepävarmuudelle (keskihajonnalle) ja suhde- tai logaritmiasteikossa mitatulle standardiepävarmuudelle (suhteelliselle keskihajonnalle) (ks. 1.1).

4.1 Riippumattomien muuttujien yhdistelykaavat

Olkoon mitattu kahden riippumattoman lähtösuureen A ja B arvot sekä arvioitu niiden keskihajonnat s_A ja s_B tai suhteelliset keskihajonnat u_A ja u_B. Absoluuttisen (s) ja suhteellisen epävarmuuden (u) välinen riippuvuus on: $s_X = u_X X$, missä X on suureen keskiarvo.

A:sta ja B:stä laskettujen yhdistettyjen muuttujien *(A + B)*, *(A - B)*, *AB* ja *A/B* kokonaisepävarmuudet vektorisumman periaatteella laskien ovat:

4.1.1 Summamuuttujan *(A + B)* standardiepävarmuus

$$s_{(A+B)} = \sqrt{s_A^2 + s_B^2} \qquad (11)$$

Summamuuttujan suhteellinen standardiepävarmuus

$$u_{(A+B)} = \frac{s_{(A+B)}}{A+B} \qquad (12)$$

4.1.2 Erotusmuuttujan (A-B) standardiepävarmuus

$$s_{(A-B)} = \sqrt{s_A^2 + s_B^2} \qquad (13)$$

Erotusmuuttujan suhteellinen standardiepävarmuus

$$u_{(A-B)} = \frac{s_{(A-B)}}{A-B} \qquad (14)$$

4.1.3 Tulomuuttujan (AB) standardiepävarmuus

$$s_{AB} = AB\sqrt{\frac{s_A^2}{A^2}+\frac{s_B^2}{B^2}} = AB\ \sqrt{u_A^2+u_B^2}) \qquad (15)$$

Tulomuuttujan suhteellinen standardiepävarmuus

$$u_{AB} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} \qquad (16)$$

4.1.4 Osamäärämuuttujan (A/B) standardiepävarmuus

$$s_{AB} = \frac{A}{B}\sqrt{\frac{s_A^2}{A^2}+\frac{s_B^2}{B^2}} = \frac{A}{B}\ \sqrt{u_A^2+u_B^2}) \qquad (17)$$

Osamäärämuuttujan suhteellinen standardiepävarmuus

$$u_{AB} = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} \qquad (18)$$

Mikrobiologisten mittaustulosten yhdistetyt epävarmuudet saadaan lasketuiksi edellä esitettyjä kaavoja soveltaen. Logaritmit vaativat kuitenkin oman käsittelynsä.

4.2 Keskihajonta, suhteellinen keskihajonta ja logaritmit

On tavallista, että mikrobiologisia mittaustuloksia käsitellään, joskus tarpeettomastikin, logaritmoituina. Huomattava osa kirjallisuudesta löytyvästä mikrobiologisten mittaustulosten hajontaa koskevasta tulosmateriaalista on logaritmiasteikossa eli käytännössä suhdeasteikossa.

4.2.1 Asteikkomuunnokset

Asteikkomuunnosten avain on matemaattinen periaate, jonka Myrberg (1952) on ilmaissut seuraavasti: "*Suureen suhteellinen virhe on likimäärin yhtä suuri kuin sen logaritmin absoluuttinen virhe*". Lauseessa tarkoitettu logaritmi on Neperin järjestelmän (ns. luonnollinen) logaritmi ja virheellä tarkoitetaan sitä, mistä nykyisin mieluummin käytetään nimitystä epävarmuus.

Siis muuntamalla missä tahansa logaritmiasteikossa ilmaistu keskihajonta luonnolliseen logaritmijärjestelmään, saadaan suhteellisen keskihajonnan arvo likimäärin arvioiduksi.

Muunnos tapahtuu kertomalla järjestelmien välisellä modulilla. Luonnollisen järjestelmän moduli kymmenkantaisen (Briggs'in) järjestelmän suhteen on 2,30259, eli käytännössä 2,3 tai 2,303.

4.2.2 Suhteellinen ja prosentuaalinen ilmaisu

Suhteellisen keskihajonnan arvo esitetään yleisesti prosenttilukuna. Koska symbolin % merkitys on "sadasosa" niin abstraktilla tasolla ei tarvitse tehdä eroa prosenttien ja sadasosien välillä (5 % = 0,05). Laskukaavoissa on johdonmukaisesti pitäydyttävä jommassa kummassa lukutyypissä. Tässä kirjoituksessa on valittu ilmaisuksi sadasosat.

4.2.3 Esimerkki asteikkomuunnoksista

Seuraava esimerkki ei ole todistus 4.2.1:ssä esitetylle väittämälle, mutta osoittaa käytännön tasolla sen toimivuuden.

> *Esimerkki 4.1.*
> Erään verrattain epähomogeenisen kohteen kymmenessä riippumattomassa näytteessä on havaittu pesäkelukumäärät: 30, 30, 31, 34, 48, 53, 97, 164, 166, 213. Havainnoista on laskettu:
>
> aritmeettinen keskiarvo 86,6,
> (aritm.) otoskeskihajonta 69,3337,
> ln-muunnetun aineiston otoskeskihajonta 0,7889,
> $\log_{10}$-muunnetun aineiston otoskeskihajonta 0,3426.

Kohdissa 4.2.1 ja 4.2.2 esitettyjä periaatteita soveltaen saadaan suhteellisen keskihajonnan estimaatti kolmella tavalla:

välimatka-asteikko:	69,3337/86,6	=	0,8006	$\approx$	0,80
ln-asteikko:		=	0,7889	$\approx$	0,79
$\log_{10}$-asteikko:	$2,30259 \cdot 0,3426$	=	0,7889	$\approx$	0,79

Arvot eivät poikkea merkittävästi toisistaan.

5 MIKROBIOLOGISTEN VILJELYMÄÄRITYSTEN LASKUKAAVAT JA MATEMAATTISET EPÄVARMUUSMALLIT

Tässä jaksossa esitettävät epävarmuusmallit ovat pelkistettyjä. Niissä ei ole otettu huomioon muista systemaattisista korjauksista kuin laimennus- ja varmistuvuuskorjauksesta johtuvat epävarmuudet. Täydellisempiä malleja käsitellään luvussa 8 ja esimerkissä 10.5.

Mittaustuloksen kokonaisepävarmuuteen vaikuttavien komponenttien perusluettelo selviää kirjoittamalla näkyviin mittaustuloksen laskukaava.

Esimerkiksi kuvan 4 esittämässä tapauksessa mittaustulos y perustuu seuraaviin mittauksiin ja niiden välisiin matemaattisiin suhteisiin:

$$y = \frac{(a_1 + b_1)}{a_1} \cdot \frac{(a_2 + b_2)}{b_2} \cdot \frac{(a_3 + b_3)}{b_3} \cdot \frac{(c_1 + c_2 + c_3 + c_4)}{(v_1 + v_2 + v_3 + v_4)} \tag{19}$$

a_i = i:nnen laimennusvaiheen siirrostilavuus (ml),
b_i = i:nnen laimennusvaiheen laimennusvesitilavuus (ml),
c_j = j:nnen laskettavaksi valitun maljan pesäkelukumäärä,
v_j = j:nnen laskettavaksi valitun maljan siirrostilavuus päätesuspension tilavuusyksikköinä,
i = 1...3, j = 1...4.

Mittauksia, joista mittaustulos koostuu on 14 (3 kpl a, 3 kpl b, 4 kpl c ja 4 kpl v). Jokaiseen niistä liittyy epävarmuutta. Mittaustuloksen kokonaisepävarmuus on niiden yhdistelmä. Laskukaavojen yksinkertaistamiseksi on tarkoituksenmukaista käsittää koko laimennusmittausten sarja yhdeksi prosessiksi, jonka seurauksena on laimennuskerroin F.

Laimennuskertoimen F epävarmuus esitetään kohdassa 5.1, otosvarmistettujen tulosten varmistuvuuden p epävarmuus kohdassa 5.2 ja eri metrologisten tyyppien suspensiotiheyden estimaattien epävarmuudet kohdissa 5.3.1-5.3.4.

Lisäksi lopputuloksen epävarmuuteen vaikuttaa tuloksen lukijan henkilökohtainen lukemaepävarmuus u_z (3.4.1).

5.1 Laimennuskerroin ja sen epävarmuus

5.1.1 Kuvitteelliset laimennuskertoimet f ja F

Yksittäinen laimennusvaihe saadaan aikaan pipetoimalla mikrobisuspensiosta tilavuus a steriilin laimennusliuoksen tilavuuteen b. Laimentumisen monikerta, laimennuskerroin f, saadaan kaavasta

$$f = \frac{a + b}{a} \tag{20}$$

k:sta perättäisestä laimennusvaiheesta koostuva laimennuskerroin lasketaan kaavalla:

$$F_k = \frac{a_1 + b_1}{a_1} \cdot \frac{a_2 + b_2}{a_2} \cdot \ldots \cdot \frac{a_k + b_k}{a_k} = f_1 \cdot f_2 \cdot \ldots \cdot f_k \tag{21}$$

Useimmissa tapauksissa laimennussarja on säännöllinen, niin että tilavuudet a ja b ovat kaikissa vaiheissa samoja. Silloin k:n vaiheen kokonaiskerroin on

$$F_k = f^k = \left(\frac{a+b}{a}\right)^k \tag{22}$$

Laimennuskertoimet f ja F ovat siinä mielessä "kuvitteellisia", että mitattujen tilavuuksien a ja b oletetaan todella olevan ilmoitettujen nimellistilavuuksien suuruisia (keskimäärin).

5.1.2 Kuvitteellisten laimennuskertoimien f ja F epävarmuus

Tilavuuksista a ja b koostuvan yhden laimennusvaiheen kertoimen (f) epävarmuus u_f saadaan arvioimalla yhdistetty epävarmuus toimitukselle

$$f = \frac{a+b}{a} \tag{23}$$

Kaavan (23) osoittaja ja nimittäjä ovat korreloituneita (sama a). Korrelaation takia ei sovelleta riippumattomien muuttujien osamäärän kaavaa, vaan laimennuskertoimen (f) standardiepävarmuus saadaan kaavasta

$$s_f = \sqrt{\frac{s_b^2}{a^2} + \frac{b^2\, s_a^2}{a^4}} \tag{24}$$

ja suhteellinen standardiepävarmuus kaavasta

$$u_f = \frac{1}{(a+b)}\sqrt{s_b^2 + \left(\frac{b}{a}\right)^2 s_a^2} = \frac{1}{(a+b)}\sqrt{s_b^2 + b^2\, u_a^2} \tag{25}$$

$$u_F = \sqrt{k u_f^2} \tag{26}$$

Jos kokonaiskerroin (F) koostuu k:sta samanlaisesta laimennusvaiheesta, sen kokonaisepävarmuus on samojen periaatteiden mukaisesti

Jos vaiheet ovat tilavuusrakenteeltaan erilaisia, kunkin suhteellinen epävarmuus on laskettava erikseen ja laimennuskertoimen epävarmuus on niiden vektorisumma (neliöiden summan neliöjuuri).

$$u_F = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + \ldots + u_k^2} \tag{27}$$

5.1.3 Laimennuskertoimen (F) systemaattinen harha ja sen korjaus. Todellinen laimennuskerroin F' ja sen epävarmuus.

Pääsääntöisesti laboratoriot kuvittelevat nestemittausten systemaattiset harhat olemattomiksi tai ainakin merkityksettömiksi ja käyttävät huolettomasti kuvitteellisia laimennuskertoimia mittaustuloksia laskiessaan.

Mitatut tilavuudet eivät kuitenkaan välttämättä ole keskimäärin oletetun suuruisia. Tilavuus voi muuttua steriloitaessa nesteitä autoklaavissa eikä pipettien ja annostelijoiden antavuus ole välttämättä nimellisarvon mukaista. Systemaattiset harhat ovat välinekohtaisia ja pipetointien osalta jopa osittain työntekijäkohtaisia. Kirjallisuudessa julkaistut kokeelliset havainnot eivät ole yleispäteviä.

Jos laimennusmittausten nimellistilavuuksiin *a* ja *b* on havaittu liittyvän systemaattiset virheet suuruudeltaan keskimäärin Δa ja Δb, niin k-portaisen laimennussarjan todellinen laimennuskerroin on

$$F'_k = \left(\frac{a + \Delta a + b + \Delta b}{a + \Delta a} \right)^k \tag{28}$$

Tilavuuksien "tosiarvot" $(a + \Delta a)$ ja $(b + \Delta b)$ saadaan kokeellisista kalibrointimittauksista. Tilavuuksien mittausepävarmuudet selviävät samassa yhteydessä.

Todellisen laimennuskertoimen epävarmuuden arvo on sama kuin kuvitteellisen laimennuskertoimen (*F*) epävarmuus (5.1.2).

5.2 Varmistuvuuden (p) epävarmuus

Varmistuvuus on varmistuneiden tapausten ja alustavien positiivisten tapausten suhde; eräänlainen tunnistamisen tai onnistumisen todennäköisyys. Mikäli tapauskohtainen kokonaisvarmistus ei tule kysymykseen, on hyväksyttävä jokin yleistävä yksinkertaistus. Varmistuvuuden lukuarvo estimoidaan eristämällä **satunnaisesti** *n* alustavasti positiivista pesäkettä ja toteamalla varmistuneiden lukumäärä (*k*). Merkitään varmistuvuutta *p*:llä. Sen paras estimaatti on

$$\hat{p} = \frac{k}{n} \tag{29}$$

HUOM. Sanaa 'satunnaisesti' ei voi liikaa korostaa. Missään eristämisen vaiheessa ei saa antaa subjektiivisen valinnan ohjata poimintaa alustavien positiivisten pesäkkeiden joukosta. Suositus valita jokaisen eri pesäketyypin edustaja varmistettavaksi on suorastaan vaarallinen.

> Koska pesäkkeiden aiheet joutuvat maljalle alun alkaen satunnaisiin paikkoihin, satunnaisen eristämisen menettelyksi riittää valita mielivaltainen aloituspaikka ja eristää siitä alkaen esimerkiksi kalvosuodattimen ruuturiviä pitkin edeten jokainen vastaan tuleva alustavat ulkonäkökriteerit täyttävä pesäke kunnes etukäteen valittu määrä tulee täyteen. On luvallista hypätä sellaisen pesäkkeen yli, jonka eristäminen puhtaana tuntuu hyvin epätodennäköiseltä. On pyrittävä vastustamaan kiusausta valita aloituskohta aina siten, että paras pesäke tulee varmasti eristettyjen joukkoon.

Tapauskohtainen tosipositiivisten osuuden (varmistuvuuden) estimointi olisi toivottavaa. Ellei se ole mahdollista, voi olla pakko jopa kuvitella varmistuvuuden olevan menetelmäkohtainen vakio. Aineiston karttuessa tulee mahdolliseksi ryhmitellä näytetyypit varmistuvuuden mukaisiin luokkiin, mikäli tarpeen.

Koska esimerkiksi ympäristönäytteissä varmistuvuus oletettavasti vaihtelee näytepaikkakohtaisesti ja vuodenajoittain, niin hyväksyttävimmältä tuntuu sellainen ratkaisu, että vähitellen näyte näytteeltä kerätään tietoa, joka ajan oloon ryhmitellään paitsi näytetyyppi- ja vuodenaika- myös työntekijäkohtaisesti. Lopulta p:n estimaatit täsmentyvät ja mittaustulosten epävarmuus vastaavasti pienenee. Silti tällaisen estimaatin yleispätevyyden suhteen on aina pieni epäilys.

Varmistuvuuden varianssi on Var(p) = $p(1\text{-}p)/n$ (binomijakauma).

p esiintyy mittaustulosten laskukaavoissa (3.2, 3.3) tulon tekijänä, joten sen epävarmuuden käyttökelpoisin ilmaisu on suhteellinen keskihajonta. Sen voi laskea kaavalla

$$u_p = \frac{1}{p}\sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} = \sqrt{\frac{1-p}{np}} \qquad (30)$$

missä p on tunnetuksi kuviteltu tai aikaisemmasta aineistosta laskettu varmistuvuuden arvo ja n on se pesäkkeiden lukumäärä, johon arvon määritys perustui.

p:n arvoa ei koskaan varmasti tiedetä etukäteen. Periaatteessa se tulisi määrittää jokaisen näytteen kohdalla erikseen. Siinä tapauksessa, että näin menetellään, p:n estimaatiksi valitaan tapauskohtainen varmistuvuus $\hat{p} = \frac{k}{n}$. Sen epävarmuuden laskukaava on

$$u_{\hat{p}} = \sqrt{\frac{n-k}{nk}} \qquad (31)$$

n = varmistettavaksi valittu pesäkkeiden lukumäärä,
k = positiivisiksi varmistuneiden lukumäärä.

Näytekohtainen muutaman pesäkkeen varmistaminen on hyvin epäedullista mittausepävarmuuden kannalta. Jos varmistettavaksi valitaan 5 pesäkettä, p:n suhteellinen epävarmuus on luokkaa 19-22 % ja kymmenenkin pesäkkeen eristyksessä on epävarmuus vielä 10-16 %. Vasta kun on tutkittu ainakin 100 pesäkettä tulee varmistuvuus arvioiduksi alle 5 % suhteellisella epävarmuudella.

5.3 Kvantitatiiviset mikrobipitoisuusestimaatit ja niiden epävarmuus

Pesäkkeiden laskemiseen perustuvien menetelmien kahdesta päätyypistä käytettiin edellä nimityksiä **kokonaispesäkeluku-** ja **otosvarmistustyypit**. Kokonaispesäkelukutyyppiin kuuluvat pesäkemenetelmät, joissa kaikki tai kaikki tietyt ulkonäkökriteerit täyttävät pesäkkeet (myös bakteriofagien plakit) lasketaan. Ns. *in situ*-varmistukset, missä maljan kaikille pesäkkeille tehdään jokin varmistava mittaus reagenssilisäyksen tai kalvosuodattimen siirron avulla, kuuluvat samaan tyyppiin, samoin kuin tapauskohtaisesti täysin varmistetut pesäkeluvut. Näitä tuloksia ei korjata jälkikäteen varmistuvuuskertoimella.

Otosvarmistettuihin pesäkelukuihin (ks. 3.3) tehdään varmistuvuuskorjaus.

5.3.1 Yhden maljan instrumentti

Yhden maljan mittalaite syntyy, kun ei tehdä rinnakkaismaljoja ja jonkin rajoittavan laskusäännön (10-100, 25-250, 30-300 tms.) tai muun syyn takia käytettävissä on vain yksi laimennus (kuva 3). Toisinaan näyte katsotaan niin tutuksi, että alunperin valmistetaan vain yksi malja.

Toistojen puuttuessa A-tyyppinen kokonaisepävarmuuden arvio ei ole mahdollinen. Mittaustuloksen yhdistetty epävarmuus lasketaan tunnetuiksi oletetuista epävarmuuskomponenteista.

Yhden maljan havaittuun pesäkkeiden lukumäärään vaikuttaa lähinnä neljä epävarmuustekijää: hiukkastilastollinen hajonta (7.2), laimennuskertoimen (5.1) ja siirrostilavuuden (7.4) epävarmuus sekä henkilökohtainen lukema(epä)varmuus (3.4.1, 7.1). Kokonaispesäkelukutyypin estimaatti saadaan laskutoimituksesta

$$y = F\frac{c}{v} \tag{32}$$

Kaavassa

F = kuvitteellinen tai todellinen laimennuskerroin,
c = maljan pesäkelukumäärä,
v = siirrostilavuus.

Mittaustuloksen kokonaisepävarmuus ilman henkilökohtaista lukemaepävarmuuden komponenttia on 4.1:ssä esitettyjen periaatteiden mukaan

$$u_y = \sqrt{u_F^2 + u_c^2 + u_v^2} \tag{33}$$

u_F = laimennuskertoimen suhteellinen standardiepävarmuus (kts. 5.1.2, 5.1.3),
u_c = pesäkelukumäärän suhteellinen hiukkastilastollinen hajonta (ks. 7.2),
u_v = siirrostilavuuden suhteellinen mittausepävarmuus (ks. 7.4).

Henkilökohtainen lukemaepävarmuus (u_z) otetaan päätesuspension tiheysestimaatissa huomioon lisäterminä, joten mittaustuloksen kokonaisepävarmuus on

$$u_y = \sqrt{u_F^2 + u_c^2 + u_v^2 + u_z^2} \qquad (34)$$

Pesäkkeiden lukumäärän laskeminen ei kenelläkään ole erehtymätöntä. Tulos vaihtelee, jos henkilö laskee saman maljan pesäkkeet uudestaan. Yleensä lukeman suhteellinen toistettavuus on sangen hyvä ja henkilökohtaisesti varsin vakinainen, vaikkakin eri menetelmien kohdalla erilainen. Joissakin hankalissa menetelmissä ja näytetyypeissä tuloksen lukeminen voi olla niin epävarmaa, että tämä on syytä huomioida lukemaepävarmuuden komponentin muodossa. Lukemaepävarmuudesta on syytä ottaa selvää lukemalla pieni osa rutiinimaljoista kahdesti mieluiten siten, että vasta ensimmäisen lukukerran jälkeen katsotaan arvalla kuuluuko malja uudestaan luettavien joukkoon. Se, että valitaan ainoastaan ongelmatapauksia uudelleen laskettaviksi, vääristää lukemaepävarmuuden arvioinnin täysin.

Toistotuloksista voidaan laskea esimerkiksi varianssianalyysin avulla henkilön tuloksen toistettavuuskeskihajonta u_z suhdeasteikossa (ln-muunnetuista pesäkeluvuista).

Jos yksimaljaisen instrumentin tulos on varmistettava, niin lopputulos saadaan kaavasta

$$y = pF\frac{c}{v} \qquad (35)$$

ja suhteellinen kokonaisepävarmuus kaavasta

$$u_y = \sqrt{u_p^2 + u_F^2 + u_c^2 + u_v^2 + u_z^2} \qquad (36)$$

Vain p:n epävarmuus on uutta edelliseen (ks. 5.2).

5.3.2 Monen maljan instrumentti

Kun laskettavia maljoja on enemmän kuin yksi, niin päätesuspension mikrobitiheys saadaan ns. painotetun keskiarvon periaatteella jakamalla pesäkesumma siirrostilavuuksien summalla. Siirrokset on tässä tapauksessa ilmaistava päätesuspension tilavuuksina. Mittaustulos laimennuskertoimella korjaamisen jälkeen on

$$y = Fx = F\frac{\Sigma c_i}{\Sigma v_i} = F\frac{C}{V} \qquad (37)$$

$F =$ laimennuskerroin,
$C =$ Σc_i = pesäkelukujen summa,
$V =$ Σv_i = siirrostilavuuksien summa.

Kaavan samankaltaisuus yhden maljan kaavan kanssa osoittaa, että monimaljaisen detektioinstrumentin mittaustuloksen kokonaisepävarmuus saadaan yhdistämällä laimennuskertoimen ja pesäke- ja tilavuussummien suhteelliset epävarmuudet

$$u_y = \sqrt{u_F^2 + u_C^2 + u_V^2} \qquad (38)$$

Kaavoissa:

F = kuvitteellinen tai todellinen laimennuskerroin ja u_F sen suhteellinen keskihajonta (5.1.2, 5.2.3),
C = maljojen pesäkesumma ja u_C sen suhteellinen hiukkastilastollinen keskihajonta (7.2),
V = siirrostilavuuksien summa ja u_V sen suhteellinen keskihajonta (7.5).

Lukemaepävarmuuden arvo koko maljasarjalle lasketaan kuten kohdassa (7.1.1) on esitetty. Arvo liitetään haluttaessa mittaustuloksen epävarmuusestimaattiin, kuten edellä (5.3.1).

Jos lopputuloksen pitää olla varmistettu, kaavoihin liitetään varmistuvuus ja sen epävarmuus kuten (5.3.1):ssä.

Tilavuussumman V epävarmuuden laskeminen on verrattain mutkikasta (ks. 7.5). Monen maljan määritysten epävarmuusarviossa kannattaakin hyödyntää sitä tietoa, että havaittujen pesäkelukumäärien välinen vaihtelu sisältää luonnostaan hiukkastilastollisen hajonnan ohella laimennus- ja tilavuusmittausten epävarmuudet sekä tuloksen lukijan henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden. Tämän ansiosta monen maljan "instrumentin" päätesuspension tiheyden (x) kokonaisepävarmuus voidaan perustaa myös pelkästään maljojen väliseen hajontaan (Luku 6).

5.3.3 Yhden laimennustason MPN-instrumentti

Mittaustulos saadaan laskukaavasta

$$y = Fx = F\frac{1}{v}\ln\left(\frac{n}{s}\right) \qquad (39)$$

F = päätesuspension todellinen tai kuvitteellinen laimennuskerroin,
v = yhden koeannoksen tilavuus,
n = kasvukennojen (putkien) kokonaislukumäärä,
s = steriileiksi (tai negatiivisiksi) todettujen kasvukennojen lukumäärä.

On myös taulukoita (esim. SFS 4447:1979, Niemelä 1983) missä on annettu positiivisten tulosten lukumäärään perustuva MPN-arvo ja sen 95 % luottamusväli. Monipuolisimmat tietokoneohjelmat (Hurley ja Roscoe, 1983) antavat näiden lisäksi keskihajonnan $\log_{10}$-asteikossa.

Laimennuskertoimeen (F) ja siirrostilavuuden mittauksiin (v) liittyy epävarmuutta. Kuitenkin siirrostetun kokonaistilavuuden $V = nv$ epävarmuus u_v tasoittuu yleensä merkityksettömäksi, koska se noudattaa kaavaa

$$u_V = \frac{1}{V}\sqrt{nv^2u_v^2} = \sqrt{\frac{nv^2u_v^2}{(nv)^2}} = \sqrt{\frac{u_v^2}{n}} = \frac{u_v}{\sqrt{n}} \qquad (40)$$

Kun tietolähteet antavat 95 % luottamusvälin, MPN-estimaatin tai päätesuspension mikrobitiheyden suhteellisen keskihajonnan arvo voidaan johtaa niistä logaritmimuunnosten avulla seuraavasti.

i) Oletetaan, että taulukoista tai tietokoneohjelmista saadaan 95 % luottamusväli muodossa yläraja = x_Y, alaraja = x_A.

Yksinkertaisinta on laskea suhteellinen epävarmuus kaavalla

$$u_{MPN} = \frac{\ln(x_Y) - \ln(x_A)}{4} \tag{41}$$

ii) Kun tietokoneohjelma (esim. Hurley ja Roscoe 1983) antaa MPN-estimaatin keskihajonnan Log10-järjestelmässä (S.E. of Log10 MPN), niin tarvitaan ainoastaan muunto luonnolliseen logaritmijärjestelmään modulilla (2,303) kertomalla (kts. 4.2.1).

iii) Kun tietolähteiden puuttuessa mittausepävarmuus joudutaan arvioimaan omin avuin, niin lasketaan ensin "yksinkertaiset" ylä- ja alarajat. Arviot perustuvat ajatukseen, että steriilien putkien määrä (s) vaihtelee satunnaisesti hiukkastilastollisista syistä. Voidaan olettaa, että vaihtelu on binomijakauman mukaista, niin että s:n varianssi on $s(n\text{-}s)/n$. Näin on menetelty mm. NMKL:n mittausepävarmuusdokumentissa (NMKL, 1999).

Lasketaan ensin MPN-tiheysestimaatin ylä- ja alalikiarvot (x_Y, x_A).

$$x = \frac{1}{v}\ln\left(\frac{n}{s \pm \sqrt{\frac{s(n-s)}{n}}}\right) \tag{42}$$

(Plusmerkki nimittäjässä liittyy alalikiarvoon ja miinusmerkki ylälikiarvoon.)

Estimaatin suhteellinen epävarmuus arvioidaan ottamalla raja-arvoista luonnolliset logaritmit ja jakamalla niiden erotus kahdella. Nimitetään sitä tiheysestimaatin suhteelliseksi epävarmuudeksi u_{MPN}:

$$u_{MPN} = \frac{\ln(x_Y) - \ln(x_A)}{2} \tag{43}$$

x_Y = ylälikiarvo,
x_A = alalikiarvo.

Kuten todettu, siirrostilavuuden v epävarmuudesta ei tarvitse välittää, koska sillä on mitätön vaikutus yhdistettyyn epävarmuuteen.

Laimennuskertoimen epävarmuus saattaa olla merkittävä, joten se kannattaa huomioida suhteellisen kokonaisepävarmuuden kaavassa:

$$u_y = \sqrt{u_F^2 + u_{MPN}^2} \tag{44}$$

u_F = kuvitteellisen tai todellisen laimennuskertoimen suhteellinen keskihajonta (5.1.2, 5.1.3),
u_{MPN} = suspensiotiheyden suhteellinen hiukkastilastollinen epävarmuus.

Lukemisen epävarmuuteen ei MPN-menetelmissä ole tavattu kiinnittää huomiota.

5.3.4 Usean laimennustason MPN-instrumentti

Epävarmuusparametrin arvo perustuu mittaustuloksen laskukaavaan

$$y = F \cdot MPN \tag{45}$$

missä F on kuvitteellinen tai todellinen laimennuskerroin ja MPN on taulukoiden tai tietokoneohjelman antama todennäköisin bakteerimäärä.

MPN-menetelmien piilevät olettamukset ovat, että kaikki detektioinstrumentin sisäiset laimennukset sekä detektorien siirrostamiseksi tarvitut suspensioiden mittaukset on tehty virheettömästi ja kaikki suspensiot ovat niin täydellisesti sekoitettuja, että Poisson-jakauma pätee.

Jos Poisson-jakauma ei päde, mittaustulos on arvoton eikä sitä pidä käyttää. Poisson-jakaumaa ei kuitenkaan yleensä aseteta kyseenalaiseksi MPN-menetelmiä käytettäessä ehkä mittaustuloksen menetyksen pelossa. Eräät modernit MPN-arvojen taulukot ottavat tämän huomioon eivätkä anna tulosta putkisarjoille, joiden tilastollinen pätevyys on kyseenalainen.

Yhdistetyn epävarmuuden malli on

$$u_y = \sqrt{u_F^2 + u_{MPN}^2} \tag{46}$$

MPN-arvon mittausepävarmuuden suhteen ollaan riippuvaisia joko taulukoista tai tietokoneohjelmista, joista itse MPN-arvokin haetaan. Molemmat lähteet ilmoittavat tavallisesti laajennetun epävarmuuden (95 % luottamusvälin) ylä- ja alalikiarvojen muodossa. Tällöin menetellään kuten vaihtoehdossa i) (5.3.3). Vaihtelu edustaa pelkästään systeemin hiukkastilastollista hajontaa. Koska luottamusvälin estimointimenetelmiä on useanlaisia, eri tietokoneohjelmat tai taulukot saattavat antaa toisistaan poikkeavia arvoja.

Monipuolisin tietokoneohjelma (Hurley ja Roscoe 1983) antaa luottamusvälin lisäksi keskihajonnan arvon Log_{10}-asteikossa.

Omakohtainen mahdollisuus estimoida hiukkastilastollisen hajonnan osuus on laskea Log_{10}MPN-arvon keskihajonta Cochran'in (1950) esittämästä likimääräiskaavasta

$$s_{LogMPN} = 0{,}58\sqrt{\frac{\log_{10} f}{n}} \tag{47}$$

f = kahden perättäisen tason välinen laimennuskerroin,
n = yhden sarjan rinnakkaisputkien lukumäärä.

Se muunnetaan MPN-arvon suhteelliseksi keskihajonnaksi kertomalla ln-järjestelmän modulilla $\log_{10}$-järjestelmän suhteen, eli luvulla 2,303.

Pipetointien ja muiden tilavuusmittausten epävarmuus ei sisälly edellä esitettyyn epävarmuusmalliin, mutta voitaisiin tarvittaessa huomioida. On osoittautunut, että vaikutus kokonaisepävarmuuteen on mitätön ja perusolettamukset ovat tilavuusmittausten osalta riittävän hyvin voimassa.

Laimennuskertoimen epävarmuudella saattaa olla sen verran vaikutusta, että se kannattaa huomioida samalla tavalla kuin edellä (5.3.3).

6 OIKOTIE MONIMALJAISEN MITTALAITTEEN EPÄVARMUUTEEN

Kun samasta päätesuspensiosta on suoraan tai lisälaimennusten avulla valmistettu useita maljoja, syntyy monimaljainen instrumentti.

HUOM. Monen maljan mittalaitteessa ei ole aihetta noudattaa monasti esitettyjä maljakohtaisia pesäkelukujen alarajoja. Enintään voidaan vaatia, että koko detektioinstrumentin eli kaikkien huomioon otettujen maljojen yhteenlasketun pesäkemäärän pitää olla jotakin alarajaa, esim. 30, suurempi. Maljakohtaiset ylärajat pysyvät aina voimassa.

Monesta maljasta koostuvan detektioinstrumentin eri maljojen pesäkelukumäärät sisältävät paitsi suspensioiden hiukkastilastollisen hajonnan myöskin siirrostilavuuksien ja laimennusmittausten sekä henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden aiheuttamat vaihtelut. Syystä, että maljoja on useita, on mahdollista arvioida systeemin tapauskohtainen epävarmuus, instrumenttivirhe, maljasarjan yhteensopivuusmitan G^2 avulla. Tällöin tilavuushajonnan ja lukemaepävarmuuden arviointi erikseen muuttuu tarpeettomaksi. Ainoa mahdollisesti huomioitava lisäkomponentti on laimennuskertoimen epävarmuus. Tällöin mittaustuloksen kokonaisepävarmuus on

$$u_y = \sqrt{u_x^2 + u_F^2} \tag{48}$$

$u_x =$ päätesuspension tiheysestimaatin (x) epävarmuus,
$u_F =$ laimennuskertoimen (F) epävarmuus.

Hajonta sisältyy yhteen mittalukuun, jonka arvioimiseksi lasketaan ns. uskottavuusosamääräindeksin arvo G^2

$$G_{n-1}^2 = 2\left[\sum_{i=1}^{n} c_i \ln\left(\frac{c_i}{v_i}\right) - \left(\sum c_i\right)\ln\left(\frac{\sum c_i}{\sum v_i}\right)\right] \tag{49}$$

$c_i =$ i:nnen maljan pesäkelukumäärä,
$v_i =$ i:nnen maljan siirrostilavuus ilmaistuna päätesuspension tilavuusyksiköissä,
$n =$ maljojen lukumäärä.

G^2-arvon laskeminen käsityönä saattaa tuntua työläältä. BASIC-kielinen tietokoneohjelma tehtävän ratkaisemiseksi (IDF 1994) on esitetty liitteessä C käyttöesimerkillä täydennettynä.

Määrätyillä likimääräisillä olettamuksilla G^2 arvosta saadaan käytössä olleen monimaljaisen instrumentin antaman tuloksen (ja samalla päätesuspension tiheyden) suhteellisen epävarmuuden neliö, jota tarvitaan kaavassa (48)

$$u_x^2 = \frac{G_{n-1}^2}{(n-1)} \cdot \frac{1}{\sum ci} \tag{50}$$

$c_i =$ i:nnen maljan pesäkelukumäärä,
$n =$ maljojen lukumäärä,
$G^2_{(n-1)} =$ uskottavuusosamääräindeksi.

HUOM. Saattaa sattua että osamäärä G^2_{n-1}/(n-1) tulee pienemmäksi kuin 1. Silloin sen arvoksi otetaan luku 1, jotta kokonaisepävarmuus ei jäisi pienemmäksi kuin pelkkä teoreettinen hiukkastilastollinen hajonta on.

Jos osamäärän G^2/(n-1) arvo on korkea, suurempi kuin 5, niin pesäkelukusarjan kaikinpuolinen luotettavuus on kyseenalainen. On harkittava sen hylkäystä kokonaan tai löydettävä ja poistettava sen epäonnistuneet osat.

7 YKSITTÄISTEN EPÄVARMUUSKOMPONENTTIEN ARVIOIMINEN

Kvantitatiivisten pesäkemenetelmien laskukaavojen peruselementit ovat laimennuskerroin F, siirrostilavuus v, ja pesäkelukumäärä c; otosvarmistustyypeissä lisäksi varmistuvuus p.

Laimennuskertoimen ja varmistuvuuden epävarmuuden arviointia on käsitelty jaksoissa (5.1.2, 5.1.3 ja 5.2).

Lisäksi kaikkiin lukemiin liittyy henkilökohtainen lukemaepävarmuus (ks. huomautusta jaksossa 5.3.1).

7.1 Lukemaepävarmuus

Yksittäisen pesäkelukumäärän suhteellinen lukemaepävarmuus u_z määritetään kuten esimerkissä 9.3 on esitetty vähintään 30 maljan tuloksista (ks. myös huomautusta kohdassa 5.3.1).

7.1.1 Monen maljan yhdistetty lukemaepävarmuus u_Z

Lukemaepävarmuus monen maljan tapauksessa saadaan kaavasta
(huom. iso Z-kirjain alaindeksinä summan merkiksi)

$$u_Z = u_z \frac{\sqrt{\Sigma c_i^2}}{\Sigma c_i} \tag{51}$$

u_z = yhden maljan (vakioksi oletettu) suhteellinen lukemaepävarmuus (pieni z),
c_i = i:nnen maljan pesäkelukumäärä,
u_Z = pesäkelukusumman C lukemaepävarmuus (iso Z).

7.2 Yhden pesäkelukumäärän c hiukkastilastollinen hajonta

Hiukkastilastollisella hajonnalla tarkoitetaan täydellisesti sekoitetun suspension samankokoisiin, virheettömästi mitattuihin rinnakkaisnäytteisiin sattuvien hiukkasmäärien vaihtelua. Tätä osaa pesäkemäärän vaihtelusta voidaan kuvata Poisson-jakaumaksi nimitetyllä todennäköisyysmallilla. Tuloksen lukemiseen liittyvä lisäepävarmuus voidaan ottaa huomioon, kuten jaksossa (8.2) on esitetty ja siirrostilavuuden epävarmuus jakson (7.4) mukaisesti.

Yleensä voidaan turvallisesti olettaa maljan pesäkemäärän c olevan peräisin täydellisesti sekoitetusta päätesuspensiosta. Lukuarvon hiukkastilastollinen epävarmuus voidaan arvioida Poisson-teorian perusteella. Koska pesäkeluku esiintyy kaikissa mittaustulosten laskukaavoissa tulon/osamäärän tekijänä, niin pesäkeluvun suhteellinen keskihajonta u_c on sen mittausepävarmuuden hyödyllisin esitysmuoto:

$$u_c = \sqrt{\frac{1}{c}} \tag{52}$$

7.3 Pesäkesumman C hiukkastilastollinen hajonta

Monimaljaisen instrumentin tuloksista laskettu pitoisuusestimaatti, ns. painotettu keskiarvo, perustuu kaikkien pesäkelukujen summaan ($C = \Sigma c$) ja yhdistettyyn siirrostilavuuteen ($V = \Sigma v$) (5.3.2). Poisson-jakauman additiivisuuden ansiosta pesäkesumman suhteellinen hiukkastilastollinen keskihajonta on

$$u_C = \sqrt{\frac{1}{\Sigma c_i}} = \sqrt{\frac{1}{C}} \tag{53}$$

C = instrumentin pesäkelukumäärien summa.

Kaava on muodoltaan sama kuin yhden maljan tapauksessa, mutta lukuarvo on yleensä pienempi suuremman pesäkkeiden kokonaismäärän ansiosta.

7.4 Siirrostilavuuden (v) volumetrinen epävarmuus

Vaikka pipetoitu tai mitattu tilavuus olisi keskimäärin oikea, siihen liittyy aina jonkin suuruinen epävarmuus, joka on ilmaistavissa keskihajontana (s_v ml) tai suhteellisena keskihajontana (esimerkiksi prosentuaalisesti).

Volumetrinen epävarmuus koostuu pääasiassa kolmesta osatekijästä:

- mittauksen toistettavuudesta, kun sama pipetti tai pullo täytetään toistuvasti merkkiin asti,
- lasitavaran valmistajan ilmoittamasta spesifikaatiosta, joka tarkoittaa mihin rajoihin ilmoitettu nimellistilavuus todellisuudessa osuu,
- lämpötilan vaikutuksesta, kun mittaus tapahtuu eri lämpötilassa kuin kalibrointi.

Näiden moninaisten vaikuttavien tekijöiden takia on yleensä melko työlästä laskea pipetoidun tilavuuden B-tyyppistä epävarmuutta. Tähän menettelyyn on turvauduttava silloin, kun kysymyksessä olevan pipetin tai tilavuuden A-tyyppistä, kokeellisiin arvoihin perustuvaa arviota ei ole käytettävissä.

Lämpölaajenemisen aiheuttamaa epävarmuutta mitattuun tilavuuteen ei mikrobiologisten laimennussarjojen yhteydessä tarvitse ottaa huomioon syystä, että 10 °C:kaan ero lämpötilassa ei aiheuta havaittavaa lisäepävarmuutta mikrobiologiassa käytettyjen pipettien suuren luontaisen epävarmuuden rinnalla.

Mikrobiologiassa ei suuresti hyödytä tuntea yhden pipetin tai kärjen toistuvan täytön epävarmuutta - annostelijan kylläkin. (Aseptiikkasyistä pipetti tai kärki pitää tavallisesti vaihtaa pipetointien välillä.)

Volumetrisen epävarmuuden kokeellinen määritys tapahtuu punnitsemalla. Jokaista mittausta varten poimitaan eri pipetti tai kärki. Tällöin tulevat sekä spesifioidun epätarkkuuden että täytön toistettavuuden vaikutukset huomioiduiksi samanaikaisesti.

Tulos ilmoitetaan tilavuuskeskihajontana tai suhteellisena keskihajontana (usein prosentuaalisesti).

Lukuarvoja löytyy runsaasti myös kirjallisuudesta (ks. Liite A), mutta niiden yleispätevyys ei liene taattu.

7.5 Siirrostilavuuksien summan (V) volumetrinen epävarmuus.

On yksinkertaisinta ajatella, että monen maljan detektioinstrumenttiin on mitattu yhteensä $V = \Sigma v$ ml laimennussarjan päätesuspensiota vaikka todellisuudessa osa tilavuuksista on saatettu saada lisälaimennusten kautta. Kokonaistilavuuden epävarmuus arvioidaan siihen sisältyvien laimennusvesien ja siirrostilavuuksien epävarmuustiedoista.

Luonteenomaista lopputulokselle on, että yhteistilavuuden suhteellinen (prosentuaalinen) epävarmuus on aina pienempi kuin minkään yksittäisen tilavuusmittauksen epävarmuus.

Näytetilavuuden (V) epävarmuus on osatilavuuksien epävarmuuksien neliösumman neliöjuuri (tilavuusasteikossa):

$$s_V = \sqrt{s_{v_1}^2 + s_{v_2}^2 + \ldots} \qquad (54)$$

Tilavuuksien epävarmuudet ilmaistaan yleisesti suhdeasteikossa (prosentteina) mutta laskutoimitukset vaativat käyntiä myöskin välimatka-asteikossa. Esimerkit 9.6.1 ja 9.6.2 valaisevat asiaa.

8 SYSTEMAATTISET KORJAUKSET JA NIIDEN EPÄVARMUUS. "TÄYDELLISET" MALLIT.

Edellä (5.3.1-5.3.4) esitetyt mittaustulosten laskukaavat ja niihin pohjautuvat epävarmuusarviot ovat siinä suhteessa alkeellisia, että yritystä systemaattisten vaikutusten korjaamiseksi ei ole tehty. Luvussa 3 esitetty mittaustulosten yhteinen laskukaava $y = Fx$ edustaa optimistista yksinkertaistusta.

Metrologian periaatteiden mukaan edellytetään, että ilmoitettu mittaustulos sisältää kaikki merkittävät **systemaattiset korjaukset** (ISO 1995). Korjausten epävarmuudet puolestaan ovat lisinä yhdistetyssä epävarmuudessa.

8.1 Korjausten luonne

Mikrobiologisissa viljelymenetelmissä muut paitsi yksittäisten tilavuusmittausten korjaukset ovat luonteeltaan korjauskertoimia, joilla mittaustulos on kerrottava. Sensijaan, että mittaustulokseksi ilmoitettaisiin pelkkä perushavainnoista (c, v, F, p) laskettu mittaustulos (y), lopulliseksi mittaustulokseksi ilmoitetaan korjattu mittaustulos, missä esimerkiksi m kappaletta systemaattisia korjauksia on otettu huomioon.

$$y_{korj} = K_1 \cdot K_2 \cdot \ldots \cdot K_m \cdot y \tag{55}$$

Korjauskertoimien arvot eivät ole täydellisen varmoja vakioita. Kuhunkin liittyy oma epävarmuutensa, joka täydellisyyden nimessä pitää ottaa huomioon lopullisen mittaustuloksen yhdistetyssä epävarmuudessa. Tulon muotoisesta lausekkeesta johtuen yhdistäminen tapahtuu suhdeasteikossa.

Seuraavassa nimitetään "täydellisesti" korjatuksi kaaviota, joka sisältää korjauskertoimet:

todellinen laimennuskerroin F',
varmistuvuuskerroin p,
henkilökohtainen saaliskerroin K_H,
näytteen stabiilisuuskerroin K_S,
kasvualustan saaliskerroin K_A,
materiaali/kohde kerroin K_M,
peittokorjauskerroin K_L.

Täydellisesti korjatun mittaustuloksen arvo lasketaan kaavasta

$$Y = K_L \cdot K_M \cdot K_A \cdot K_S \cdot K_H \cdot p \cdot F' \cdot x \tag{56}$$

Sen suhteellinen mittausepävarmuus on tulon muotoisen laskukaavan ansiosta ja henkilökohtaisella lukemaepävarmuudella täydennettynä arvioitavissa seuraavasti :

$$u_Y = \sqrt{u_{KL}^2 + u_{K_M}^2 + u_{K_A}^2 + u_{K_S}^2 + u_{K_H}^2 + u_p^2 + u_{F'}^2 + u_x^2 + u_z^2} \qquad (57)$$

Mikä tahansa kertoimista voidaan jättää vaille vaikutusta valitsemalla sen arvoksi ykkönen ja sen epävarmuuden arvoksi nolla.

8.2 Todellinen laimennuskerroin F'

Käsiteltiin tyhjentävästi kohdassa (5.1.3).

8.3 Varmistuvuus p

Käsitelty kohdassa (5.2).

8.4 Henkilökohtainen saaliskerroin, K_H

Jokaisella pesäkkeiden lukijalla on henkilökohtainen tyyli, joka usein ilmenee järjestelmällisinä eroina eri henkilöiden tuloksissa. Erot eivät ole suuria helpoissa tilanteissa, kuten puhdasviljelmien pesäkkeiden laskuissa, mutta saattavat hankalissa luonnonnäytteissä ja erityisesti selektiivisten menetelmien yhteydessä olla hyvinkin huomattavia. Tämä on helppo osoittaa luettamalla samoja maljoja kahdella tai useammalla henkilöllä. Tällaisista kokeista saadaan lasketuksi esimerkiksi laboratorion henkilökunnan laskemistulosten hajonta-arvoja (ks. Esim. 9.2 ja 9.3).

Henkilökohtaisten saaliskertoimien määrittämisen kannalta ongelmallista on se, että oikea tulos ei ole tiedossa, joten taattua referenssipistettä ei ole.

8.4.1 Vertailuna erehtymätön ekspertti

Yksi mahdollisista ratkaisuista on valita joku henkilö ekspertiksi, jonka tulos sovitaan 'oikeaksi'. Lukuisissa näytteissä havainnoidaan ekspertin (E) ja mittaajan (X) samasta maljasta laskema pesäkemäärä. Mittaajan korjauskertoimeksi merkitään ekspertin ja mittaajan ilmoittamien pesäkelukumäärien summien suhdeluku

$$K_H = \frac{\Sigma c_E}{\Sigma c_X} \qquad (58)$$

Mittausepävarmuuden arvioimiseksi on laskettava kaikista tulospareista ekspertin ja mittaajan tuloksen suhteellinen erotus

$$d = \frac{c_E - c_X}{c_E} \qquad (59)$$

$c_E =$ ekspertin laskema pesäkemäärä,
$c_X =$ mittaajan laskema pesäkemäärä.

d-arvojen keskiarvon keskihajonta on summittainen estimaatti kertoimen K_H suhteelliselle epävarmuudelle u_{KH}.

Kun korjauskerroin tulee ykköstä pienemmäksi, niin kysymyksessä olevan henkilön laskemat tulokset kerrotaan ykköstä pienemmällä luvulla. Omituiselta vaikuttava tulos johtuu siitä, että laboratorio on päättänyt korjata kaikki ilmoittamansa tulokset erään valitun henkilön lukutavan mukaisiksi ja siten yhtenäisemmiksi.

Tämän vaihtoehdon erikoispiirre on, että ekspertti on 'erehtymätön'. Hänen kohdallaan henkilökohtainen saaliskerroin on 1 ja sen epävarmuus on 0.

8.4.2 Vertailuna keskiarvotulos

Toinen ratkaisu on sopia 'oikeiksi' arvoiksi kaikkien osallistujien maljakohtaiset keskiarvotulokset. Kertoimen K_H ja sen epävarmuuden laskeminen noudattaa kohdan (8.2.1) esitystä sillä erotuksella, että ekspertin tulosten (c_E) tilalla käytetään kaikkien mittaajien keskiarvotuloksia.

Tässä ratkaisussa laboratorio korjaa kaikki mittaustulokset laboratorion keskimääräisen laskutyylin mukaisiksi, vaikka kukaan yksittäinen työntekijä ei ehkä olekaan keskimääräinen. Jokaisen työntekijän saaliskertoimen epävarmuus on nollasta poikkeava.

Henkilökohtaisen kertoimen K_H suhteellinen epävarmuus saadaan suoraan mittaussarjan d-arvojen keskiarvon keskihajonnasta

$$u_{K_H} = \frac{s_d}{\sqrt{n}} \qquad (60)$$

8.5 Laboratorion yhteinen lukemaepävarmuus

Laboratorio ei välttämättä halua kohdistaa huomiota yksittäisten työntekijöiden mahdollisesti erilaiseen systemaattiseen lukutapaan, vaikka aina lienee tiedossa kuka mistäkin mittaustuloksesta on vastuussa. Korjauskertoimen arvoksi valitaan siinä tapauksessa henkilöstä riippumatta $K_H = 1$.

Henkilöstä riippumaton laboratorion yhteinen lukemisepävarmuuden arvo on saatavissa kokeista, missä kaikki työntekijät laskevat samojen maljojen pesäkkeet. Jokaisen maljan kohdalla lasketaan erikseen joko suhteellinen keskihajonta tai keskihajonta ln-asteikossa ja niiden neliökeskiarvo lasketaan (helpoimmin aineiston yksisuuntaisesta varianssianalyysistä ln-muunnoksen jälkeen. ks. esim. 9.4).

8.6 Näytteen säilytyksestä johtuva pitoisuusmuutos. Stabiilisuuskerroin K_S ja sen epävarmuus.

Näytteiden mikrobipitoisuus voi eri syistä muuttua näytteenoton ja analysoinnin välillä. Useimmiten ei voida esittää edes arvausta kumpaan suuntaan pitoisuus muuttuisi mikäli se muuttuu ollenkaan. Pitoisuuden keskimääräiselle korjauskertoimelle ei silloin voi antaa muuta arvoa kuin $K_S = 1$, mikä merkitsee, että pitoisuus uskotaan keskimäärin stabiiliksi.

Toisinaan taas voidaan olettaa, että pitoisuus voi ainoastaan alentua, mikäli se muuttuu. Mittaustulos korjattaisiin "oikeaksi" kertomalla ykköstä suuremmalla luvulla aleneman korjaamiseksi. On kuitenkin hyvin vaikea todistella jonkin ykkösestä poikkeavan korjauskertoimen arvoa, koska se perustuu puhtaaseen arvaukseen.

Jos muutos on edes teoriassa mahdollinen, se aiheuttaa epävarmuutta mittaustulokseen.

Kertoimen epävarmuuden arvioimiseen ei ole empiiristä tietoa tieteellisessä kirjallisuudessa, eikä laboratorioilla itsellään voi odottaa olevan sopivia havaintoaineistoja. Tällaisessa tapauksessa parhaaksi mahdollisuudeksi jää tasaisen tai kolmiojakauman soveltaminen (2.3.1, 2.3.2).

Mikäli pitoisuus voi ainoastaan laskea, korjauskerroin määräytyy mahdolliseksi oletetun vaihteluvälin puolivälin perusteella. (Esimerkki 10.5.)

8.7 Kasvualustan saaliskerroin, K_A

Jokaisen alustaerän toimivuus on syytä testata osana laatujärjestelmää määrittämällä kvantitatiivinen saaliskerroin, eräänlainen tehokerroin, viljelemällä tunnettuja vertailunäytteitä. Täydellistä jäljitettävyyttä tosiarvoon ei kuitenkaan ole olemassa. Vertailuna voidaan ainoastaan käyttää sovittua arvoa, joka perustuu aikaisempiin kokeisiin.

Bakteriofagimäärityksiin liittyvä 'efficiency of plating' (EOP) on myöskin tämän tyyppinen kerroin.

Saaliskertoimen epävarmuus riippuu vertailuarvon ja kokeessa määritetyn arvon suhteellisista epävarmuuksista osamäärän epävarmuussäännön perusteella. (Esimerkki 10.5.)

8.7.1 Ulkoiset vertailunäytteet

Kaupallisten vertailunäytteiden sertifiointiraportti antaa kokeellisesti todetun keskiarvon ja keskihajonnan, luultavimmin $\log_{10}$-yksiköissä tai luottamusvälinä. Tarvittaessa tehdään asteikkomuunnoksia 4.2:n mukaan ja/tai sovelletaan (5.3.3) mukaisia periaatteita.

Jos vertailuarvo (välimatka-asteikossa) on x_R ja tutkittavalla alustaerällä saadaan arvoksi x_A, niin suhdeluku $K_A = x_R/x_A$ antaa korjauskertoimen, jolla kaikki mittaustulokset on periaatteessa korjattava kyseistä alustaerää käytettäessä.

Korjauskertoimen epävarmuus voidaan johtaa vertailuarvon ja mittaustuloksen suhteellisista epävarmuuksista edellä (4.1) käsitellyillä periaatteilla.

$$u_{x_R/x_A} = \sqrt{u_{x_R}^2 + \frac{1}{C_A}} \tag{61}$$

C_A = pesäkemäärä (kpl), josta testiarvo x_A on laskettu,

u_{x_R} = vertailunäytteen suhteellinen keskihajonta.

8.7.2 Valikoimaton/valikoiva-kerroin

Toisen tyyppinen korjauskerroin selektiivisille alustoille saadaan viljelemällä samaa kohdeorganismin koeviljelmää rinnan valikoimattomalle ja tutkittavalle selektiiviselle alustaerälle. Tällöin 'totuutena' pidetään valikoimattoman alustan pesäkesaalista. Selektiivialustoilla saadaan tyypillisesti vain 70-80 % saaliita, joten kerroin K_A>1. Miten edustava tällainen pakosta puhdasviljelmien avulla määritetty kerroin on todellisia luonnon näytteitä testattaessa jää tuntemattomaksi.

Vastaava tapaus on näytteen viljely rinnan samalla kasvualustalla kalvosuodattimen kanssa ja ilman sitä. Tällöin kalvosuodattimen aiheuttama estovaikutus voidaan korjata.

Kertoimen suhteellinen mittausepävarmuus, mikäli testatut tilavuudet samaa koesuspensiota ovat yhtäsuuria kummallakin menetelmällä, on

$$u_{x_R/x_A} = \sqrt{\frac{1}{C_R} + \frac{1}{C_A}} \tag{62}$$

C_R ja C_A ovat pesäkelukumäärät jotka havaittiin valikoimattomalla ja valikoivalla ravintoalustalla.

8.8 Kohteen (materiaalin) epätasaisuus. Korjauskerroin K_M

On mahdollista, että mm. materiaalin kiinteistä partikkeleista tai kemiallisista yhdisteistä johtuu systemaattinen virhe (tavallisesti alenema) tuloksiin. Korjauskertoimella K_M olisi tällöin ykkösestä poikkeava arvo. On kuitenkin vaikea luotettavasti määrittää ja perustella ykkösestä poikkeavaa arvoa, koska mikrobipitoisuuden tosiarvoa ei voi tietää.

Materiaalin fysikaalinen rakenne tai mikrobihiukkasten esiintyminen "pilvinä" nestemateriaalissa aiheuttavat hiukkastilastollisen hajonnan ylittävää vaihtelua rinnakkaismäärityksiin. Näistä syistä johtuva lisähajonta voidaan tulkita materiaalin hajontakertoimeksi u_M.

Puhtaan materiaalivaikutuksen kokeellinen määrittäminen edellyttää niin moniportaisia hierarkkisia varianssianalyysimalleja, että yhtään tällaista tutkimusta ei liene julkaistu mikrobiologiassa eikä koottuja taulukoita materiaalien epähomogeenisuudesta ole tiedossa.

Kaikesta päättäen hajonta-arvot voivat olla erittäin korkeita esimerkiksi kiinteissä elintarvike- ja ympäristönäytteissä. On suuri puute, että tätä ei pystytä aina ottamaan huomioon mittaustulosten epävarmuutta ilmoitettaessa.

Sensijaan epävarmuusestimaatteja, missä materiaalihajontaan liittyy lukema- ja pipetointiepävarmuus, saadaan ottamalla kohteesta tai materiaalista satunnaisia rinnakkaisnäytteitä. Tällaisista havaintoaineistoista saadaan käyttökelpoista tietoa materiaalin/kohteen epähomogeenisuudesta. Mittausolosuhteet ja työn tekijät voivat olla toiset kuin yleensä mutta muiden mahdollisuuksien puuttuessa on näitä tilanteita hyödynnettävä.

Jonkinlaisia aavistuksia voi ehkä saada myös menetelmien yhteisvertailukokeista (collaborative method performance test), mutta yleensä niitä ei ole suunniteltu eikä niiden tuloksia ole analysoitu tätä silmällä pitäen. Suoraan eivät toistettavuus- ja uusittavuusparametrien arvot tarkoitukseen sovellu. Jos kokeiden perushavainnot saadaan käytettäviksi, niistä voidaan laskea materiaalihajonnan arvoja.

Kohteessa pitkin vuotta tehtyjen yksittäishavaintojen hajonta ei kelpaa kohteen mittaustulosten epävarmuusarvojen pohjaksi. Se näet sisältää myöskin analyytin todellisen pitoisuusvaihtelun, joka ei puolestaan kuulu mittausepävarmuuteen.

Liitteessä B on eräitä jokikohteiden otosvaihtelun arvioita, mukaanlukien pipetointi- ja lukemaepävarmuudet.

8.9 Peittokorjauskerroin K_L

Maljalta havaittu pesäkkeiden lukumäärä on enintään yhtä suuri kuin ns. pesäkkeitä muodostavien yksiköiden lukumäärä (CFU), jonka viljelty koeannos sisälsi. Puhtaasti geometrisista yhteensattumista johtuen havaittu pesäkemäärä (C) on yleensä pienempi kuin CFU. Pesäkkeitä peittyy ja sekoittuu toisiin samanlaisiin pesäkkeisiin. Tämä ilmiö on toinen kuin runsaasta vieraiden pesäkkeiden 'taustakasvusta' johtuva tuloksen alenema kohdepesäkkeiden muuttuessa tunnistamattomiksi valenegatiivisiksi tai peittyessä liikakasvuun.

Ulkonäöltään samanlaisten pesäkkeiden geometrisesta peitosta johtuva alenema on suhteessa alustavien positiivisten peitto-osuuteen eli siihen, miten iso osa käytettävissä olevasta kasvualasta on kohdepesäkkeiden peitossa. Alla oleva taulukko, joka on saatu laskemalla aikaisemmin esitetyistä tuloksista (Niemelä 1965) pätee kalvosuodatus- ja muille pintaviljelymenetelmille. Agarin sisään maljattaessa peittoilmiö vaikuttaa vain marginaalisesti tulokseen.

Peittokorjauskertoimen arvo on $K_L = CFU/C$. Aina, kun koeannoksessa on enemmän kuin yksi CFU, kertoimen arvo tulee teoriassa ykköstä suuremmaksi.

Taulukko. *Peittokorjauskertoimen K_L riippuvuus tyypillisten pesäkkeiden peittämästä kasvualustan pinnan osuudesta (peitto-osuudesta).*

r	***K***$_{\mathrm{L}}$
5 %	1,02
10 %	1,04
15 %	1,06
20 %	1,08
25 %	1,11
30 %	1,14
35 %	1,18
40 %	1,24

r = peitto-osuus

Useimpien henkilöiden mielestä malja on liian tiheä laskettavaksi jo peitto-osuudessa 30 %.

Korjauskertoimen keskihajonta samojen havaintojen perusteella on luokkaa $u_{KL} = 0{,}05$.

8.10 Lukemakorjauskerroin

Lukemakorjauskertoimen arvo on aina $K_z = 1$. Sen epävarmuus, henkilö- tai laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus u_z, määritetään samoja maljoja toistuvasti lukemalla, kuten (5.3.1) huomautuksessa ja esimerkeissä 9.3 ja 9.4 on esitetty.

9 ESIMERKKEJÄ. YKSITTÄISTEN EPÄVARMUUSKOMPONENTTIEN ARVOT.

9.1 Yhden pesäkelukumäärän hiukkastilastollinen epävarmuus

Maljalta on laskettu c = 36 pesäkettä.
Kaavan (52) mukaisesti sen suhteellinen hiukkastilastollinen epävarmuus on

$$u_c = \sqrt{\frac{1}{36}} = 0{,}167 \tag{63}$$

9.2 Maljasarjan pesäkelukusumman hiukkastilastollinen epävarmuus

Kahdesta perättäisestä laimennuksesta valmistetuissa rinnakkaismaljoissa on havaittu pesäkemäärät:

Laim.	**Pesäkeluvut**		**yht.**
10^{-4}	185	156	341
10^{-5}	17	22	39
		Summa:	C = 380

Suhteellinen hiukkastilastollinen epävarmuus, kaava (53)

$$u_C = \sqrt{\frac{1}{380}} = 0{,}051 \tag{64}$$

9.3 Henkilökohtainen lukemaepävarmuus

Laborantti on kirjannut havaintoja erilaisten maljojen pesäkelukumäärän laskemisesta kahdesti peräkkäin (tai lyhyen ajan kuluessa). Maljat on valittu satunnaisesti rutiinin yhteydessä. Tuloksia (esimerkin vuoksi vain pieni osa):

Malja no	c_1	c_2	ln c_1	ln c_2	$(\ln c_1 - \ln c_2)^2$
1	343	337	5,84	5,82	0,0004
2	40	39	3,69	3,66	0,0009
3	57	62	4,04	4,13	0,0081
4	399	397	5,99	5,98	0,0001
5	112	130	4,72	4,87	0,0225
6	349	325	5,86	5,78	0,0064
7	85	84	4,44	4,43	0,0001
8	129	122	4,86	4,80	0,0036
9	16	17	2,77	2,83	0,0036
10	27	27	3,30	3,30	0,0000
					0,0457
				Keskiarvo:	0,00457

Ehkä yksinkertaisinta on laskea havaintojen luonnollisten logaritmiarvojen erotuksen neliökeskiarvo, jakaa se kahdella ja ottaa tuloksesta neliöjuuri. Se antaa etsityn keskimääräisen lukemaepävarmuuden suhteellisen arvon

$$u_z = \sqrt{\frac{0{,}0457}{2x10}} = 0{,}0478 \qquad (65)$$

Sama tulos saadaan myös ln-arvojen yksisuuntaisen varianssianalyysin avulla maljojen sisäisen keskineliön arvosta ottamalla siitä neliöjuuri.

Laskutapa, joka ei edellytä logaritmeja (ja on 'oikeampi') lähtee tulosparien suhteellisista variansseista (suhteellisten keskihajontojen neliöistä). Henkilökohtaisen lukemaepävarmuuden kaava tiiviissä muodossa on silloin

$$u_z^2 = \frac{2}{n}\sum_{1}^{n}\left(\frac{c_1 - c_2}{c_1 + c_2}\right)^2 \qquad (66)$$

Edellä esitettyihin tuloksiin sovellettuna lasku etenee esimerkiksi seuraavasti

Malja	c_1	c_2	$(c_1 - c_2)$	$(c_1 + c_2)$	$[(c_1 - c_2)/(c_1 + c_2)]^2$
1	343	337	-6	680	0,000078
2	40	39	1	79	0,000160
3	57	62	-5	119	0,001765
4	399	397	2	796	0,000006
5	112	130	-18	242	0,005532
6	349	325	24	674	0,001268
7	85	84	1	169	0,000035
8	129	122	7	251	0,000778
9	16	17	-1	33	0,000918
10	27	27	0	54	0,000000
				Yht.	0,010540

Viimeisen sarakkeen summa kerrottuna $2/n = 0{,}2$:lla on suhteellisen lukemaepävarmuuden neliö: $u^2 = 0{,}2 \times 0{,}010540 = 0{,}002108$. Sen neliöjuuri on etsitty henkilökohtainen lukemaepävarmuuden arvo: $u_z = 0{,}0459$, tässä tapauksessa lievästi pienempi kuin logaritmeja käyttäen laskettu.

9.4 Laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus

Laboratorion kaikki neljä päivittäiseen rutiiniin osallistuvaa henkilöä (A, B, C, D) laski toistensa kanssa neuvottelematta samojen kahdeksan satunnaisesti valitun maljan pesäkelukumäärät allaolevin tuloksin:

Malja	**A**	**B**	**C**	**D**	**ka**	**s**	u_z
1	21	23	24	26	23,5	2,08	0,089
2	38	38	42	40	39,5	1,91	0,048
3	27	29	34	30	30,0	2,94	0,098
4	16	22	19	21	19,5	2,65	0,136
5	33	25	33	38	32,25	5,38	0,167
6	67	65	74	66	68,0	4,08	0,060
7	160	166	176	174	169,0	7,39	0,044
8	89	81	94	92	89,0	5,72	0,064

ka = aritmeettinen keskiarvo
s = otoskeskihajonta
u_z = suhteellinen keskihajonta (s/ka)

Neliöityjen u_z-arvojen summa = 0,0758, ja keskiarvo 0,0095.
Sen neliöjuuri = 0,0974 on laboratorion keskimääräinen laskemisepävarmuus tätä menetelmää (SPC) käytettäessä ja kysymyksessä olevaa näytetyyppiä (raakamaito) tutkittaessa. Voidaan pyöristää $u_z = 0{,}10$.

9.5 Henkilökohtainen saaliskerroin ja sen epävarmuus

9.5.1 Vertailuna "erehtymätön" ekspertti

Valitaan esimerkin 9.4 taulukosta asiantuntijaksi henkilö A ja tutkittavaksi henkilöksi C. Lasketaan kunkin maljan kohdalla suhteellinen erotus d = 2(A - C)/A

Malja	A	C	A-C	d	
1	21	24	-3	-0,143	
2	38	42	-4	-0,105	
3	27	34	-7	-0,259	
4	16	19	-3	-0,188	
5	33	33	0	0,000	
6	67	74	-7	-0,104	
7	160	176	-16	-0,100	
8	89	94	-5	-0,056	
Yht.	451	496	ka	-0,119	s_d = 0,079

Pesäkelukujen summista laskien C:n henkilökohtaiseksi saaliin korjauskertoimeksi tulee K_H = 451/496 = 0,91. Hänen tuloksensa on kerrottava 0,91:llä, jotta ne korjautuisivat keskimäärin 'erehtymättömän ekspertin' lukutavan mukaisiksi.

Kertoimen suhteellista epävarmuutta ei voida laskea pesäkesummista. Sille saadaan arvio laskemalla *d*-arvojen keskiarvon keskihajonta 0,079/□8 = 0,0279 ja jakamalla se korjauskertoimen arvolla u_{KH} = 0,0279/0,91 = 0,037.

9.5.2 Vertailuna keskiarvotulos

Esimerkistä 9.4 poimitaan esimerkin vuoksi mittaaja C:n tulos ja kaikkien henkilöiden keskiarvot eri maljojen osalta. Lasketaan suhteelliset erotukset d = (ka - C)/ka

Malja	C	ka	d	
1	24	23,5	-0,021	
2	42	39,5	-0,063	
3	34	30,0	-0,133	
4	19	19,5	0,026	
5	33	32,25	-0,023	
6	74	68,0	-0,088	
7	176	169,0	-0,041	
8	94	89,0	-0,056	
Keskiarvo	62,0	58,8	-0,050	s_d = 0,0478

Korjauskertoimen arvo K_H = 58,8/62,0 = 0,95,
d-arvojen keskiarvon keskihajonta on 0,0478/□8 = 0,0169,
Korjauskertoimen suhteellinen epävarmuus on näinollen u_{KH} = 0,0169/0,95 = 0,018.

9.6 Siirrostilavuuksien summan epävarmuus

9.6.1 Ilman lisälaimennusta

Oletetaan neljästä maljasta koostuva detektioinstrumentti. Kahteen maljaan on siirrostettu 1 ml ja kahteen 0,1 ml samasta päätesuspensiosta.

Oletetaan kokemuksen perusteella tunnetuksi, että 1 ml:n pipetointien suhteellinen standardiepävarmuus on u = 2 % ja 0,1 ml:n mittausten suhteellinen epävarmuus on u = 8 %.

Painotetun keskiarvon epävarmuuden arviointia varten tarvitaan kokonaistilavuuden V = 2 x 1 ml + 2 x 0,1 ml = 2,2 ml suhteellinen kokonaisepävarmuus u_V.

Koska kokonaistilavuus saadaan summana, on ensiksi muunnettava epävarmuusluvut millilitroiksi. 2 % 1 ml:sta on s = 0,02 ml ja 8 % 0,1 ml:sta on s = 0,008 ml. Pesäkelukujen summan V = 1 + 1 + 0,1 + 0,1 = 2,2 ml standardiepävarmuudeksi saadaan

$$s_v = \sqrt{0{,}02^2 + 0{,}02^2 + 0{,}008^2 + 0{,}008^2} = \sqrt{0{,}000928} = 0{,}0305\ ml \qquad (67)$$

Kokonaistilavuuden suhteellinen epävarmuus on näinmuodoin u_V = 0,0305 ml/2,2 ml = 0,014 (1,4 %), eli pienempi kuin minkään osatilavuuden.

9.6.2 Lisälaimennus mukana

Oletetaan neljästä maljasta koostuva detektioinstrumentti, joka on saatu siirrostamalla kahdelle maljalle 1 ml päätesuspensiota ja kahdelle maljalle 1 ml sen laimennosta 1:10 (1 ml + 9 ml).

Oletetaan vanhan tiedon perusteella, että 1 ml:n pipetoinnin suhteellinen standardiepävarmuus on 2 % ja 9 ml:n laimennusvesiputken tilavuusepävarmuus on 1 %.

Käytännössä lisälaimennuksen jälkeinen epävarmuuden osa on kutakuinkin merkityksetön, ellei laimennuskerroin f ole tuntuvasti pienempi kuin 10 tai laimennusvesiputkien tilavuusepävarmuus useita prosenttiyksiköitä.

Kun jätetään huomiotta se epävarmuuden lisä, joka jälkimmäisiin koeannoksiin sisältyy lisälaimennusten takia, voidaan yksinkertaistaen olettaa, että detektioinstrumenttiin on siirrostettu 2 · 1 ml + 2 · 0,1 ml = 2,2 ml päätesuspensiota. Erona kohtaan 9.6.1 verrattuna on se, että suhteellinen pipetointiepävarmuus on kaikissa neljässä tapauksessa 2 %. Näin ollen 1 ml:n standardiepävarmuus s = 0,02 ml ja ”0,1” ml:n s = 0,002 ml.

Kokonaistilavuuden epävarmuus saadaan laskemalla

$$s_V = \sqrt{2 \cdot 0{,}02^2 + 2 \cdot 0{,}002^2} = 0{,}0284\ ml \tag{68}$$

Kokonaistilavuuteen suhteutettuna epävarmuus on u_V = 0,0284 ml/2,2 ml = 0,013 (1,3 %).

HUOMAUTUS 1. Lisälaimennuksen huomiotta jättämisestä aiheutuva epätarkkuus on niin pieni, että se olisi luultavasti havaittavissa enintään neljännessä desimaalissa.

HUOMAUTUS 2. Kovin merkittävää epätarkkuutta ei olisi aiheutunut siitäkään, että kokonaistilavuuden epävarmuuden arvon olisi oletettu määräytyvän pelkästään suoraan päätesuspensiosta mitattujen 1 ml:n tilavuuksien epävarmuuksista.

$$s_V = \sqrt{2 \cdot 0{,}02^2} = 0{,}0283\ \ ml \tag{69}$$

Suhteellinen arvo on u_V= 0,0283 ml/2,2 ml = 0,013 (1,3 %).

10 ESIMERKKEJÄ. MITTAUSTULOKSEN KOKONAISEPÄVARMUUDEN LASKEMINEN.

10.1 Yksi malja, laimentamaton näyte

Laboratorio tutkii virtsa-, maito- tms. näytteen yhdellä maljalla, joka siirrostetaan kalibroidulla 1 µl silmukalla.

Omilla mittauksillaan laboratorio on todennut, että keskimääräinen siirroksen tilavuus ei poikkea oletetusta nimellistilavuudesta (v = 1 □l) ja sen volumetrinen mittausepävarmuus (suhteellinen keskihajonta) on 12 % (desimaali-ilmaisuna $u_v = 0{,}12$).

Oletetaan tapaus, missä maljan pesäkemääräksi on laskettu $c = 75$.

Mittaustuloksen laskukaava on $y = c/v$. Mikrobipitoisuuden laskemista varten siirrostilavuus ilmaistaan millilitroina $v = 0{,}001$ ml, joten $y = 75/0{,}001$ ml = 75000 ml^{-1}.

Yhdistetty epävarmuus suhteellisena keskihajontana ilmaisten on (3.2.1) mukaan:

$$u_y = \sqrt{u_v^2 + u_c^2} = \sqrt{0{,}12^2 + \frac{1}{75}} = \sqrt{0{,}0144 + 0{,}0277} = 0{,}17 \qquad (70)$$

Mittaustuloksen yksiköiksi muutettuna $s_y = 75000 \cdot 0{,}17 = 12750$ ml^{-1}

Mittaustuloksen ilmoittaminen:
y = 75000 ml^{-1} yhdistetyllä standardiepävarmuudella s_y = 13000 ml^{-1} arvioituna pesäkeluvun 75 hiukkastilastollisen hajonnan (Poisson) ja siirroksen volumetrisen epävarmuuden (12 %) perusteella. (Ilmoituksesta huomataan, että mm. lukemaepävarmuuden osuutta ei ole huomioitu.)

10.2 Yksi malja, laimennettu näyte

Oletetaan laimennettu näyte, jonka laskettavaksi valitun 10^{-4} laimennuksen ainoassa maljassa on havaittu pesäkemäärä $c = 125$.

Laimennussarja on valmistettu 1:10 portain siten, että jokainen vaihe on 0,5 ml + 4,5 ml. On viljelty yksi malja laimennusta kohti siirrostilavuutena 1 ml. Laboratoriolla ei ole omaa kokeellista tietoa tilavuusmittaustensa keskiarvoista ja hajonnoista. 1 ml ja 0,5 ml siirrokset on mitattu lasisilla mittapipeteillä ja 4,5 ml tilavuudet mäntäannostelijalla nesteen steriloinnin jälkeen.

Täsmällisen tiedon puuttuessa oletetaan, että tilavuusmittauksissa ei ole systemaattisia virheitä vaan keskimääräiset tilavuudet v = 1 ml, a = 0,5 ml ja b = 4,5 ml ovat nimellistilavuuden mukaiset. Laimennuskertoimena käytetään kuvitteellista kerrointa $F = 10^4$. Epävarmuustiedot etsitään muista lähteistä.

Liite A:n taulukosta löytyy tieto 4,5 ml:n annostelijan tilavuuden (b) keskihajonnasta (s_b = 0,024 ml).
1 ml:n lasisen mittapipetin tilavuuden (v) keskihajonnaksi on samassa taulukossa ilmoitettu s_v = 0,025 ml.
0,5 ml pipetoinnille (a) ei tietolähteissä ole hajonta-arvoa. 0,5 ml tilavuudet oli mitattu samoilla 1 ml mittapipeteillä kuin 1 ml tilavuudet. Voidaan olettaa, että merkkiin täyttämisen ja tyhjennyksen hajonta millilitra-asteikossa olisi sama riippumatta pipetoitavasta tilavuudesta, joten 0,5 ml hajonta on sama kuin 1 ml:n.

Yhteenveto volumetrisista tiedoista

a = 0,5 ml, Δa = 0,0 ml, s_a = 0,025 ml, u_a = 0,05 (5 %)
b = 4,5 ml, Δb = 0,0 ml, s_b = 0,024 ml, u_b = 0,005 (0,5 %)
v = 1,0 ml, Δv = 0,0 ml, s_v = 0,025 ml, u_v = 0,025 (2,5 %)

Yhden laimennusvaiheen laimennuskertoimen f suhteellinen keskihajonta (5.1.2) mukaan laskien:

$$u_f^2 = \frac{1}{(4{,}5+0{,}5)^2}\left[0{,}024^2 + \left(\frac{4{,}5}{0{,}5}\right)^2 \cdot 0{,}025^2\right] =$$

$$\frac{1}{25}\left(0{,}024^2 + 81\cdot 0{,}025^2\right) = 0{,}0020 \Rightarrow u_f = 0{,}045 \qquad (71)$$

(Tulos on tyypillinen 1:10 laimennuksille; vaiheen laimennuskertoimen epävarmuus on käytännössä yhtä suuri kuin siirrospipetoinnin epävarmuus.)

Laimennuksen kokonaiskertoimen F epävarmuus on (5.1.2) mukaan

$$u_F = \sqrt{k\,u_f^2} = \sqrt{4\cdot 0{,}045^2} = 0{,}09 \qquad (72)$$

Mittaustuloksen suhteellinen epävarmuus saadaan (5.3.1) ja (5.1) mukaan kaavasta

$$u_y = \sqrt{u_F^2 + u_v^2 + \frac{1}{c}} = \sqrt{0{,}09^2 + 0{,}025^2 + \frac{1}{125}} = \sqrt{0{,}0167} = 0{,}1293 \qquad (73)$$

Itse mittaustulos $y = 125 \cdot 10^4 = 1{,}25 \cdot 10^6$ ml^{-1}. Sen epävarmuus

mittaustuloksen yksiköissä on $s_y = (0{,}1293 \cdot 1{,}25)10^6$ ml^{-1} = $0{,}16 \cdot 10^6$ ml^{-1}

10.3 Monta maljaa, laimennettu näyte

Oletetaan havaintoaineisto, missä näytteen laimennuksista 10^{-5} ja 10^{-6} on viljelty kolme rinnakkaismaljaa alla olevin tuloksin.
Laimennussarja on valmistettu perättäisinä 1:10 laimennuksina (1 ml + 9 ml). Päätesuspensioksi määräytyy laimennos 10^{-5}.

Laimennos	**v_i a)**	**c_i b)**	**Summa**
10^{-5}	1	122	
	1	74	
	1	92	288
10^{-6}	0,1	12	
	0,1	15	
	0,1	10	37
yht.	3,3		325

a) Siirrostilavuus ilmaistuna päätesuspension (10^{-5}) tilavuutena
b) Maljan pesäkeluku

Päätesuspension kuvitteellinen laimennuskerroin on $F = 10^5$, siirrostettu (kuvitteellinen) kokonaistilavuus $V = 3{,}3$ ml ja pesäkkeiden kokonaismäärä on $C = 325$. Mittaustulos painotetun keskiarvon periaatteella laskien on $y = 10^5 \times (325/3{,}3) = 98 \times 10^5$ ml^{-1}

Mittaustuloksen yhdistetyn suhteellisen epävarmuuden laskemiseksi on arvioitava kolme komponenttia:

1. pesäkesumman C hiukkastilastollinen epävarmuus u_C
2. siirrostilavuuksien summan V epävarmuus u_V
3. laimennuskertoimen F epävarmuus u_F

(6.2):n mukaan

$$u_C = \sqrt{\frac{1}{C}} = \sqrt{\frac{1}{325}} = 0{,}0555 \tag{74}$$

Kahden tason välisen laimennuskertoimen ollessa $f = 10$, kokonaistilavuuden $V = 1 + 1 + 1 + 0{,}1 + 0{,}1 + 0{,}1 = 3{,}3$ ml keskihajonta määräytyy käytännöllisesti katsoen yksin 1 ml:n tilavuuksien epävarmuuksista. 0,1 ml:n tilavuuksien epävarmuus ei vaikuta havaittavasti kokonaisuuteen.
Omien havaintojen puuttuessa käytetään Liite A:n taulukon antamaa 1 ml:n lasipipetin keskihajontaa $s_a = 0{,}025$ ml.
Yksinkertaistaen summan tilavuuskeskihajonta on siis

$$s_V = \sqrt{3 \cdot 0{,}25^2} = 0{,}0433\ ml \tag{75}$$

Suhteellinen arvo on $u_V = 0{,}0433$ ml/3,3 ml = 0,013

Laimennuskertoimen epävarmuuden arvioimiseksi lasketaan ensin yhden laimennusvaiheen kertoimen f suhteellinen epävarmuus (5.1.2) mukaan. Tarvittava 9 ml:n tilavuuden keskihajonta-arvo löytyy Liite A:n taulukosta s_b = 0,024 ml ja s_a = 0,025. Kohdan 5.2.1:n mukaan laskien saadaan

$$u_f = \frac{1}{9+1}\sqrt{0{,}024^2 + 9^2 \cdot 0{,}025^2} = 0{,}0226 \qquad (76)$$

Kokonaiskertoimen $F = f^5$ suhteellisen epävarmuuden arvo on

$$u_F = \sqrt{5 \cdot 0{,}226^2} = 0{,}0506 \qquad (77)$$

Mittaustuloksen y suhteellinen epävarmuus on komponenttien suhteellisten epävarmuuksien vektorisumma

$$u_y = \sqrt{u_C^2 + u_V^2 + u_F^2} = \sqrt{0{,}0555^2 + 0{,}013^2 + 0{,}0506^2} = 0{,}0762 = 0{,}076 \qquad (78)$$

10.4 Monta maljaa, oikotie epävarmuuteen

Oletetaan sama havaintoaineisto kuin esimerkissä 10.3 ja arvioidaan sen epävarmuus (6) mukaan

Laimennos	v_i [a]	c_i [b]	Summa	$c_i\ln(c_i/v_i)$
10^{-5}	1	122		586,0906
	1	74 *)		318,5008
	1	92	288	416,0045
10^{-6}	0,1	12		57,4499
	0,1	15		75,1595
	0,1	10	37	46,0517
yht.	3,3		325	1499,2570

a) Siirrostilavuus ilmaistuna päätesuspension (10^{-5}) tilavuutena.
b) Maljan pesäkeluku.
*) Tuloksen lukija piti tulosta mahdollisesti epäilyttävänä pesäkkeiden liiallisen yhteenkasvun takia.

On mahdollista ja luvallista hylätä epäilyttävä mittausarvo (74) suoralta kädeltä. Tarkastetaan kuitenkin vaikuttaako sen säilyttäminen tai hylkääminen lopputuloksiin.

Mittausepävarmuuden arvioimiseksi lasketaan ensin instrumentin uskottavuusosamääräindeksin arvo:

$$G^2_5 = 2[586{,}0906 + ... + 46{,}0517 - 325\ln(325/3{,}3)] =$$

$$= 2(1499{,}2570 - 1491{,}7184) = 2\cdot 7{,}5386 = 15{,}0772 \qquad (79)$$

Vapausasteillaan jaettu indeksin arvo $G^2/_{(n-1)} = 15{,}0772/5 = 3{,}0154$ on selvästi suurempi kuin 1, mikä osoittaa, että maljasarjan tulosten välillä on huomattava määrä muutakin vaihtelua kuin puhdasta hiukkastilastollista hajontaa.

Päätesuspension mikrobitiheyden suhteellinen standardiepävarmuus saadaan kaavasta

$$u_x = \sqrt{\frac{G^2_{n-1}}{n-1} \cdot \frac{1}{\Sigma c_i}} = \sqrt{3{,}0154 \cdot \frac{1}{325}} = 0{,}0963 \qquad (80)$$

Kokonaisepävarmuuden määritystä varten täytyy mukaan liittää laimennuskertoimen F mittausepävarmuuden arvio. Valitaan sama arvo kuin esimerkissä 10.3 eli $u_F = 0{,}0506$.

Mittaustuloksen suhteellinen standardiepävarmuus on tämän mukaisesti

$$u_y = \sqrt{0{,}0506^2 + 0{,}0963^2} = 0{,}1088 = 0{,}11 \qquad (81)$$

(Huom. esimerkissä 10.3 saatiin $u_y = 0{,}080$ sen optimistisen oletuksen takia, että Poisson-jakauma yksin riittäisi hajonnan malliksi).

Epäilyttävän mittaustuloksen (74) karsiminen vaikuttaa seuraavasti mittaustulokseen ja sen epävarmuuden arvioon.

Pesäkesumma alenee arvoon $C = 325 - 74 = 251$
Siirrosten kokonaistilavuus alenee arvoon V = 3,3 ml - 1 ml = 2,3 ml
Vapausasteet (n-1) vähenevät arvoon 4
$c_i ln(c_i/v_i)$-summasta vähennetään 318,5008. Uusi summan arvo on:
1499,2570 - 318,5008 = 1180,7562

Uskottavuusosamäärän arvo $G_4^2 = 2[1180{,}7562 - 251\ln(251/2{,}3)] =$
$2(1180{,}7562 - 1177{,}8285) = 2\cdot 2{,}9277 = 5{,}8554$

Vapausasteilla jaettu indeksin arvo alenee tuntuvasti: 5,8554/4 = 1,4639. Huolimatta samanaikaisesti alentuneesta pesäkkeiden kokonaismäärästä, päätesuspension mikrobipitoisuuden suhteellinen mittausepävarmuus pienenee:

$$u_x = \sqrt{\frac{1{,}4639}{251}} = 0{,}0764 \qquad (82)$$

(vrt. jälleen esim. 10.3: $u_y = 0{,}080$)

Painotettu keskiarvo suurenee lievästi: $x = 251/2{,}3 = 109$, joten mittaustulos on $y = 109 \times 10^5$ ml^{-1}.

Vaikutus kokonaisepävarmuuteen on tuntuvampi, sillä

$$u_y \;=\; \sqrt{0{,}0506^2 + 0{,}0764^2} \;=\; 0{,}0916 \;=\; 0{,}092 \tag{83}$$

Uusi mittaustulos on y = 1,1 × 10^7 ml^{-1} yhdistetyllä standardiepävarmuudella s_y = 0,1 × 10^7 ml^{-1}

10.5 Monta maljaa, "täydellisesti" korjattu mittaustulos

Esimerkissä 10.3 saatiin lähtötiedoista:
$F = 10^5$, $x = 98$ ml^{-1} mittaustulos $y = 98 \cdot 10^5$ ml^{-1}.

Mittaustulos ja sen epävarmuus halutaan korjata kaikkien systemaattisten virheiden suhteen. Huomioon otetaan korjauskertoimet:

todellinen laimennuskerroin F'
henkilökohtainen saaliskerroin K_H
näytteen stabiilisuuskerroin K_S
kasvualustan saaliskerroin K_A
materiaalin (kohteen) hajontakerroin K_M

Todellinen laimennuskerroin *F'*
Näyte on laimennettu viidessä vaiheessa, kukin 1 + 9 ml. Liitteen A taulukon mukaan 9 ml:n todellinen tilavuus ($b + \Delta b$) = 9 - 0,3 = 8,7 ml ja 1 ml:n siirrosten todellinen tilavuus ($a + \Delta a$) = 1 - 0,01 = 0,99 ml.
Todellinen laimennuskerroin F' = (8,7 + 0,99)/0,99)^5 = 9,7879^5 = 89835 = 0,898·10^5, sen epävarmuus on sama kuin kuvitteellisen laimennuskertoimen. Esimerkin 10.3 mukaan $u_{F'}$ = u_F = 0,0506.

Henkilökohtainen saaliskerroin K_H
Oletetaan, että henkilön on todettu laskevan keskimäärin 5 % alempia tuloksia kuin laboratorion työntekijöiden keskimäärin. Tulos pitää korjata 5 % ylöspäin.
Tämän estimaatin suhteellinen epävarmuus on samoissa kokeissa todettu 7 %-yksikön suuruiseksi.

$$K_H = 1 + 0{,}05 = 1{,}05,\; u_{KH} = 0{,}07 \tag{84}$$

Näytteen stabiilisuuskerroin K_S
Oletetaan näytteen mikrobipitoisuuden saattaneen säilytyksen aikana muuttua enintään 20 %, mutta muutoksen suuntaa ei voida ennakoida. Kaikkia muutoksia välillä –20 %...+20 % pidetään yhtä mahdollisina. Muutoskertoimen arvoksi valitaan K_S = 1 ja sen epävarmuudeksi arvioidaan (2.4.1) mukaan

$$u_{KS} \;=\; 0{,}20 / \sqrt{3} \;=\; 0{,}12 \tag{85}$$

Kasvualustan saaliskerroin K_A

Alustaerä on valmistuksen jälkeen testattu viljelemällä sillä 6 sertifioitua vertailunäytettä, joiden odotusarvoksi on ilmoitettu 56 pesäkettä koeannoksessa ja yksittäisten arvojen 95 % luottamusväliksi 48...66. Suhteellinen keskihajonta kaavan (41) mukaan: (ln66-ln48)/4 = 0,0796. Sertifiointiraportin mukaan keskiarvon 56 määritys perustui 356 näytteen tutkimiseen, joten keskiarvon suhteellinen keskihajonta on

$$u = 0{,}0796 / \sqrt{356} = 0{,}0042 \qquad (86)$$

Kuuden näytteen keskiarvotulokseksi testattavalla alustaerällä tuli 51. Sen suhteellinen keskihajonta (5.3.3 mukaan) on

$$(\ln 66 - \ln 48) / 4\sqrt{6} = 0{,}033. \qquad (87)$$

Saaliskertoimen suhteellisen keskihajonnan neliö on ($u^2_{KA} = 0{,}0042^2 + 0{,}033^2$) = 0,0011 joten $u_{KA} = 0{,}033$.

Saaliin korjauskertoimen arvo on $K_A = 56/51 = 1{,}10$, jolla mittaustulos on kerrottava (8.7.1).

Materiaalin hajontakerroin K_M

Oletetaan, että tutkittavana olevan materiaalityypin epähomogeenisuuden arvoksi on aikaisemmissa kokeissa todettu $u_M = 0{,}17$. (Arvoja löytyy koottuna Liite B:n taulukosta.)

Mikrobipitoisuuden tosiarvo on tuntematon. Korjauskertoimen arvoksi voidaan vain valita $K_M = 1$.

Yhteenveto

Päätesuspension tiheys $x = 98\ \mathrm{ml}^{-1}$ (esimerkistä 10.3)
Pesäkesumman epävarmuus $u_C = 0{,}0555$ (esimerkistä 10.3)
Siirrossumman epävarmuus $u_V = 0{,}013$ (esimerkistä 10.3)
$F' = 0{,}898 \cdot 10^5$, $u_{F'} = u_F = 0{,}0506$ (esimerkistä 10.3)
$K_H = 1{,}05$, $u_{KH} = 0{,}07$
$K_S = 1{,}0$, $u_{KS} = 0{,}12$
$K_A = 1{,}10$, $u_{KA} = 0{,}033$
$K_M = 1{,}0$, $u_{KM} = 0{,}17$

Korjattu mittaustulos: $y = 1{,}05 \cdot 1 \cdot 1{,}1 \cdot 1 \cdot 0{,}898 \cdot 10^5 \cdot 98 = 102 \cdot 10^5$

Korjatun tuloksen suhteellinen epävarmuus

$$u_y = \sqrt{0{,}0506^2 + 0{,}07^2 + 0{,}12^2 + 0{,}033^2 + 0{,}17^2 + 0{,}0555^2 + 0{,}013^2} = 0{,}235 \qquad (88)$$

Verrattuna korjaamattoman mittaustuloksen epävarmuuteen 0,08 (Esimerkki 10.3) tai 0,11 (Esimerkki 10.4) ero on huomattava.

10.6 Yhden putkisarjan MPN

Oletetaan n = 15 putken MPN-kaavio, jossa jokaiseen putkeen siirrostettu näytemäärä (v) on 5 ml laimentamatonta vesinäytettä.

Kasvuajan jälkeen havaitaan p = 10 positiivista putkea (steriilinä säilyi s = 5). Tehtävänä on laskea näytteen mikrobipitoisuus ja arvioida tuloksen epävarmuus.

Laskukaava (5.3.1) antaa päätesuspension tiheydelle arvion

$$x = \frac{1}{5}\ln\left(\frac{15}{5}\right) = 0{,}2 \cdot 1{,}10 = 0{,}22\,ml^{-1} \qquad (89)$$

Samaan tulokseen päädytään tietokoneohjelmalla (Hurley ja Roscoe 1983) tai taulukoista hakemalla (SFS 4447:1979, Niemelä 1983).

Mittausepävarmuuden laskemiseksi on kolme vaihtoehtoista lähtökohtaaa: tietokoneohjelman antama Log_{10} keskihajonta, tietokoneohjelmasta tai taulukoista saatava 95 % luottamusväli tai omakohtainen arviointi perushavainnoista lähtien.

Tietokoneohjelmasta saadaan Log_{10} keskihajonta: 0,14435. Kun se kerrotaan järjestelmien välisellä modulilla, saadaan ensimmäinen suhteellisen keskihajonnan estimaatti u_x = 2,3·0,14435 = 0,33.

95 % luottamusväli kahdesta eri lähteestä:

Yläraja x_Y	**Alaraja x_A**	**Lähde**
0,426	0,096	SFS 4447:1979
0,422	0,114	Hurley ja Roscoe 1983

Soveltamalla kaavaa (41) saadaan suhteellisen keskihajonnan arvoksi ensimmäisessä tapauksessa u_x = 0,37 ja toisessa u_x = 0,33. Johtuen erilaisista luottamusväleistä saadaan melko erilaiset estimaatit.

Perushavainnoista lähdettäessä lasketaan ensin "yksinkertaiset" (68 %) luottamusvälin ylä- ja alarajan arvot:

$$x_Y = \frac{1}{5}\ln\left(\frac{15}{5 - \sqrt{\frac{5 \cdot 10}{15}}}\right) = 0{,}3106 \qquad (90)$$

Vastaavasti alarajalla saadaan x_A = 0,1575

Ylä- ja alarajan arvoista kaavan (43) mukaan laskettu epävarmuuden estimaatti on 0,34.

Näinollen mittaustulos $y = 0{,}22\ ml^{-1}$ ja valittavana on kolme suhteellisen mittausepävarmuuden estimaattia: $u = 0{,}33,\ 0{,}37$ tai $0{,}34$.

10.7 Monen putkisarjan MPN

Näyte on ensin laimennettu 10^{-6}, minkä jälkeen tästä päätesuspensiosta ja sen 1:10 ja 1:100 jatkolaimennoksista on viljelty $n = 5$ rinnakkaisputkea 1 ml:n siirroksin.

Oletetaan positiivisten tulosten sarja 5-2-0. Tehtävänä on määrittää näytteen mikrobipitoisuus ja arvioida mittaustuloksen epävarmuus.

Eri tietolähteistä saadaan päätesuspension tiheydelle (x) allaolevat MPN-arvot ja niiden 95 % luottamusvälin rajat (x_Y, x_A):

x	x_Y	x_A	Lähde
4,9	12,6	1,7	Swaroop (1951), SFS 4447:1979
4,9	15,2	1,6	Hurley ja Roscoe (1983)
5	17	2	deMan (1975)

Luottamusvälit riittävät sinänsä tuloksen epävarmuuden ilmaisemiseen. Jos kuitenkin epävarmuusarvioon halutaan liittää muita komponentteja, on luottamusväli muunnettava suhteellisen keskihajonnan arvoksi. Esimerkin 10.6 tapaan toimien saadaan taulukon eri tapauksissa arvot $u_x = 0{,}50,\ 0{,}56,\ 0{,}54$.

Omakohtaisesti lähtöarvoista laskien (Cochran 1950) saadaan keskihajonnan arvoksi Log_{10}-asteikossa 0,259, joka luonnollisessa logaritmijärjestelmässä vastaa arvoa $u_x = 0{,}60$.

Laimennuskertoimen mahdollisesti suuruusluokkaa $u_F = 0{,}10$ oleva mittausepävarmuus lisää kokonaisepävarmuutta tuskin havaittavasti:

$$u_y = \sqrt{0{,}60^2 + 0{,}10^2} = 0{,}61 \qquad (91)$$

Siirrosmittausten (pipetointien) tilavuusepävarmuus jää kokonaan ilman vaikutusta.

11 KIRJALLISUUTTA

Cochran, W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". Biometrics, **6:**105-116.

Eurachem 1995. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, First Edition. London.

Halvorson, H.O. and Ziegler N.R., 1933. Application of statistics to problems in bacteriology I. A means of determining bacterial population by the dilution method. J. Bact., **25:**101-121.

Hurley, M.A. and Roscoe M.E., 1983. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. J.Appl.Bacteriol., **55:**159-164.

IDF Provisional International Standard 169:1994. Quality Control in the microbiological Laboratory. Analyst performance assessment for colony count. International Dairy Fedaration, Brussels.

ISO 1995. Guide to the expression of uncertainty in measurement.
First Edition, corrected and reprinted. International Organization for Standardization, Geneve.

de Man, J.C. 1975. The probability of most probable number. European J.Appl.Microbiol. **1:**67-78.

Myrberg, P.J. 1952. Differentiaali- ja integraalilaskennan oppikirja. Tiedekirjasto N:o 23, Kustannus Oy Otava, Helsinki

Niemelä, S. 1965. The quantitative estimation of bacterial colonies on membrane filters. Ann.Acad.Sci.Fenn., Ser.A. IV. Biologica. No. 90.

Niemelä, S. 1983. Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations. NMKL Report no. 1, second edition. Nordic Committee on Food Analysis. Ord & Form AB, Uppsala.

Niemelä, S. 1998. Mikrobiologian biometria. Luentomoniste, Helsingin yliopiston soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. Yliopistopaino, Helsinki.

NMKL 1999. Measurent of Uncertainty in Microbiological Examination of Foods. NMKL Procedure No. 8.

SFS 3700:1998. Metrologia. Perus- ja yleistermien sanasto, 3. painos. Suomen Standardisoimisliitto.

SFS 4447:1979. Putkimenetelmä veden mikrobiologisessa tutkimuksessa. Suomen Standardisoimisliitto.

Swaroop, S. 1951. The range of variation of the most probable number of organisms estimated by the dilution method. Indian J. med. Res. **39:**107-134.

LIITE A. Eri lähteistä koottuja epävarmuustekijöiden arvoja

Taulukko A1. *Esimerkkejä Helsingin yliopiston mikrobiologian laitoksen välineistöllä tehtyjen tilavuusmittausten variansseista ja keskihajonta-arvoista (Niemelä 1998).*

Väline	V (ml)	ΔV(ml)	s(ml)	u***
Finnpipetti	0,1		0.0051	0.05
Finnpipetti	1,0		0.0087	0.009
1 ml mittapipetti (lasi)	0,1		0.0081	0.08
1 ml mittapipetti (lasi)	1,0	-0.01	0.025	0.025
5 ml mittapipetti (lasi)	5,0		0.027	0.005
mäntäannostelija*	4,5	-0.02	0.024	0.005
mäntäannostelija*	9,0	-0.3	0.024	0.003
mäntäannostelija**	9,0	-0.6	0.089	0.01
mäntäannostelija**	99,0	-3.5	0.249	0.0025

* steriloitu ennen annostelua

** steriloitu annostelun jälkeen

*** suhteellinen keskihajonta

Taulukko A2. *Tilavuusmittausten hajonnasta johtuva laimennuskertoimen (F) suhteellinen mittausepävarmuus (u_F) erilaisilla siirrostilavuuden (1 ml) epävarmuusarvoilla (1 %, 2 %, 3 % ja 4 %) laimennusvesitilavuuden (9 ml) suhteellisen epävarmuuden ollessa kaikissa tapauksissa 1 %. Arvioitu tekstijaksossa 5.1.2 esitettyyn tapaan.*

	Siirrostilavuuden epävarmuus (u_a)			
Laimennus-kerroin *F*	1 %	2 %	3 %	4 %
10^{-1}	0,013	0,020	0,029	0,037
10^{-2}	0,018	0,028	0,040	0,053
10^{-3}	0,022	0,035	0,049	0,064
10^{-4}	0,025	0,040	0,057	0,074
10^{-5}	0,028	0,045	0,064	0,083
10^{-6}	0,031	0,049	0,070	0,091

LIITE B. Erilaisten materiaalien ja luonnon kohteiden mikrobipitoisuuden hajonta-arvoja. Sisältävät materiaalin, tulosten lukemisen ja koeannoksen siirroksen epävarmuuskomponentit (u_M, u_z, u_v)

Kohde tai materiaali	u	Lähde
Kymijoki Myllykoski, 15 min sisäinen hajonta		1
Endo- ja SB-pesäkeluku	0,10	
Vantaanjoki, alajuoksu 5,0 km, virka-aikana arkisin.		2
mFC pesäkeluku	0,24*	
KF pesäkeluku	0,25*	
Keravanjoki, keskijakso 4,4 km, virka-aikana arkisin.		2
mFC pesäkeluku	0,26*	
KF pesäkeluku	0,27*	
Puhdasviljelmällä terästetty ster. maito		3
VRB pesäkeluku	0,00	
VRB Petrifilm	0,00	
Puhdasviljelmäseoksella terästetty ster. maito		3
SPC laimennus 1:10 pesäkeluku	0,06	
Petrifilm Total Count, laim. 1:10	0,00	

* Arvioitu ISO-oppaan "Validation of Microbiological Methods" esimerkissä C7 havainnollistetulla regressiomenetelmällä.

Lähteet:

1. Niemelä, S.I. & Tirronen E.K.. 1968. Suolistobakteerimääritysten luotettavuus. Vesi **1:**5-16.

2. Niemi, R.M. & Niemi J.S.. 1990. Monitoring of fecal indicators in rivers on the basis of random sampling and percentiles. Water, Air, and Soil Pollution **50:**331-342.

3. Ginn, R.E., Packard V.S. &. Fox T.L.. 1986. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69:**527-531.

LIITE C. BASIC-ohjelma uskottavuusosamäärän G^2-arvon laskemiseksi (IDF 1994).

```
10   PRINT "LIKELIHOOD RATIO INDEX G^2"
20   INPUT "NUMBER OF TERMS, n=";N
30   C=0: V=0: S=0: T=0: D=0
40   FOR I=1 TO N
50   PRINT "I=";I
60   INPUT "COLONY COUNT=";C
70   INPUT "VOLUME=";V
80   IF (C=0) THEN W=0: GOTO 100
90   W=C*LOG(C/V)
91   REM IN THIS BASIC LANGUAGE VERSION LOG=NATURAL LOGARITHM
100  S=S+W
110  T=T+V
120  D=D+C
130  NEXT I
140  Y=2*(S-D*LOG(D/T))
141  REM IN THIS BASIC LANGUAGE VERSION LOG=NATURAL LOGARITHM
150  Y=(INT(1000*Y+0.5))/1000
160  PRINT
170  PRINT "INDEX G^2=";Y
180  PRINT
190  PRINT
200  INPUT "ANOTHER SET? (Y/N)";H$
210  IF H$="Y" OR H$="y" GOTO 20 ELSE 220
220  END
```

Oletetaan, että edellä esitetyt komentorivit on BASIC-ohjelmaan näppäilyn jälkeen tallennettu disketille nimellä "G2-INDEX".

Esimerkki:

Kahdesta perättäisestä laimennuksesta (kerroin 10) on saatu seuraavat rinnakkaismaljojen pesäkelukumäärät (C):

Laim.	**C**	**Suht. tilav.**
10^{-4}	268	10
	314	10
10^{-5}	31	1
	15	1

Uskottavuusosamääräindeksin G^2 arvo ei riipu siitä, missä mittayksiköissä siirroskoot on mitattu, kunhan niiden suhteet säilyvät. On helpointa valita suhteelliset tilavuudet siten, että pienin tutkittu tilavuus merkitään 1:ksi ja muut ovat sen kerrannaisia.

Ohjelma otetaan käyttöön kirjoittamalla
LOAD "A:G2-INDEX"

Käyttöesimerkki (**Lihavoidut tekstit ja numerot ovat käyttäjän syöttämiä tietoja**):

Ok
LOAD"A:G2-INDEX"
Ok
RUN
LIKELIHOOD RATIO INDEX G^2
NUMBER OF TERMS, N=? **4** (tähän kirjoitetaan maljojen lukumäärä)
I=1
COLONY COUNT=? **268**
RELATIVE VOLUME=? **10**
I=2
COLONY COUNT=? **314**
RELATIVE VOLUME=? **10**
I=3
COLONY COUNT=? **31**
RELATIVE VOLUME=? **1**
I=4
COLONY COUNT=? **15**
RELATIVE VOLUME=? **1**

INDEX G^2= 11.847

ANOTHER SET (Y/N)? (Tähän vastataan joko Y tai N riippuen lopetetaanko vai jatketaanko)

Ohjelmasta poistutaan syöttämällä lopuksi
Ok
SYSTEM

Virheellisesti syötettyä numeroa ei pysty jälkikäteen korjaamaan, vaan ohjelma on siirrettävä takaisin alkuun ja on aloitettava kaikki uudestaan.
Jos virhelyönti havaitaan kesken tulosten syöttämisen, ohjelma saadaan keskeytetyksi näppäimellä Ctrl C. Sen jälkeen tulee:

Break in 70
Ok
RUN (uusi aloitus)
LIKELIHOOD RATIO INDEX G^2
NUMBER OF TERMS, N=?
jne...

Liite D. TULOSLOMAKE

Näyte: ____ Pvm. ________________________

Perustiedot:

(Päätesuspension) laimennuskerroin F: ________________________
Pesäkelukumäärä(t): _________________ yht. = C: ______________
Siirrostilavuudet: _________________ yht. = V ______________

Tuloksen laskemisessa sovelletut korjauskertoimet:
(sulkeissa viittaus ohjekohtaan)

		Kerroin	**u**	**u^2**
varmistuvuus p	(8.3; 5.2)	____________	_________	___________
henkilökoht. saaliskerroin K_H	(8.4)	____________	_________	___________
näytteen stabiilisuuskerroin K_S	(8.6)	____________	_________	___________
alustan saaliskerroin K_A	(8.7)	____________	_________	___________
peittokorjauskerroin K_L	(8.9)	____________	_________	___________
laimennuskerroin F	(5.1; 8.2)	____________	_________	___________

(Tuntemattoman kertoimen arvoksi annetaan 1 ja sen epävarmuudeksi arvo 0)

Tulos: $y = p \cdot K_H \cdot K_S \cdot K_A \cdot K_L \cdot F \cdot \frac{C}{V}$

”Mittalaitteen” epävarmuuskertoimet:

		u	**u^2**
lukemaepävarmuus (Z)	(7.1; 8.5; 8.10; 9.3; 9.4)	_________	___________
peruspesäkeluku (C)	(7.2; 7.3; 9.1; 9.2)	_________	___________
siirrostilavuus (V)	(7.4; 7.5)	_________	___________

Tuloksen (suhteellinen) epävarmuus:

$$u_y = \sqrt{u_p^2 + u_{KH}^2 + u_{KS}^2 + u_{KA}^2 + u_{KL}^2 + u_F^2 + u_Z^2 + u_C^2 + u_V^2}$$

Lopputulos:

Mikrobipitoisuus y: ______________________
Epävarmuus: 100u_y ______________________ **%**

Julkaisut 1999 - 2001

J1/1999	Nordic Intercomparison in Barometric Pressure
J2/1999	Automaattisten punnustenvaihtimien suunnittelu, toteutus ja käyttö
J3/1999	Intercomparison of Gauge Pressure Measurements between SP/FFA and MIKES in the Range 32 kPa … 132 kPa
J4/1999	Ainemäärän kansallisen mittanormaalijärjestelmän toteuttamista ja organisaatiota koskeva selvitys
J5/1999	Mikrobiologisen metrologian tilanneselvitys ja kehittämissuunnitelma
J6/1999	Finnish National Standards Laboratories FINMET. Annual Report 1998
J7/1999	Lämpötilan vertailumittaus L10, S-tyypin termoelementin kalibrointi
J8/1999	Mekaanisten värähtelyiden mittausten kartoitus
J9/1999	Intercomparison of the Hydrometer Calibration Systems at the IMGC and the MIKES
J10/1999	National Basis for Traceability in Humidity Measurements
J1/2000	Intercomparison of Temperature Standards of Lithuania and Finland
J2/2000	Finnish National Standards Laboratories FINMET. Annual Report 1999
J3/2000	Mass Comparison M3
J4/2000	Mass and Volume Comparisons at MIKES
J5/2000	Nanometritason mittaukset, kartoitus
J6/2000	Nordic Intercomparison in Gauge Pressure Range 0 … 2 MPa
J1/2001	Mikrobiologian kvantitatiivisten viljelymääritysten mittausepävarmuus
J2/2001	Finnish National Standards Laboratories. Annual Report 2000

Tilaukset toimistosihteeri Kirsi Tuomisto, puh. (09) 6167 457,
e-mail kirsi.tuomisto@mikes.fi.

MITTATEKNIIKAN KESKUS
CENTRE FOR METROLOGY AND ACCREDITATION
P.O. Box 239
FIN- 00181 HELSINKI
Tel. +358 9 616 761
Telefax +358 9 616 7467

ISBN 952-5209-56-3
ISSN 1235-5704