



Mikrobiologisten menetelmien epävarmuuden laskeminen

Elintarvikkeet, vesi ja asumisterveys

Metrologian neuvottelukunta

Mikrobiologisten menetelmien epävarmuuden laskeminen

Elintarvikkeet, vesi ja asumisterveys

Metrologian neuvottelukunta

Tekninen toimittaja

Jaana Järvinen

VTT MIKES

ISBN 978-951-38-8794-0

VTT Technology 430

ISSN-L 2242-1211

ISSN 2242-122X (Verkkójulkaisu)

DOI: 10.32040/2242-122X.2024.T430

Copyright © VTT 2024

JULKAISIJA – PUBLISHER

VTT

PL 1000

02044 VTT

Puh. 020 722 111

<https://www.vtt.fi>

VTT

P.O. Box 1000

FI-02044 VTT, Finland

Tel. +358 20 722 111

<https://www.vttresearch.com>

Alkusanat

Jokaiseen mitattavaan tulokseen liittyy mittaasepävarmuutta. Mittaustulokseen vaikuttaa aina useita tekijöitä, joita ei voi koskaan täysin tuntea. Näin ollen mittaustulokset sisältävät tietyn epävarmuuden, vaihteluvälin, joka kuvaa mittaustulosten vaihtelua. Tämän oppaan tavoite on mahdollistaa yhtenäisten menettelyjen käyttö mikrobiologisten menetelmien mittaasepävarmuuden arvioimisessa. Tämä edistää asiakkaiden mahdollisuuksia vertailla eri laboratorioiden suoriutumistasoa ja toisaalta antaa periaatteita FINAS-akkreditointipalvelun käyttöön. Tämä opas on tarkoitettu palvelemaan erityisesti ns. rutiinilaboratorioita, jotka tarvitsevat menettelyä mittaustuloksen epävarmuuden arvioimiseen.

Oppaassa on tarkoituksellisesti käsitelty sellaisia mittaasepävarmuustekijöitä, joilla on arvioitu olevan merkittävä vaikutus tulosten mittaasepävarmuuteen. Tekijät, joilla on vähäinen vaikutus mittaasepävarmuuteen, voidaan laboratorion suorittaman arvioinnin perusteella sivuuttaa. Esimerkkinä tällaisesta tekijästä voi olla massan punnituksen tai annostelijan tilavuuden epävarmuus. Laboratorion pitää kuitenkin laadunvarmistuksen seurata, että laitteiden ja välineiden tarkkuus pysyy sallituissa epävarmuusrajoissa.

Näytteenotto muodostaa merkittävän epävarmuuden lähteen, joten mittaasepävarmuutta varten on päätettävä, sisällytetäänkö näytteenotto, kuljetus ja muut analysointia edeltävät tekijät epävarmuusarvioon vai ei. Tässä oppaassa ne eivät sisälly mittaasepävarmuusarvioon, mutta se ei tarkoita, etteikö laboratorion tulisi hallita myös nämä virhelähteet esim. ohjeistuksen ja koulutuksen avulla. Asiakkaille on hyvä antaa tietoa siitä, mikäli näytteenoton epävarmuutta ei ole otettu huomioon mittaasepävarmuuslaskelmissa.

Oppaassa on käsitelty teknisen epävarmuuden lisäksi laboratoriosuorituksesta riippumattoman hiukkastilastollisen hajonnan tulokseen aiheuttamaa epävarmuutta. Laboratorion on tunnettava mittaasepävarmuuden merkitys tulokseen, vaikka sitä ei huomioitaisi tuloksen kokonaisepävarmuudessa.

Standardien lainaukset on tehty SFS Suomen Standardit ry:n luvalla.



METROLOGIAN NEUVOTTELUKUNTA

Sisällysluettelo

Alkusanat.....	3
Sisällysluettelo	4
1 Yleistä mittausepävarmuudesta	6
1.1 Mittausepävarmuus käsitteenä.....	6
1.2 Asteikkomuunnokset mittausepävarmuuslaskuissa.....	8
2 Elintarvikeketjun näytteet: Kokonaismittausepävarmuuden laskeminen kvantitatiivisille menetelmille.....	10
2.1 Kokonaismittausepävarmuuden laskeminen	10
2.2 Tekninen mittausepävarmuus (u_{tech}).....	11
2.2.1 Hiukkastilastollinen hajonta (Poissonin jakauma).....	12
2.2.2 Varmistuvuuden epävarmuus (u_{conf}).....	13
2.2.3 Matriisin mittausepävarmuus (u_{matrix}).....	13
2.2.4 Yhdistetyn ja laajennetun epävarmuuden laskeminen.....	15
2.3 Kokonaismittausepävarmuuden laskeminen elintarvikkeille komponenttiperiaatteella.....	17
3 Kvantitatiivisten vesimikrobiologisten menetelmien mittausepävarmuuden arviointi	18
3.1 Teknisen epävarmuuden arviointi.....	19
3.1.1 Tilavuusmittausten toistettavuus ja laboratorion sisäinen uusittavuus	20
3.1.2 Koeannosten tilavuuksien summan suhteellinen epävarmuus.....	21
3.1.3 Laimennuskertoimen suhteellinen epävarmuus	22
3.1.4 Lukemisepävarmuus	24
3.2 Luontainen vaihtelu	25
3.2.1 Pesäkemäärän suhteellinen jakaumaepävarmuus.....	25
3.2.2 MPN-estimaattien luontainen vaihtelu	26

4	Asumisterveysmenetelmien mittausepävarmuuden arviointi	27
4.1	Asumisterveysmikrobiologian menetelmät	27
4.1.1	Laimennussarja- ja suoraviljelymenetelmät	28
4.1.2	Sienten ja aktinomykeettien tunnistus	29
4.1.3	Suoramikroskopointi.....	29
4.1.4	Andersen-ilmanäyte	30
4.2	Teknisen epävarmuuden arviointi.....	30
4.2.1	Laimennussarjamenetelmän tekninen epävarmuus	30
4.2.2	Suoraviljelymenetelmän tekninen epävarmuus.....	37
4.2.3	Andersen-keräimen ilmanäytteen tekninen epävarmuus	39
4.3	Sieni- ja aktinomykeettitunnistuksen epävarmuus	39
4.4	Suoramikroskopoinnin epävarmuus.....	40
4.5	Luontainen vaihtelu - hiukastilastollinen hajonta.....	41
4.5.1	Pesäkelukumäärä	41
4.5.2	Andersen-tuloksen MPN-arvo	42
4.6	Yhdistetty ja laajennettu mittausepävarmuus	44
5	Huomioon otettavat asiakohdat muiden kvantitatiivisten menetelmien käyttöönnotossa ja mittausepävarmuudessa	46
6	Mittausepävarmuustietojen ilmoittaminen asiakkaille ja käyttö tulosten tulkinnassa	47
7	Mittausepävarmuustietojen ylläpitäminen	49
	Kiitokset	50
	Syventävää kirjallisuutta	51
	Liite 1 Termit ja määritelmät	52
	Liite 2 MPN-menetelmät	54
	Liite 3 Mittausepävarmuuteen vaikuttavat tekijät kvalitatiivisissa menetelmissä	60

1 Yleistä mittausepävarmuudesta

1.1 Mittausepävarmuus käsitteenä

Mittausepävarmuutta käytetään tulosten luotettavuuden arviointiin. Kahden tuloksen keskinäinen vertailu on vaikeaa ilman tietoa mittausepävarmuudesta. Tulosten vaatimustenmukaisuuden osoittamiseen tarvitaan mittausepävarmuutta, jotta voidaan arvioida, onko tulos mittausepävarmuuden kanssa asetetuissa raja-arvoissa.

Mittausepävarmuuden määrittämisellä voidaan myös saavuttaa kustannussäästöjä. Menetelmävertailun perusteella voidaan valita edullisin menetelmä, mikäli se on mittausepävarmuus huomioiden kuitenkin riittävän tarkka käyttötarkoitukseensa. Analyysitulokset ovat luotettavampia, kun mittausepävarmuus tunnetaan. Kun menetelmän mittausepävarmuus on saatu määritettyä, tiedetään että laboratorio on selvillä siitä, mikä kyseisessä menetelmässä on kriittistä. Mittausepävarmuuden määrittäminen parantaa laadunhallintaa ja toimintatapoja.

Akkreditoitujen laboratorioiden pätevyyttä koskevan standardin SFS-EN ISO/IEC 17025:2017¹ mukaan testauksia suorittavan laboratorion on määritettävä mittausepävarmuus tai mikäli se ei testausmenetelmän takia ole mahdollista, esitettävä arvio, joka perustuu menetelmän periaatteisiin ja laboratorion käytännön kokemukseen. Menetelmien mittausepävarmuuden määrittämisen periaatteita on kuvattu useissa oppaissa². Kansainvälinen standardointijärjestö on vahvistanut

¹ SFS-EN ISO/IEC 17025:2017. Testaus- ja kalibrointilaboratorioiden pätevyys. Yleiset vaatimukset.

² Eurachem/CITAC Guide CG 4, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third Edition, QUAM:2012.P1.
https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf
Eurachem Guide. Accreditation for Microbiological Laboratories, AML 2013
https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Eurachem_Guide_AML_2013.P2.pdf
UKAS M3003, The Expression of Uncertainty and Confidence in Measurement, edition 5 2022. https://www.ukas.com/wp-content/uploads/schedule_uploads/759162/M3003-The-Expression-of-Uncertainty-and-Confidence-in-Measurement.pdf

standardit SFS-EN ISO 19036:2019³ ja SFS-ISO 29201:2017⁴ elintarvikeketjun, siihen liittyvien ympäristönäytteiden ja rehujen sekä veden kvantitatiivisten mittausten mittaasepävarmuuden määrittämiseksi ja arvioimiseksi.

Laboratorion tulee laadunvarmistustoimenpiteisiinsä tukeutuen itse hankkia tietoa testausmenetelmiensä epävarmuuslähteistä. Laboratorion tulee tunnistaa yksittäiset, sen tekniseen suorittamiseen liittyvät epävarmuustekijät, seurata niiden merkittävyyttä ja osoittaa, että epävarmuustekijät voidaan hallita ja niiden vaikutusta tulosten vaihteluun arvioida.

Mittaustuloksen epävarmuuden määrittämisen ja seurannan kannalta onkin oleellista tietoa siitä, mitkä tekijät laboratorion tyypillisissä mittauksissa aiheuttavat epävarmuutta. Merkittävimpien teknisten epävarmuustekijöiden suuruutta ja kehittymistä seurataan säännöllisesti. Vaikutukseltaan vähäisten tekijöiden merkitystä mittaustulokselle arvioidaan lähinnä muutostilanteissa kuten laitteistojen tai välineiden vaihtuessa.

Laboratoriolla tulee myös olla hyvä käsitys siitä, miten mikrobit jakautuvat tutkittavassa näytetyypissä eli matriisissa. Asiaan on kiinnitettävä huomiota noudattamalla näytteen käsittelyssä mahdollisia viranomaisten antamia ohjeita ja laboratorion sisäisiä ohjeita erityisesti epähomogeenisista näytteistä otettavien osanäytteiden koostamisessa. Matriisiin aiheuttama epävarmuus voidaan selvittää laboratorion sisäisillä toistettavuuskokeilla. Menettely on työläs erityisesti, kun analysoidaan esim. lukuisia erilaisia elintarvikenäytteitä. Toinen tapa on käyttää olemassa olevaa tietoa samankaltaisten matriisien aiheuttamasta epävarmuudesta. Homogeenisessäkin näytteessä mikrobit jakautuvat matriisiin sattumanvaraisesti. Mikrobin luonnollinen eli hiukkastilastollinen hajonta ei riipu laboratorion teknisestä suorituskyvystä. Sillä on suurin merkitys silloin, kun laskettavien pesäkkeiden lukumäärä on pieni.

Mikrobiologisten menetelmien numeerinen mittaasepävarmuus voidaan määrittää vain kvantitatiivisille menetelmille. Semikvantitatiivisissa menetelmissä kuten asumisterveysmikrobiologian suoraviljelymenetelmässä tulos ilmoitetaan joko pesäkelaskennan tuloksena tai arvioituna pesäkemääränä. Tuloksia voidaan käyttää mittaasepävarmuusarvioinnissa.

Vaikka mittaasepävarmuuslaskennan konseptia ei voi sellaisenaan soveltaa kvalitatiivisille viljely- tai PCR-menetelmille, mikrobin tunnistusmenetelmille tai mikroskooppiseen tutkimukseen perustuville menetelmille, laboratorion tulee myös tunnistaa näihin menetelmiin liittyvät vaihtelunlähteet. Epävarmuutta aiheuttavat tekijät tulee osoittaa ja niitä tulee seurata ja hallita sisäisin laadunvarmistuksin.

Pikatestien valmistajat ovat yleensä hakeneet laiteautomaatioon perustuville testeilleen eri validointijärjestöjen hyväksynnät, ja laitteiden suorituskyvystä on saatavilla riittävästi tietoa. Laitteen kykyyn tuottaa toistettavia tuloksia liittyvät

³ SFS-EN ISO 19036:2019. Microbiology of the food chain. Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.

⁴ SFS-ISO 29201:2017. Veden laatu. Mikrobiologisten lukumäärämenetelmien testitulosten vaihtelu ja mittaasepävarmuus.

myös laboratorion epävarmuustekijät kuten näytteen käsittelyn ja muun teknisen suorituksen epävarmuus.

Kaikkia epävarmuustekijöitä kuten näytteen säilyvyyden tai näytteen käsittelyn vaikutusta tulosten vaihteluun on vaikea määrittää ja arvioida laskennallisesti, mutta niiden vaikutus tuloksen vaihteluun on kuitenkin syytä tunnistaa ja ottaa huomioon laboratorion ohjeistuksissa ja laadunvarmistusmenettelyissä.

Liitteeseen 1 on koottu tässä oppaassa käytettyjä termejä.

1.2 Asteikkomuunnokset mittausepävarmuuslaskuissa

Yhdistetyn mittausepävarmuuden laskeminen komponenteista standardin SFS-ISO 29201:2017 mukaan tai SFS-EN ISO 19036:2019 menettelyllä edellyttää komponenttien esittämistä jossakin suhdeasteikossa. Alun perin eri komponenttien arvot saatetaan arvioida eri asteikoissa. Tilaajaa varten lopputulokset ja niiden luottamusväli tai mittausepävarmuus raportoidaan yleensä aritmeettisessä (eli välimatka-) asteikossa. Tämän vuoksi on voitava muuntaa tuloksia asteikosta toiseen tarpeiden mukaan.

Elintarviketuolella suhdeasteikoksi on vakiintunut kymmenkantainen logaritmiasteikko. Vesipuolella joko desimaali- tai prosenttiasteikko tai niitä lähes vastaava luonnollinen logaritmi ovat tavallisempia.

Logaritmiasteikossa esitetyt luvut eivät yleensä ole havainnollisia jokapäiväisessä kokemusmaailmassa. Tosin aika nopeasti tottuu muistamaan, että kymmenkantaisten logaritmien kokonaislukuarvot vastaavat aritmeettisen asteikon arvoja 10, 100, 1000...jne. Luonnollisten logaritmien arvot eivät mitenkään liity arkiseen kokemusmaailmaan.

Logaritmien muunto aritmeettiseen asteikkoon

Periaate: kantaluku korotetaan logaritmiarvoa vastaavaan potenssiin

Esimerkiksi tulos 4,38 lg pmy/g vastaa aritmeettisessä asteikossa arvoa 104,38 \approx 24 000 pmy/g. Jos arvo 4,38 olisikin ollut luonnollinen logaritmi, se edustaisi arvoa $e^{4,38} \approx 80$ pmy/g.

Logaritmijärjestelmästä toiseen

Muunnokset lg- ja ln-järjestelmien välillä

$$\ln(x) = (\ln 10) \times \lg(x) = 2,3026 \times \lg(x)$$

$$\lg(x) = (\lg e) \times \ln(x) = 0,4343 \times \ln(x).$$

Suhteellisten arvojen ja luonnollisten logaritmien yhteys

Tärkeä likimääräinen yhteys on: $u_{rel} \approx \ln(u)$ eli luvun suhteellinen epävarmuus on likipitään sama kuin sen luonnollisen logaritmin absoluuttinen epävarmuus.

Numeroesimerkki

Oletetaan näytteestä rinnakkaiset testitulokset 20 ja 30 yksikköä (esim. pmy).

Tulosten erotus on yksinkertaisin tapa kuvata mittauksen epävarmuutta. $MU = 30 - 20 = 10$ yksikköä. Kun kahden keskimäärin 25 yksikköä olevan mittauksen välinen vaihtelu on niinkin suuri kuin 10 yksikköä, vaikuttaa keskiarvo aika epävarmalta. Epävarmuus tulee havainnolliseksi, kun se esitetään suhteellisena. Suhteellinen erotus on $MU_{rel} = 10/25 = 0,40$ eli 40 % keskiarvosta.

Luonnollisessa logaritmijärjestelmässä erotus $\ln(MU) = \ln(30) - \ln(20) = 3,4012 - 2,9957 = 0,4055 = 0,41$, lähes sama kuin suhteellinen erotus MU_{rel} . Ig-asteikossa erotuksen arvo on $\lg(MU) = \lg(30) - \lg(20) = 1,47 - 1,30 = 0,17$ Ig-yksikköä. Ilman kokemusta muista mittausepävarmuuksista Ig-asteikossa ei voi tietää onko arvo 0,17 pidettävä suurena vai pienenä.

2 Elintarvikeketjun näytteet: Kokonaismittausepävarmuuden laskeminen kvantitatiivisille menetelmille

Elintarvikemikrobiologian standardi SFS-EN ISO 19036:2019 käsittelee elintarvikkeita ja rehuja sekä niiden tuotannon ja käsittelyn ympäristönäytteitä. Ruokaviraston mukaan jokaisen akkreditoitun laboratorion on määritettävä mittausepävarmuus kaikille kvantitatiivisille mikrobiologisille menetelmille.⁵ Se tulee arvioida standardin SFS-EN ISO19036:2019 mukaan Listeria monocytogenes - ja Campylobacter-menetelmille sekä muille elintarvikkeiden viranomaisvalvonnassa käytettäville kvantitatiivisille ISO-menetelmille. Tämä vaatimus koskee myös niitä Ruokaviraston listaamia vaihtoehtoisia menetelmiä, joita voidaan käyttää mikrobikriteeriasetuksen mukaisiin määrittäksiin. Standardissa hyväksytään se, että epävarmuudessa huomioidaan ainoastaan tekninen epävarmuus, kunhan sen määrittäminen toteutetaan laboratorion sisäisin uusittavuustestein. Tässä oppaassa on haluttu informoida laboratorioita myös matriisivaikutuksen huomioon ottamisesta.

Mittausepävarmuus voidaan määrittää kolmella tavalla:

1. kokonaismittausepävarmuus, huomioiden tekninen epävarmuus, matriisi ja hiukkastilastollinen hajonta sekä mahdollinen varmistuvuuden epävarmuus.
2. teknisen mittausepävarmuuden perusteella, mikäli se vastaa asiakasvaatimuksia ja laboratorion ohjeistuksia. Tekninen epävarmuus on usein suurin epävarmuustekijä.
3. komponenttiperiaatteella määritetty yhdistetty kokonaismittausepävarmuus.

2.1 Kokonaismittausepävarmuuden laskeminen

SFS-EN ISO 19036:2019 standardin mukaisessa mikrobiologian mittausepävarmuuden laskemisessa lähdetään siitä, että ei ole mahdollista rakentaa kattavaa kvantitatiivista laskentamallia vaan laskenta tehdään osa-

⁵ Ruokavirasto (2018) Elintarvikkeiden mikrobiologinen näytteenotto ja analyysit - Ohje elintarvikevalvontaviranomaisille, Eviran ohje 10502/2:2018.
https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/elintarvikevalvonta/eviran-ohje-10502_2.pdf

aluetasolla tehtävien arvioiden perusteella. Jokaisen osa-alueen laskeminen täydellisen tarkasti ei ole mahdollista.

Mikrobiologisen menetelmän mittausepävarmuus koostuu kolmesta epävarmuuskomponentista:

- tekninen epävarmuus
- matriisin epävarmuus
- mikrobien epätasaisesta jakautumisesta johtuva epävarmuus.

Tekninen epävarmuus johtuu toiminnan vaihtelusta ja se arvioidaan mittausprosessin lopullisen tuloksen sisäisestä uusittavuudesta, joka ilmaistaan toistomittausten tulosten keskihajontana.

Matriisin eli näytetyypin epävarmuus johtuu laboratorionäytteen epätäydellisestä sekoittumisesta mikä johtaa testaustulosten huonoon toistettavuuteen. Matriisin epävarmuutta on kuvattu tarkemmin kohdassa 2.2.3.

2.2 Tekninen mittausepävarmuus (u_{tech})

Teknisellä mittausepävarmuudella tarkoitetaan analyysin teknisestä suorituksesta johtuvaa epävarmuutta. Se perustuu analyysituloksen sisäiseen uusittavuuteen. Sen määrittämisessä käytetään laboratoriolle tyypillisiä mikrobipitoisuuksia, matriisia ja siihen sisällytetään kaikki analysointiprosessiin liittyvä vaihtelu. Epävarmuuden arvona käytetään uusittavuusmittausten keskihajontaa.

Teknisen mittausepävarmuuden lähteitä mikrobiologisessa laboratoriossa ovat mm:

- Näytteen punnitsemisessa näytteen epähomogeenisuus ja käytetyn vaa'an mittausepävarmuus
- Näytteen laimentamisessa, siirrostuksessa ja inkuboinnissa analyysin tekijä, laitteisto ja mittausvälineet, elatusaineet ja reagenssit tai kasvun havaitseminen.

Tekninen epävarmuus on menetelmäkohtainen ja se tulee määrittää aina uudelleen, mikäli jokin siihen vaikuttava tekijä muuttuu.

Laboratorion sisäisen uusittavuuden arvioinnin tarkoituksena on sulkea pois vaikutukset heterogeenisyydestä laboratorionäytteen sisällä. Arviota ei tarvitse toistaa eri matriiseille ja tämä arvio voi perustua yhteen matriisiin. Koejärjestelyjä ei tarvitse toistaa erilaisille kontaminaatitasoille. Laboratorionäytteet tulisi kuitenkin valita siten, että käytetään laboratoriolle tyypillisiä mikrobipitoisuuksia ja mieluiten luontaisesti kontaminoituneita näytteitä. Pesäkemäärän tulisi olla vähintään 30 pmy mutta kuitenkin alle menetelmän määrittämän laskentaylärajan.

Matriisin epävarmuustekijöiden minimoimiseksi laboratorionäyte tulee homogenoida mahdollisimman hyvin. Näytteeksi otetaan vähintään kaksi testiosaa A ja B (rinnakkaiset) toistuvien mittausten mahdollistamiseksi. Mikäli näytteeseen on tarpeen siirrostaa ko. mikrobia, tulee se tehdä alkuperäisessä suspensiossa. Analyysit suoritetaan kummallekin testiosalle (rinnakkaisnäytteelle) rutiinitestauksen tapaan. Mittausolosuhteiden A ja B tulisi erota mahdollisimman monin eri tavoin, esim. elatusaine-erät, reagenssit, homogenisaattori,

laimennuslaite, pipetti, inkubaattori, pH-mittari, vaaka. Laboratorion on kuitenkin hyvä huomioida se, että vaihtelun mittaolosuhteissa tulee kuvastaa laboratorion normaaleja käytäntöjä. Pipettien käytöstä aiheutuva vaihtelu tulee huomioida, mikäli laboratoriossa ei ole käytössä työntekijäkohtaisia pipettejä. Vähintään kahden eri henkilön tulee analysoida testiosat (rinnakkaiset). Mikäli laboratoriossa työskentelee vain yksi henkilö, tulee hänen toistaa mittaukset. Mittaustoistot pitää tehdä yhden päivän aikana. Ainoastaan mikäli mikrobipitoisuuden voidaan osoittaa olevan vakaita, voidaan toistot suorittaa useamman kuin yhden päivän aikana. Teknisten tekijöiden vaihtelun ei tulisi olla sama kaikissa testiosissa.

Laboratorionäytteitä tulee olla vähintään kymmenen ja kunkin testiosuuden tuloksia (y_{IA} ja y_{IB}) käytetään laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonnan laskemiseen.

Laboratorion sisäistä uusittavuutta kuvaava keskihajonta S_{IR} eli tekninen epävarmuus on:

$$u_{tech} = S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{IA} + y_{IB})^2}$$

missä y_{IA} ja y_{IB} ovat pitoisuuksien logaritmiarvoja.

Ruokaviraston internet-sivulla on Excel-taulukko teknisen mittausepävarmuuden laskemiseksi.⁶

2.2.1 Hiukkastilastollinen hajonta (Poissonin jakauma)

Pesäkelaskentaan perustuvissa menetelmissä hiukkastilastollisesta hajonnasta johtuva epävarmuus ($u_{Poisson}$) riippuu laskettavien pesäkkeiden kokonaismäärästä. Epävarmuus on sitä suurempi, mitä pienempi on pesäkeluku.

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

missä

C = pesäkelukumäärä maljalla.

Mikäli $\sum c = 0$, $u_{Poisson} = 0,434$.

⁶ Ruokavirasto (2020) Mittausepävarmuus kvantitatiivisissa mikrobiologisissa määrittelyissä. Mittausepävarmuuslaskuri (14.2.2024 päivitetty versio). <https://www.ruokavirasto.fi/laboratoriopalvelut/vertailulaboratoriot/ohjeita-laboratorioille/menetelma--toiminta--ja-tyoohjeet/>

2.2.2 Varmistuvuuden epävarmuus (u_{conf})

Varmistuvuus on varmistuneiden tapausten ja alustavien positiivisten tapausten suhde. Oletetaan, että alustavia pesäkkeitä on todettu määrä n_p ja niistä osa on varmistettu määrä n_c .

$$u_{conf} = \frac{1}{2,3030} \sqrt{\frac{(n_c + 0,5)(n_p - n_c + 0,5)n_p^2}{(n_p + 1)^2(n_{p+2})n_c^2}}$$

2.2.3 Matriisin mittausepävarmuus (u_{matrix})

Matriisin koostumus ja mikrobien jakautuminen tutkittavassa materiaalissa voivat vaikuttaa mikrobiologisen määrittämisen lopputulokseen. Matriisivaikutuksella eli matriisiepävarmuudella tarkoitetaan tulosten hiukkastilastollisen hajonnan ylittävää vaihtelua, joka johtuu laboratorionäytteen epähomogeenisuudesta (heikosta sekoittamisesta/sekoittuvuudesta). Matriisiepävarmuus ei sisällä mahdollista systemaattista virhettä tai näytteenoton epävarmuutta eli matriisiepävarmuudella tarkoitetaan yksinomaan mikrobien jakautumisesta johtuvaa vaikutusta tulokseen tietyn tyyppisessä matriisissa.

Puhtaan materiaalivaikutuksen määrittäminen edellyttäisi monimutkaisia varianssianalysimalleja, ja siksi koottuja tietoja materiaalien epähomogeenisuudesta ei ole tarjolla. Tämän vuoksi on päädytty määrittelemään matriisivaikutus seuraavasti: matriisivaikutuksella tarkoitetaan samasta laboratorionäytteestä otettujen osanäytteiden tulosten välistä variaatiota toistettavuusoloissa eli laboratorion toistettavuuden keskihajontaa. Näin määritettynä matriisiepävarmuus sisältää myös yhden henkilön suoritukseen liittyvän teknisen epävarmuuden, siis annostelun epävarmuuden ja lukemaepävarmuuden, sekä hiukkastilastollisen hajonnan. Matriisiepävarmuuden ajatellaan olevan riippumaton käytettävästä mikrobiologisesta määrittämenetelmästä sekä laboratorionäytteestä. Kerran tietylle matriisille laskettu matriisiepävarmuus sopii kaikille samasta matriisista tehtäville määrittämisille.

Jos materiaali on erittäin homogeeninen kuten hyvin sekoitetuissa, juoksevilla nesteissä, matriisiepävarmuuden oletetaan olevan pieni. Kuitenkin tiedetään, että luonnollinen mikrobikontaminaatio tietyissä elintarvikkeissa (erityisesti kiinteät, fermentoidut tai prosessoidut elintarvikkeet) ja rehuissa voi olla hyvinkin heterogeeninen ja tästä voi aiheutua merkittävän suuri epävarmuuskomponentti. Näin on asianlaita myös sellaisissa matriiseissa, jotka koostuvat monista erillisistä ainesosista kuten pitsat tai valmisruuat. Samoin tuoreissa pilkotuissa vihanneksissa mikrobikontaminaatio voi olla heterogeeninen.

Laboratorio voi määrittää omien näytetyyppiensä matriisiepävarmuuden laskemalla esim. pesäkeluku- tai enterobakteerimäärittämisen toistettavuuden keskihajonnan.^{3,6} Koska matriisiepävarmuuden määrittäminen tällä tavoin on työlästä johtuen suuresta erilaisten näytetyyppien määrästä, voidaan käyttää myös

kirjallisuudesta saatavia tai omaan aiempaan tai muuhun tietämykseen perustuvia arvoja. Matriisiepävarmuus on ensisijaisesti kiinteissä näytteissä esiintyvä ongelma.

Kirjallisuudessa esitetyt elintarvikematriisien epävarmuusarvot ovat poikkeuksetta ilmaistu lg-asteikossa. Ne voidaan tarvittaessa muuntaa tavallista suhdeasteikkoa vastaaviksi arvoiksi kertomalla luvulla 2,303.

Kirjallisuudessa on esitetty seuraavia matriisiepävarmuuden arvoja, joita voi käyttää monessa tilanteessa:

- Homogeeniset, hyvin sekoitetut matriisit 0,1 log₁₀ pmy/g³
- Homogeeniset, hyvin sekoitetut matriisit 0,2 log₁₀ pmy/g⁷
- Suhteellisen hyvin sekoitetut matriisit 0,4 log₁₀ pmy/g⁷
- Heterogeeniset (huonosti sekoitetut) matriisit 0,8 log₁₀ pmy/g⁷

⁷ van Schothorst, M., Zwietering, M.H., Ross, T., Buchanan, R.L. ja Cole, M.B. (2009) Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives. Food Control, 20(11): 967-979.

2.2.4 Yhdistetyn ja laajennetun epävarmuuden laskeminen

Yhdistetyn standardiepävarmuuden u_c laskeminen menetelmille, joihin ei sisälly pesäkkeiden varmistamista:

$$u_c = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{poisson}^2}$$

Yhdistetyn standardiepävarmuuden laskeminen menetelmille, joihin sisältyy pesäkkeen varmistaminen:

$$u_c = \sqrt{u_{tech}^2 + u_{matrix}^2 + u_{conf}^2 + u_{poisson}^2}$$

Laajennettu epävarmuus 95 % luottamustasolla (U) saadaan kertomalla yhdistetty standardiepävarmuus kattavuuskertoimella 2.

$$U = 2u_c$$

Esimerkki 1. Taulukossa 1 on esitelty Ruokaviraston laboratorion saatu käytännön esimerkki teknisen mittausepävarmuuden (u_{tech}) laskemisesta *L. monocytogenes*in kvantitatiiviselle määrittelylle sisäisen uusittavuuden keskihajonnalla (s_{IR}).

Näytematriisiksi oli valittu sellaisenaan syötävä broilerin fileeviipale. Kaksi laboranttia analysoi näytteet tehden omat alkususpensiot, jotka homogenoitiin ja maljattiin menetelmäohjeen mukaisesti käyttäen eri pipettejä, eri inkubaattoreita sekä valmiina tilattuja tai itse tehtyjä elatusaineita (A ja B testiannos). Alkususpensioon siirrostettiin tietty pitoisuus *L. monocytogenes*ta.

Taulukko 1. Esimerkki *L. monocytogenes*in kvantitatiivisen määrittämisen teknisen epävarmuuden u_{tech} laskemisesta valmiin laskentapohjan avulla.

Näyte # (i)	Testiannos (j)	Laimennoskerroin 1 (d1)	Lasketut pesäkkeet 1 (C1)	Laimennoskerroin 2 (d2)	Lasketut pesäkkeet 2 (C2)	Laskettujen pesäkkeiden määrä ($\sum C_{ij}$)	Pitoisuus pmy/g tai pmy/ml (x _{ij})	Pitoisuuden log 10 pmy/ g tai ml (y _{ij} = log ₁₀ (x _{ij}))	Pitoisuuksien logaritmien erotus (y _{iA} -y _{iB})	logaritmien erotuksen neliö (y _{iA} -y _{iB}) ²
1	A	1	133	1	129	262	1,31E+03	3,11727	-0,0242	0,0006
	B	1	157	1	120	277	1,39E+03	3,14145		
2	A	1	110	1	117	227	1,14E+03	3,05500	-0,0349	0,0012
	B	1	158	1	88	246	1,23E+03	3,08991		
3	A	1	68	1	42	110	5,50E+02	2,74036	-0,0889	0,0079
	B	1	85	1	50	135	6,75E+02	2,82930		
4	A	1	63	1	57	120	6,00E+02	2,77815	0,1061	0,0112
	B	1	46	1	48	94	4,70E+02	2,67210		
5	A	1	73	1	56	129	6,45E+02	2,80956	0,1283	0,0165
	B	1	54	1	42	96	4,80E+02	2,68124		
6	A	1	104	1	63	167	8,35E+02	2,92169	-0,1016	0,0103
	B	1	122	1	89	211	1,06E+03	3,02325		
7	A	1	42	1	52	94	4,70E+02	2,67210	-0,0181	0,0003
	B	1	60	1	38	98	4,90E+02	2,69020		
8	A	1	140	1	168	308	1,54E+03	3,18752	0,1941	0,0377
	B	1	94	1	103	197	9,85E+02	2,99344		
9	A	1	112	1	129	241	1,21E+03	3,08099	0,0788	0,0062
	B	1	93	1	108	201	1,01E+03	3,00217		
10	A	1	96	1	128	224	1,12E+03	3,04922	0,3960	0,1568
	B	1	54	1	36	90	4,50E+02	2,65321		

Keskiahjonnan kaavaa käyttäen saadaan

$$u_{tech} = S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} + y_{iB})^2} = 0,1115$$

Tekniseksi epävarmuudeksi u_{tech} eli laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonnaksi s_{IR} saatiin 0,1115.

2.3 Kokonaismittausepävarmuuden laskeminen elintarvikkeille komponenttiperiaatteella

Komponenttiperiaatteella määritetyn yhdistetyn kokonaisepävarmuuden arvio koostetaan analyysiä edustavista, etukäteen määritellyistä operatiivisista (teknisistä) komponenteista, joihin lisätään pesäke- tai MPN-menetelmästä riippuva jakaumaepävarmuus. Lopullisen testituloksen yhdistetty suhteellinen epävarmuus $u_{c,rel}$ saadaan laskemalla teknisen epävarmuuden $u_{o,rel}$ ja luontaisen jakaumaepävarmuuden $u_{d,rel}$ neliösumman neliöjuuri.

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

Laajennettu epävarmuus 95 % luottamustasolla saadaan vastaavalla tavalla kuin edellä on kuvattu eli kertomalla yhdistetty epävarmuus kattavuuskertoimella 2.

3 Kvantitatiivisten vesimikrobiologisten menetelmien mittausepävarmuuden arviointi

Viljelyyn perustuvissa vesimikrobiologisissa menetelmissä itse vesinäyte toimii lähtösuspensiona. Sitä voi olla tarpeen laimentaa mikrobipitoisuudeltaan sopivan päätesuspension saamiseksi. Jos laimennusta ei tarvita, näyte palvelee myös päätesuspensiona.

Päätesuspensiosta siirretään tilavuudeltaan tunnettuja, mitattuja koeannoksia yksinkertaisimmillaan yksittäiselle petrimaljalle, mutta usein samasta tai eri laimennoksista koostuvalle maljasarjalle (havaitsemisinstrumentti). Koeannokset voidaan siirtää myös yhden tai usean laimennoksen todennäköisimmän lukumäärän (MPN) instrumenttiin.

Mikrobiologinen analyysiprosessi koostuu viidestä tai kuudesta vaiheesta:

1. osanäytteen otto ja sekoitus,
2. laimennus,
3. koeannosten siirrostus elatusalustoista koostuvaan havaitsemisinstrumenttiin,
4. inkuboinnin kulku,
5. (pesäke)laskenta,
6. mahdollinen kohdeorganismien (alustavien) tulosten varmistus.

Tekninen (operatiivinen) vaihtelu koostuu näiden vaiheiden vaikutuksista. Komponenttiperiaatetta käytettäessä kukin niistä arvioidaan erikseen.

Lopputuloksen mittausepävarmuutta laskettaessa tekniseen epävarmuuteen lisätään laskettavien mikrobihiukkasten satunnainen vaihtelu suspensiossa (käytetään myös nimityksiä luontainen vaihtelu, hiukkastilastollinen hajonta, jakaumaepävarmuus).

Yhdistetty mittausepävarmuus saadaan laskemalla teknisen epävarmuuden ja hiukkassuspension ominaisen vaihtelun neliösumman (suhteellisten varianssien summan) neliöjuuri.

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

missä

$u_{c,rel}(y)$ = yhdistetty suhteellinen standardiepävarmuus

$u_{o,rel}$ = suhteellinen tekninen vaihtelu (kokeellinen, suhteellinen standardiepävarmuus)

$u_{d,rel}$ = suhteellinen ominaisvaihtelu (suhteellinen jakaumaepävarmuus).

Tekninen vaihtelu on yhdistelmä kaikista analyysiprosessin teknisiin vaiheisiin liittyvistä epävarmuuksista, ja systemaattisen virheen osatekijät sulautuvat satunnaiseen vaihteluun.

Luontainen vaihtelu on väistämätöntä vaihtelua ilman näkyvää syytä. Se liittyy hiukkasjakaumaan päätesuspensiossa ja havaitsemisinstrumentissa. Mikrobisuspensioissa sen uskotaan noudattavan Poisson-jakaumaa. Koetuloksen osittainen varmistaminen tai MPN-menetelmän käyttö lisäävät huomattavasti luontaista vaihtelua, eikä se silloin enää noudata Poisson-jakaumaa. Luontaisen vaihtelun vaikutusta voidaan pienentää rinnakkaismaljojen avulla tai lisäämällä rinnakkaisputkien määrää MPN-määrityksissä.

3.1 Teknisen epävarmuuden arviointi

Mittausepävarmuus määritetään tai arvioidaan laboratorion sisäisissä uusittavuusolosuhteissa, jolloin mittauksen epävarmuuskomponentit ovat tunnistettavissa. Luonnollisilla näytteillä tehtävät kokeet ovat oleellisia tässä arvioinnissa.

Komponenttiperiaatetta sovellettaessa yksittäisten epävarmuuteen vaikuttavien tekijöiden vaikutukset arvioidaan erikseen ja ne yhdistetään matemaattisesti olettaen, että ne ovat toisistaan riippumattomat. Laskennallisesti se tarkoittaa neliöjuuren ottamista summasta, jonka termit ovat toiseen potenssiin korotettuja epävarmuustekijöiden arvoja.

Mikrobiologisten kvantitatiivisten määritysten epävarmuus ennen päätesuspensiota koostuu osanäyte- ja matriisivaihtelusta sekä laimentamisen ja koeannoksen mittaamisen vaihteluista. Näiden tekijöiden vaikutukset siirtyvät päätesuspension keskiarvon yhdistettyyn mittausepävarmuuteen suhteellisina. Päätesuspensiolle ominainen vaihtelu koostuu suspension hiukkasten sattumanvaraisesta hajonnasta. Yhdessä maljan pesäkkeiden hajonnan ja mahdollisen osittaisen varmistuksen epävarmuuden kanssa ne muodostavat luontaisen vaihtelun. Luontainen vaihtelu ei ole osa teknistä vaihtelua. Päätesuspension jälkeiset vaihtelun aiheet liittyvät tulosten lukemisen epävarmuuteen ja mahdollisiin inkubointiajasta ja -ympäristöstä johtuviin vaikutuksiin.

Matriisin ja osanäytteen, laimennuskertoimen ja koeannoksen epävarmuudet ovat lähes riippumattomia menetelmästä ja suorittajasta, mutta saattavat riippua välineistä ja materiaalista. Kerran määritettyä epävarmuusarvoa voidaan käyttää toistuvasti sekä eri menetelmissä. Inkuboinnin epävarmuus riippuu olosuhteista (lämpötila, happi- ja kosteuspitoisuus ja aika) sekä kohdeorganismista, muttei suorittajasta. Tuloksen lukemisen epävarmuus puolestaan riippuu suorittajasta tai lukemiseen käytetystä välineistöstä.

Vesinäytteissä osanäytteiden välinen varianssi ei yleensä nouse merkittävästi Poisson-jakauman varianssia suuremmaksi, joten sitä ei tarvitse huomioida mittausepävarmuutta arvioitaessa. Teknistä epävarmuutta arvioitaessa huomioidaan yleisen käytännön mukaisesti laimennuskerroin, koeannos (siirrostamisen epävarmuus) ja tuloksen lukeminen.

3.1.1 Tilavuusmittausten toistettavuus ja laboratorion sisäinen uusittavuus

Tilavuuden mittalaitteiden (pipetti, mittalasi ym.) täsmällisyys (eli mittaustulosten hajonta niitä toistettaessa) voidaan selvittää punnitsemalla ionivaihdettua vettä ja laskemalla tavanomaisia tilastokaavoja käyttäen tulossarjojen keskiarvot ja keskihajonnat. Tähän tarvitaan vähintään 20 mittauksen sarja. Aseptisen työskentelyn simuloimiseksi kutakin yksittäistä mittausta varten on vaihdettava uusi pipetti tai kärki.

Analysoimalla kahden tai useamman henkilön mittaukset yhtenä aineistona saadaan keskihajonnan arvio, jota voi kutsua laboratorion sisäiseksi uusittavuuskeskihajonnaksi (uusittavuudesta aiheutuva standardiepävarmuus). Tämä sisältää mahdolliset henkilöiden väliset systemaattiset erot. Suhteellinen standardiepävarmuus (u_{rel}) saadaan jakamalla keskihajonta keskiarvolla.

Taulukossa 2 on esitetty esimerkki kahden pipetin uusittavuuden laskennasta. Laboratorio käyttää kahta pipettiä, toista 1 ml ja toista 0,1 ml tilavuusmittauksiin. Se on kerännyt vuoden aikana koko henkilöstönsä vuorotellen viikoittain tekemien seurantapunnitusten (n) tiedot ja laskenut niiden avulla tilavuuksien standardiepävarmuudet (u ja u_{rel}).

Taulukko 2. Esimerkki pipettien uusittavuuden laskennasta.

Pipetin tunnus	P20	P09
Käyttötilavuus	1,0 ml	0,1 ml
n	49	47
ka	0,99977 ml	0,09960 ml
s	0,00224 ml	0,00056 ml
u	0,00224 ml	0,000565 ml
u_{rel}	0,22 %	0,57 %

3.1.2 Koeannosten tilavuuksien summan suhteellinen epävarmuus

Koeannosten tilavuuksien summan mittausepävarmuutta tarvitaan laskettaessa epävarmuusarvoa kohdeorganismien pitoisuudelle päätesuspensiossa sellaisissa tapauksissa, joissa detektioinstrumentti koostuu monesta maljasta yhdessä tai useammassa laimennoksessa.

Yksi laimennus, yhtä suuret koeannokset

Yleensä rinnakkaismaljojen koeannosten tilavuudet ovat yhtä suuret. Jos tilavuuden mittalaitteen epävarmuus on ilmoitettu suhteellisenä, esimerkiksi prosenteissa, lasketaan tilavuuksien summan epävarmuus myös prosenteissa jakamalla yhden mittauksen epävarmuus rinnakkaisten lukumäärän neliöjuurella.

$$u_{rel,\Sigma V} = \frac{u_{rel,V}}{\sqrt{n}}$$

missä

n = rinnakkaisten maljojen lukumäärä

$u_{rel,V}$ = yhden koeannoksen suhteellinen mittausepävarmuus.

Esimerkki 2. Suspensiosta on viljelty kaksi rinnakkaismaljaa, käytetty siirrostilavuus on 1,0 ml. Sille on aiemmin laskettu suhteelliseksi epävarmuudeksi 0,0022.

$$u_{rel,\Sigma V} = \frac{0,0022}{\sqrt{2}} = 0,0016 \text{ tai } 0,16 \%$$

Kaksi laimennusta

Oletetaan, että tulos perustuu pesäkelukumääriin n_0 maljasta päätelaimennusta ja n_1 maljasta toista laimennusta, joka on saatu laimentamalla päätelaimennus vielä f -kertaisesti. Päätesususpension tilavuutena ilmaistu koeannosten yhteenlaskettu tilavuus on

$$\sum V = n_0 V_0 + \frac{1}{f} n_1 V_1$$

missä

n_0 = päätesuspensiosta viljeltyjen rinnakkaisaljien lukumäärä

V_0 = päätesuspensiosta mitattujen koeannosten tilavuus

f = laimennuskertoimen

n_1 = toisesta laimennoksesta viljeltyjen rinnakkaisaljien määrä

V_1 = toisesta laimennoksesta mitattujen koeannosten tilavuus.

Tyypillisesti rinnakkaisten määrät ja siirrostilavuudet ovat samat molemmissa laimennoksissa, joten $n_0 = n_1 = n$ ja $V_0 = V_1 = V$. Silloin yhtälö koeannosten tilavuuksien summan suhteellisen mittausepävarmuuden laskemiseksi on

$$u_{\text{rel},\Sigma V}^2 = \frac{1}{(f+1)^2} \left[\frac{u_{\text{rel},V}^2}{n} (f^2 + 1) + u_{\text{rel},f}^2 \right]$$

missä

f = laimennuskertoimen

n = laimennoksen rinnakkaisaljien lukumäärä

V = siirroksen tilavuus maljaa kohti

$u_{\text{rel},V}$ = siirrostilavuuden suhteellinen mittausepävarmuus

$u_{\text{rel},f}$ = laimennuskertoimen suhteellinen epävarmuus.

MPN-tulokset

Usein MPN-systeemit siirrostetaan siten, että yksi mitattu suuri koeannos (esimerkiksi 100 ml) jakautuu kerralla useisiin kasvukennoihin. Kokonaistilavuuden mittausepävarmuus määritetään kohdan 4.1.1 Laimennussarja- ja suoraviljelymenetelmät mukaisesti.

3.1.3 Laimennuskertoimen suhteellinen epävarmuus

Laimennuskertoimen saattaa koostua useista peräkkäisistä portaista

$$F = f_1 f_2 \dots f_x$$

Jokaisen vaiheen mittausepävarmuus (varianssi) arvioidaan laskemalla

$$u_{\text{rel},f}^2 = \left(\frac{V_b}{V_a+V_b}\right)^2 (u_{\text{rel},a}^2 + u_{\text{rel},b}^2)$$

missä

V_a = mikrobisuspensiosta siirretty tilavuus

V_b = laimennusnesteannoksen tilavuus

$u_{\text{rel},a}$ = siirretyn tilavuuden suhteellinen mittausepävarmuus

$u_{\text{rel},b}$ = laimennusnesteannoksen tilavuuden suhteellinen mittausepävarmuus.

Koko sarjan laimennuskertoimen suhteellinen varianssi on yksittäisten suhteellisten epävarmuuksien neliösumma

$$u_{\text{rel},F}^2 = u_{\text{rel},f_1}^2 + u_{\text{rel},f_2}^2 + \dots + u_{\text{rel},f_k}^2$$

Esimerkki 3. Näyte tutkittiin valmistamalla siitä laimennussarja, jossa käytetyt tilavuudet olivat 1 ml + 9 ml. Laimennoksista viljeltiin kaksi rinnakkaismaljaa 1 ml siirroksin. Pesäkkeet laskettiin laimennuksista 10^{-3} ja 10^{-4} .

Koeannosten yhteistilavuus päätesuspension tilavuutena ilmaistuna oli $\Sigma V = 1 \text{ ml} + 1 \text{ ml} + 0,1 \text{ ml} + 0,1 \text{ ml} = 2,2 \text{ ml}$

Eri tilavuusmittausten epävarmuudet olivat:

mittaus 1 ml, epävarmuus $u_{\text{rel},V} = 0,0022$ ja mittaus 9 ml, $u_{\text{rel},V} = 0,02$

Lisälaimennuksen (laimennuskertoimen) suhteellinen epävarmuus:

$$u_{\text{rel},f}^2 = \left(\frac{9}{10}\right)^2 (0,0022^2 + 0,02^2) = 0,000328$$

Tilavuussumman laskemiseen tarvittavat tiedot ovat $V = 1 \text{ ml}$, $f = 10$, $n = 2$, $u_{\text{rel},f}^2 = 0,000328$ ja $u_{\text{rel},V}^2 = 0,0000484$.

Koeannosten summan suhteellinen varianssi:

$$u_{\text{rel},\Sigma V}^2 = \frac{1}{(10+1)^2} \left[\frac{0,00000484}{2} (100+1) + 0,000328 \right] = 0,00000473$$

Tilavuuksien summan suhteellinen epävarmuus on

$$u_{\text{rel},\Sigma V} = \sqrt{0,00000473} = 0,00218$$

Esimerkki 4. Näytettä, joka toimii lähtösuspensiona, laimennettiin useissa vaiheissa käyttäen tilavuuksia 1 ml + 9 ml. Sopivat pesäkemäärät laskettiin laimennuksista 10^{-3} ja 10^{-4} . Ensimmäinen laimennus, jossa oli laskettava määrä pesäkkeitä (10^{-3}), käsitettiin päätesuspensioksi.

Laboratorion laadunvarmistustulosten ja valmistajan antamien tietojen perusteella tilavuusmittausten suhteelliset epävarmuudet ovat 1 ml 0,0022 ja 9 ml 0,02.

Eri laimennusvaiheiden suhteelliset epävarmuudet:

$$u_{\text{rel},f}^2 = \left(\frac{9}{1+9}\right)^2 (0,0022^2 + 0,02^2)$$

$$u_{\text{rel},f}^2 = 0,000328$$

Kaikki laimennusvaiheet f_1 , f_2 ja f_3 olivat samanlaisia. Joten

$$u_{\text{rel},F}^2 = 0,000328 + 0,000328 + 0,000328 = 0,000984$$

Laimennuskertoimen suhteellinen mittausepävarmuus on

$$u_{\text{rel},F} = \sqrt{0,000984} = 0,0314 \approx 3,1 \%$$

3.1.4 Lukemisepävarmuus

3.1.4.1 Pesäkelaskentamenetelmät

Maljan pesäkkeiden määrän laskeminen on kvantitatiivisessa mikrobiologiassa usein yksi merkittävistä epävarmuuskomponenteista. Henkilö pystyy yleensä toistamaan oman laskentansa muutaman prosentin täsmällisyydellä, mutta eri henkilöiden tulokset voivat sopia huomattavasti yhteen. Tämä lisää laboratorion sisäisesti laskentatulosten epävarmuutta.

Parametrin arvoja arvioidaan luettamalla samoja maljoja eri henkilöillä tai antamalla saman henkilön lukea samoja maljoja toistuvasti. Näytteiden pitäisi olla tavallisia rutiininäytteitä ja maljoja pitäisi valita toistolaskuihin satunnaisesti sen jälkeen, kun ensimmäiset tulokset on jo luettu. Ongelmatapauksia pitäisi ottaa mukaan vain sen verran kuin niitä tulee satunnaisessa valinnassa vastaan.

Henkilökohtaiset erot korostuvat, kun kohdepesäkkeiden tunnistus edellyttää valintaa ulkonäön (muoto, väri, koko) perusteella muiden pesäkkeiden muodostamasta taustasta. Tämän vuoksi epävarmuuden arvo riippuu paitsi henkilöstä myös menetelmästä ja mahdollisesti näytetyypistä. Laskentatuloksen toistettavuus ja sen uusittavuus ovat merkityksellisiä tunnuslukuja: toistettavuus pitää mahdollisesti ottaa huomioon sisäisessä laadunvarmistustyössä ja uusittavuutta tarvitaan muodostettaessa yhdistettyä mittausepävarmuutta komponenttiperiaatteella.

Laboratorion sisäistä uusittavuutta voidaan tutkia luettamalla samat maljat useilla tai kaikilla laboratorion henkilökuntaan kuuluvilla. Kaikki henkilöiden väliset

systemaattiset erot sisältyvät epävarmuusestimaattiin kuin ne olisivat satunnaista vaihtelua.

Yhteenlaskettu pesäkemäärä on tarpeen, kun lasketaan testitulosta maljasarjan havaintojen perusteella. Toistaiseksi suositellaan käytettäväksi samaa arvoa yhden pesäkeluvun ja pesäkelukujen summan lukemisen suhteellisen epävarmuutena.

3.1.4.2 MPN-menetelmät

MPN-menetelmissä positiivisten tulosten lukeminen on yleensä toistettavampaa kuin pesäkkeiden laskeminen. Toisaalta hyvin vähäistenkin lukemaerojen vaikutukset suurentuvat MPN-arvoissa.

Laboratorion sisäistä tulosten luvun uusittavuutta MPN-menetelmillä voidaan tutkia päivittäisen rutiinin yhteydessä antamalla eri henkilöiden lukea samojen sarjojen tulokset. Varsinaisesti lukemisen epävarmuuden vaikutus näkyy MPN-tuloksissa. Epävarmuuslaskut tehdään MPN-arvoilla.

Esimerkki 5. Taulukossa 3 on esitetty koliformimäärityksen yhdistetty mittausepävarmuus viidelle MPN-luvulle, joka on arvioitu 51-kuoppaisella Quanti-Tray MPN:llä. MPN-luvun 95 % luotettavuuden lisäksi laskuissa on huomioitu lukemaepävarmuus 11,64 % ja 100 ml:n tilavuusmittauksen epävarmuus 1,0 %.

Taulukko 3. Koliformisten bakteerien MPN-tulosten yhdistetty epävarmuus.

MPN-luku	95 % luotettavuus alaraja	95 % luotettavuus yläraja	jakauma-epävarmuus	jakauma-epävarmuus %	lukema epävarmuus	tilavuus-epävarmuus	neliösumma	yhdistetty MU neliösumman neliöjuuri	yhdistetty MU %
1	0,3	5,6	0,747	74,7	0,1164	0,01	0,571	0,756	75,6
10	5,3	18,8	0,323	32,3	0,1164	0,01	0,118	0,343	34,3
50	35,4	72,5	0,183	18,3	0,1164	0,01	0,047	0,217	21,7
100	73,1	146	0,176	17,6	0,1164	0,01	0,045	0,212	21,2
200	135,8	387,6	0,268	26,8	0,1164	0,01	0,085	0,292	29,2

3.2 Luontainen vaihtelu

3.2.1 Pesäkemäärän suhteellinen jakaumaepävarmuus

Luontainen vaihtelu riippuu keskimääräisestä hiukkasten tai pesäkkeiden lukumäärästä viljeltyä koeannosta kohti. Päätesusensioiden voi katsoa olevan niin hyvin sekoittuneita, että niistä otettujen koeannosten hiukkasmäärät noudattavat Poisson -jakaumaa.

Kun samasta päätesusensiosta otetaan useita koeannoksia, bakteeripitoisuuden arvio lasketaan jakamalla kaikkien pesäkemäärien summa

koeannosten tilavuuksien summalla. Luontainen vaihtelu on kääntäen verrannollinen pesäkkeiden summaan. Suhteellinen varianssi lasketaan kaavasta

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

missä $\sum n_{ci}$ on havaittu pesäkkeiden kokonaismäärä.

3.2.2 MPN-estimaattien luontainen vaihtelu

Tavalliset MPN-taulukot eivät anna suoraan MPN-arvojen epävarmuutta vaan 95 % luottamusvälin ylä- ja alarajat. Niistä voi laskea epävarmuuden. Suhteellinen standardiepävarmuus on

$$u_{d,rel} \approx \frac{\ln T_1 - \ln T_0}{3,92} = 2,3026 \times \frac{\lg T_1 - \lg T_0}{3,92}$$

missä

T_0 = 95 % luottamusvälin alaraja

T_1 = 95 % luottamusvälin yläaraja.

Suhteellinen varianssi saadaan korottamalla $u_{d,rel}$ toiseen potenssiin.

4 Asumisterveysmenetelmien mittausepävarmuuden arviointi

4.1 Asumisterveysmikrobiologian menetelmät

Asumisterveysasetuksen soveltamisohjeen⁸ mukaan toimenpideraja ylittyy, jos asetuksessa tarkoitettujen altisteiden kuten mikrobien numeeriset arvot ylittävät mittausepävarmuus huomioon ottaen. Laboratorion on siksi oltava valmis esittämään asiakkaalleen selvitys analyysitulokseen liittyvästä epävarmuudesta. Mittausepävarmuus tulee antaa numeerisena silloin, kun se on mahdollista ja sanallisena selvityksenä silloin, kun numeerisen epävarmuuden määrittäminen ei ole mahdollista.

Laimennussarjamenetelmän tulosten tulkinnassa on otettava huomioon menetelmän tekninen mittausepävarmuus mutta myös muut tuloksen luotettavuuteen vaikuttavat tekijät.⁸ Laboratorio-oppaan⁹ mukaan laboratorio voi määritellä itse, ilmoittaako se ainoastaan teknisen epävarmuuden vai sisällyttääkö se epävarmuusarvioonsa myös hiukkastilastollisen epävarmuuden.

Asumisterveysasetuksen ja sen soveltamisohjeen ilmestymisen jälkeen ovat astuneet voimaan vesimikrobiologian mittausepävarmuutta käsittelevä standardi SFS-ISO 29201:2017⁴ ja vastaava elintarvikemikrobiologian standardi SFS-EN ISO 19036:2019³.

Laboratorioissa yleisesti käytössä olevan laimennussarjamenetelmän tuloksen teknisen mittausepävarmuuden arvioinnin lähestymistavaksi on valittu ns. komponenttiperiaate. Sen kuvaamisessa on sovellettu vesimikrobiologian standardin SFS-ISO 29201:2017 menettelyjä, symboleja ja laskukaavoja sekä käytetty luonnollisia aineistoja. Yhtä hyvin voidaan soveltaa elintarvikemikrobiologian standardin SFS-EN ISO 19036:2019 menettelyä ja Ruokaviraston laskuria⁶, joita on kuvattu kohdassa 3. Tällöin arvioidaan sisäinen uusittavuus. Ajatuksena on arvioida, missä rajoissa laboratorion tulos olisi saattanut vaihdella, jos sen olisikin tuottanut toinen henkilö mahdollisesti eri välineitä ja kasvualustaeriä tai eri viljelyolosuhteita käyttäen. Saatu epävarmuus ei siis liity itse analyysitulokseen, vaan sen arvioidaan edustavan yleistä vaihtelua, joka on mahdollista käytettäessä ko. menetelmää. Menettelyn käyttö edellyttää hyvää näkemystä merkityksellisistä tulokseen vaikuttavista tekijöistä sekä suunnitelmaa niiden uskottavaksi vaihtelemiseksi. Suoraviljelyn, suoramikroskopian ja Andersen-ilmanäytteen tulosten tekninen epävarmuus on

⁸ Valvira (2016) Asumisterveysasetuksen soveltamisohje. Valviran ohje 8/2016, osa IV, 2016.
<https://www.valvira.fi/documents/14444/261239/Asumisterveysasetuksen+soveltamisohje+osa+IV.pdf/cdfaaa39-d2e5-4bd6-b9e9-6d9c0f60bff6>

⁹ Pessi, A-M. ja Jalkanen, K. (2018) Laboratorio-opas. Mikrobiologisten asumisterveys-tutkimusten näytteenotto ja analyysimenetelmät. Suomen Ympäristö- ja Terveysalan kustannus Oy. ISBN 978-952-9637-61-4. 76 sivua.

esitetty pesäke- tai hiukkaslaskennan epävarmuutena. Teknisten epävarmuuskomponenttien arviot saadaan koostettua laboratorion sisäisen laadunvarmistuksen toistettavuus- ja uusittavuustesteistä.

Asumisterveysasetuksen soveltamisohjeessa ja Laboratorio-oppaassa on kuvattu rakennusmateriaalinäytteestä otettavan osanäytteen valintaperiaatteet ja osanäytteen käsittely. Osanäytteiden välistä vaihtelua eli matriisivaikutusta ko. testimateriaalin tulokseen voidaan testata SFS-ISO 29201:2017 liitteessä H kuvatulla testijärjestelyllä tai käyttäen Ruokaviraston sivuilta löytyvää, standardiin SFS-EN ISO 19036:2019 perustuvaa laskuria⁶. Kohdassa 3.2.3. on käsitelty elintarvikematriisien aiheuttamaa epävarmuutta testaustulokseen. Tässä oppaassa on asumisterveysmikrobiologian osalta päädytty siihen, että matriisiepävarmuutta ei ainakaan rutiininomaisesti oteta huomioon yhdistetyn mittausepävarmuuden laskemisessa.

Varsinaisen analyysituloksen epävarmuuslaskelmien lisäksi laboratorion tulee arvioida ja kuvata suorittamaansa näytteenottoon, näytteen kuljettamiseen ja säilyttämiseen sekä osanäytteenottoon vaikuttavat epävarmuustekijät. Laboratorion tulee sisäisesti ohjeistaa hyväksyttävät menettelyt ja seurata niiden oikeellisuutta esim. tavoilla, joita on kuvattu mm. Laboratorio-oppaassa.

4.1.1 Laimennussarja- ja suoraviljelymenetelmät

Laimennussarjamenetelmässä punnittu osanäyte ja siihen lisätty laimennusliuos käsitellään ultraäänihauteessa ja ravistelijassa. Näytesuspensiosta (=lähtösuspensio) valmistetaan laimennussarja/rinnakkaiset laimennussarjat, jonka eri laimennuksista viljellään käytetyille elatusainemaljoille 0,1 ml mikrobisuspensiota näytteen mikrobipitoisuuden määrittämiseksi. Kasvualustojen pesäkemäärät lasketaan inkuboinnin jälkeen.

Mittaustulokseen liittyvä tekninen vaihtelu koostuu eri analyysivaiheiden vaihtelusta. Laimennussarjaviljelyn mittausepävarmuuden arvioinnissa komponenttiperiaatteella arvioidaan erikseen kunkin yksittäisen teknisen suorituksen epävarmuuden suuruus laboratorion sisäisistä uusittavuustuloksista. Epävarmuuskomponentit yhdistetään lopuksi laboratorion yhdistetyksi tekniseksi mittausepävarmuusarvioksi.

Laimennussarjamenetelmä koostuu yleensä seuraavista vaiheista:

- osanäytteen otto ja käsittely,
- laimennussarjan valmistaminen,
- siirrostus laimennussarjan valituista laimennustasoista kasvualustamaljoille,
- kasvualustojen inkubointi,
- pesäkkeiden laskenta.

Kolmen ensimmäisen vaiheen epävarmuudet ovat lähes menetelmästä (M2, DG18, THG) ja suorittajasta riippumattomia, mutta niihin voivat vaikuttaa erityisesti välineet ja materiaalit. Viljelyolosuhteita hallitaan inkubointilämpötilan ja sen tasaisuuden seurannalla, kasvualustojen sijoittelulla ja varovaisella käsittelyllä sekundääripesäkkeiden muodostumisen estämiseksi. Inkuboinnin aiheuttamaa

epävarmuutta testaustulokseen ei tässä oppaassa ole huomioitu teknisen epävarmuuden laskemisessa. Standardissa SFS-ISO 29201:2017 on siihen ohje (Liite M). Pesäkelaskennan epävarmuus riippuu suorittajasta tai tuloksen lukemiseen käytetystä välineistöstä. Se on yleensä merkityksellisin teknisen suorituksen epävarmuustekijä.

Lopputuloksen mittaasepävarmuutta laskettaessa tekniseen epävarmuuteen voidaan lisätä laskettavien mikrobihiukkasten satunnainen vaihtelu suspensiossa (käytetään myös nimityksiä luontainen vaihtelu, hiukkastilastollinen hajonta, jakaumaepävarmuus).

Suoraviljelymaljojen pesäkemäärien luokittelu edellyttää käytännössä pesäkelaskentaa tai ainakin kehittyntä havainnointia pesäkkeiden määrätä maljalla. Pesäkkeiden laskennasta aiheutuu laboratoriokohtainen lukemaepävarmuus kuten laimennussarjamenetelmässä. Pesäkelaskennan toistotarkkuus voidaan esittää joko pesäkkeiden lukemisepävarmuutena tai arvioimalla tulosten suhteellisen luokittelun toistotarkkuutta eri suorittajien välillä. Epävarmuusarviot toteutetaan menetelmäkohtaisesti (M2, DG18, THG). Tarkasteltavia kasvualustoja pitää olla ainakin niistä rakennusmateriaaleista, joita laboratorio tyypillisesti tutkii. Laimennusviljelyssä, toisin kuin suoraviljelyssä, mikrobipitoisuus pyritään laimentamalla saattamaan pesäkelaskennan kannalta optimaaliseksi, joten sen pesäkelaskennan tuloksia ei voi hyödyntää.

Suoraviljelyn osanäytteen (0,5 ml) annosteluun liittyy epävarmuutta. Huomioiden koko menetelmän ”suhteellisuus”, se voidaan kuitenkin epävarmuuslaskemissa jättää huomioimatta.

4.1.2 Sienten ja aktinomykeettien tunnistus

Sienten ja aktinomykeettien tunnistamistulosta laimennus- tai suoraviljelytekniikalla määritetyistä mikrobeista käytetään tietyissä tapauksissa analyysituloksen tulkinnassa, joten tunnistusmenetelmän epävarmuus on arvioitava. Kvalitatiiviselle tulokselle ei varsinaista mittaasepävarmuusarvoa kvantitatiivisen menetelmän tavoin voida numeerisesti laskea. Tunnistuksen epävarmuutta kuvaamaan voidaan käyttää laboratorion virhetunnistuksen todennäköisyyttä ja siten riskiä tuloksen virheelliseen tulkintaan. Epävarmuusarviointiin sisällytetään laboratorion arviot siitä, millaisia epävarmuuslähteitä tunnistukseen liittyy.

4.1.3 Suoramikroskopiointi

Suoramikroskopiointin tulos on mikroskopiijan kuvaus mikroskooppipreparaatista laskettujen sienirihmojen, sieni-itiöiden, itiöaggregaattien ja muiden sienirakenteiden esiintymisestä.⁹

Suoramikroskopiointin epävarmuutta hallitaan ohjeistamalla yksityiskohtaisesti mikroskooppipreparaatin teko, mikroskopiointin suorittaminen ja tuloksen tulkinta. Laskentatuloksen epävarmuutta voidaan arvioida tarkasteluttamalla samoja

luonnollisista näytteistä valmistettuja preparaatteja toistamiseen tai useammalla henkilöllä. Tällaisista laadunvarmistuksista saadaan henkilön tai henkilöiden laskemistulosten hajonta-arvoja vastaavalla tavalla kuin viljelymenetelmien pesäkelaskennasta.

4.1.4 Andersen-ilmanäyte

Akkreditoinnin näkökulmasta Andersen-keräimellä otetun ilmanäytteen tulokseen liittyvä epävarmuus pitää arvioida, vaikka tulos ei yksin johdakaan toimenpiteisiin.

Ilman mikrobipitoisuuden määrittäminen Andersen-keräimellä on MPN-systeemi, jossa yksi koeannos tutkittavaa ilmaa jakaantuu kuudelle kasvualustamaljalle keräysvaiheissa 1-6. Tuloksen epävarmuuteen vaikuttavat tekniset tekijät kuten laboratorio- ja menetelmäkohtainen pesäkelaskennan epävarmuus eri kasvualustoilla ja Andersen-keräimeen liitettyjen pumppujen ilmavirtauksen oikeellisuus.

4.2 Teknisen epävarmuuden arviointi

Mittaustuloksen tekninen epävarmuus arvioidaan luonnollisten näytteiden analysointiolosuhteissa ja tavanomaisilla välineillä. Näin on helpompi tunnistaa eri epävarmuuskomponentit ja määrittää niiden todellinen vaikutus yhdistettyyn tekniseen epävarmuuteen.

Yksittäisten epävarmuuteen vaikuttavien teknisten tekijöiden suuruudet arvioidaan erikseen ja ne yhdistetään matemaattisesti. Laskennallisesti se tarkoittaa neliöjuuren ottamista summasta, jonka termit ovat toiseen potenssiin korotettuja epävarmuustekijöiden arvoja. Yksittäisen tekijän epävarmuuden suuruus voi jatkotoimenpiteenä johtaa sen roolin painottumiseen epävarmuusseurannassa ja laadunvarmistuksessa tai siitä voidaan luopua merkityksettömän pienenä.

4.2.1 Laimennussarjamenetelmän tekninen epävarmuus

Esimerkki 6. Rakennusmateriaalinäytteen sieni-, bakteeri- ja aktinomykeettipitoisuus määritetään seuraavasti:

- 1) 1 gramman osanäyte punnitaan ja siihen lisätään 9 millilitraa laimennusliuosta (10^{-1}).
- 2) Lähtösuspension (homogenaatin) valmistamisessa voidaan käyttää myös muita suhteita esim. laimennusliuosta imevillä eristevillanäytteillä 1 g + 99 ml tai 2 g + 198 ml. Epävarmuusarvot määritetään käytetyille tilavuuksille.
- 3) Jatkolaimennokset ovat 0,5 ml + 4,5 ml.
 - a. Pintanäyte otetaan nesteeseen (=lähtösuspensio), josta jatkolaimennukset tehdään yleensä 1 ml + 9 ml.

- 4) Kasvualustoille siirrostetaan lähtösuspensiosta ja kustakin laimennustasosta 0,1 ml.
- 5) Laskettavia pesäkkeitä muodostuu rinnakkaisilla kasvualustoilla laimennustasoilla 10^{-3} ja 10^{-4} .

Epävarmuuskomponenttien arvot on jatkossa käsitelty suhteellisten standardiepävarmuuksien (u_{rel}) neliöarvoina u_{rel}^2 eli suhteellisina variansseina laskutoimitusten yksinkertaistamiseksi.

Mikäli lähtösuspensiosta 10^{-1} valmistetaan rinnakkaiset laimennussarjat, huomioidaan näiden annosteltujen tilavuuksien epävarmuus kokonaisepävarmuudessa.

4.2.1.1 Osanäytteen punnituksen epävarmuus

Esimerkki 7. Laboratorio käynnistää rakennusmateriaalinäytteen laimennussarjaviljelyn punnitsemalla 1 g:n osanäytteen. Osanäytteen punnitukseen käytetyn vaa'an kalibrointitodistuksen mukaan vaa'an kalibroinnin laajennettu epävarmuus ($k=2$) 1 g:n punnituksessa on 0,00039 g.

Toistettaessa laboratoriossa 1 g:n punnituksia 10 kertaa, saatiin seuraavat mittauserokset:

\bar{x} , keskiarvo	0,99901 g
\bar{s} , standardiepävarmuus (vaa'an lukemien keskihajonta)	0,0035 g
$u_{\text{rel}, 1 \text{ g}}(\bar{s}/\bar{x})$ suhteellinen standardiepävarmuus	0,0035
$u_{\text{rel}, 1 \text{ g}}^2$ suhteellinen varianssi	0,0000123

Kun 1 g:n osanäytteen punnitustuloksen epävarmuuteen lisätään vaa'an kalibroinnin suhteellinen standardiepävarmuus, saadaan osanäytteen massan yhdistetty suhteellinen epävarmuus (varianssi):

$$u_{\text{rel},1\text{g}}^2 = 0,0035^2 + \left(\frac{0,00039 \text{ g}}{2 \times 1 \text{ g}}\right)^2 = 0,0000122$$

$$u_{\text{rel},1\text{g}} = 0,0035 \approx 0,4 \%$$

Osanäytteen massan epävarmuutta käytetään jatkossa laimennussarjaviljelyn ensimmäisen laimennusvaiheen epävarmuuden määrittämisessä.

Yllä oleva laskenta osoittaa, että tässä punnituksessa vaa'an kalibrointiepävarmuus oli merkityksettömän pieni. Jos vaa'an kalibroinnin seurantalokset osoittavat, että vaa'an tarkkuus (mukaan lukien vaa'an ryömintäviritysten välillä) ei oleellisesti muutu, voidaan jatkossa osanäytteen punnituksen epävarmuutena käyttää punnitustulosten hajontaa.

4.2.1.2 Tilavuusmittausten epävarmuus

Rakennusmateriaali- tai pintanäytteen viljelyn tilavuusmittausten mittausepävarmuusarviot määritetään viljelyssä käytettäville pipeteille ja muille annosteluissa käytettäville välineille yleisimpien käytössä olevien tilavuuksien mukaan. Tilavuuden mittaussvälineiden tarkkuudet voidaan selvittää punnitsemalla puhdistettua vettä ja laskemalla tavanomaisia tilastokaavoja käyttäen tulossarjojen keskiarvot ja kokeelliset standardiepävarmuudet (keskihajonnat). Tähän tarvitaan vähintään 20 mittauksen sarja. Aseptisen työskentelyn simuloimiseksi kutakin yksittäistä mittausta varten on vaihdettava uusi pipetti tai kärki.

Analysoimalla kahden tai useamman henkilön tilavuuksien mittaustulokset saadaan keskihajonnan arvio, jota voi kutsua laboratorion sisäiseksi uusittavuuskeskihajonnaksi. Yhteinen epävarmuusarvio sisältää mahdolliset henkilöiden väliset systemaattiset erot. Suhteellinen standardiepävarmuus (u) saadaan jakamalla mittaustulosten keskihajonta (\bar{s}) niiden keskiarvolla (\bar{x}).

Esimerkki 8. Taulukossa 4 on esimerkkejä tilavuuksien suhteellisen standardiepävarmuuden laskemisesta. Laboratorio käyttää laimennussarjan tekemiseen kahta pipettiä, toista 0,5 ml siirrosten annosteluun ja toista 4,5 ml laimennusvesierien tilavuusmittauksiin. Lisäksi laboratorio käyttää 0,1 ml tilavuutta pipetoidessaan laimennussarjasta kasvualustoille.

Laimennusnestemäärää 9 ml käytetään lähtösuspension 1 g + 9 ml valmistamiseen. Laboratorio on kerännyt koko henkilöstönsä tekemien annostelijoiden kalibroinnin seurantarapunnitusten (n) tiedot ja laskenut niiden avulla tilavuuksien suhteelliset standardiepävarmuudet (u_{rel}) ja suhteelliset varianssit (u_{rel}^2). Käytetyistä vaoista aiheutuva mittausepävarmuus on merkityksettömän pieni.

Taulukko 4. Esimerkkejä laboratorion annostelijoiden tilavuusseurannoista ja niiden avulla lasketut tilavuuksien suhteelliset standardiepävarmuudet ja suhteelliset varianssit.

Väline	P2	P1	P7	P3	Mittalasi 1
Käyttötilavuus	9 ml	0,5 ml	4,5 ml	0,1 ml	99 ml
n	40	40	39	42	36
\bar{x}	8,8891	0,48971	4,47175	0,0996	98,44081
\bar{s}	0,07911	0,00443	0,01653	0,00056	0,45211
$u_{rel}(\bar{s}/\bar{x})$	0,00890	0,00905	0,00370	0,00562	0,00459
u_{rel}^2	0,0000792	0,0000819	0,0000137	0,0000316	0,0000211

4.2.1.3 Koeannosten tilavuuksien summan suhteellinen epävarmuus

Oletetaan, että laimennussarjaviljelyn tulos perustuu pesäkelukumääriin n_0 maljasta päätelaimennusta ja n_1 maljasta toista laimennusta, joka on saatu laimentamalla päätelaimennus vielä f -kertaisesti. Päätesusension tilavuutena ilmaistu koeannosten yhteenlaskettu tilavuus on

$$\sum V = n_0 V_0 + \frac{1}{f} n_1 V_1$$

missä

n_0 = päätesusensiosta viljeltyjen rinnakkaisaljien määrä

V_0 = mitattujen siirrostilavuus

f = laimennuskertoimen

n_1 = toisesta laimennuksesta viljeltyjen rinnakkaisaljien määrä

V_1 = toisesta laimennuksesta mitattujen siirrostilavuus.

Tyypillisesti rinnakkaisten määrät ja siirrostilavuudet ovat samat molemmissa laimennuksissa, joten $n_0 = n_1 = n$ and $V_0 = V_1 = V$. Silloin yhtälö siirrostilavuuksien summan suhteellisen varianssi laskemiseksi on

$$u_{\text{rel},\Sigma V}^2 = \frac{1}{(f+1)^2} \left[\frac{u_{\text{rel},V}^2}{n} (f^2 + 1) + u_{\text{rel},f}^2 \right]$$

missä

f = laimennuskertoimen

n = laimennuksen rinnakkaisaljien lukumäärä

V = siirroksen tilavuus maljaa kohti

$u_{\text{rel},V}$ = siirrostilavuuden suhteellinen standardiepävarmuus

$u_{\text{rel},f}$ = laimennuskertoimen suhteellinen standardiepävarmuus.

Toisen laimennuksen 10^{-3} :sta 10^{-4} :ään aiheuttama lisä tilavuussumman mittauserävarmuuteen on käytännössä merkityksetön, kun laimennusten välinen laimennuskertoimen $f=1$. Aivan tyydyttävä siirrostilavuuksien suhteellisen epävarmuuden arvio saadaan pelkästään ensimmäisen laimennuksen perusteella:

$$u_{\text{rel},\Sigma V}^2 = \frac{u_{\text{rel},V}^2}{2}$$

Esimerkki 9. Laimennussarjan laimennuksista 10^{-3} ja 10^{-4} viljeltiin kaksi rinnakkaisaljaa 0,1 ml siirroksin.

Käytetään siirrostilavuuksien summan epävarmuuden arvioimiseksi likimääräistä ratkaisua hyödyntäen taulukon 4 tietoja 0,1 ml:n tilavuuden epävarmuudelle:

$$u_{\text{rel},\Sigma V}^2 = \frac{u_{\text{rel},V}^2}{2} = \frac{u_{\text{rel},0,1 \text{ ml}}^2}{2} = \frac{0,0000316}{2} = 0,0000158$$

jolloin siirrostilavuuden suhteelliseksi standardiepävarmuudeksi saadaan:

$$u_{\text{rel},\Sigma V} = 0,003975 \text{ eli } 0,4 \%$$

4.2.1.4 Laimennuskertoimen suhteellinen epävarmuus

Rakennusmateriaalin laimennussarjaviiljelyn laimennuskertoimen koostuu useista peräkkäisistä portaista

$$F = f_1 f_2 \dots f_k$$

Jokaisen vaiheen suhteellinen varianssi arvioidaan laskemalla

$$u_{\text{rel},f}^2 = \left(\frac{V_b}{V_a + V_b} \right)^2 (u_{\text{rel},a}^2 + u_{\text{rel},b}^2)$$

missä

V_a = mikrobisuspensiosta siirretty tilavuus (ml)

V_b = laimennusliuoksen tilavuus (ml)

$u_{\text{rel},a}$ = siirretyn tilavuuden suhteellinen standardiepävarmuus

$u_{\text{rel},b}$ = laimennusnesteanoksen tilavuuden suhteellinen standardiepävarmuus.

Koko viljelysarjan laimennuskertoimen suhteellinen varianssi on yksittäisten suhteellisten varianssien summa

$$u_{\text{rel},F}^2 = u_{\text{rel},f_1}^2 + u_{\text{rel},f_2}^2 + \dots + u_{\text{rel},f_k}^2$$

Esimerkki 10. Rakennusmateriaalinäytteen ensimmäistä laimennusta (1 g + 9 ml) eli lähtösuspensiota laimennettiin edelleen useissa vaiheissa käyttäen tilavuuksia 0,5 ml + 4,5 ml. Sopivat pesäkemäärät laskettiin laimennuksista 10^{-3} ja 10^{-4} . Ensimmäinen laimennus, jossa oli laskettava määrä pesäkkeitä (10^{-3}), käsitettiin päätesuspensioksi.

Laboratorion laadunvarmistustulosten ja annostelijan valmistajan antamien tietojen perusteella tilavuusmittausten suhteelliset epävarmuudet saadaan taulukosta 4.

Ensimmäisen laimennusvaiheen (1 g + 9 ml) suhteelliseksi epävarmuudeksi saadaan

$$u_{\text{rel},f_1}^2 = \left(\frac{9 \text{ ml}}{9 \text{ ml} + 1 \text{ ml}} \right)^2 (0,0000122 + 0,0000792) = 0,0000740$$

Tässä punnitun näytemäärän tilavuus (V_a) oli $\approx 1\text{g}/1\text{g cm}^{-3} = 1\text{ cm}^{-3} = 1\text{ ml}$, laimennusnesteannoksen tilavuus (V_b) oli 9 ml, punnitun näytemäärän tilavuuden suhteellisen epävarmuuden neliö eli g:n suhteellinen varianssi ($u_{\text{rel},a}$) oli 0,0000122 ja laimennusnesteannoksen tilavuuden suhteellisen epävarmuuden neliö eli suhteellinen varianssi ($u_{\text{rel},b}$) oli 0,0000792.

Myös muiden (0,5 ml + 4,5 ml) laimennusvaiheiden suhteelliset epävarmuudet laskettiin. Kaikki laimennusvaiheet f_2 , f_3 ja f_4 olivat samanlaisia.

$$u_{\text{rel},f}^2 = \left(\frac{4,5\text{ ml}}{4,5\text{ ml} + 0,5\text{ ml}} \right)^2 (0,0000819 + 0,0000137) = 0,0000774$$

Koko laimennussarjan laimennuskertoimen suhteellinen varianssi yhdistämällä ensimmäisen laimennuksen ja sitä seuraavien kolmen laimennuksen varianssit.

$$u_{\text{rel},F}^2 = 0,0000740 + 0,0000774 + 0,0000774 + 0,0000774 = 0,000306$$

Laimennuskertoimen suhteellinen standardiepävarmuus saadaan laskemalla yhdistetyn varianssin neliöjuuri:

$$u_{\text{rel},F} = \sqrt{0,000306} = 0,01749 \approx 1,7\%$$

Laimennuskertoimelle laskettua mittausepävarmuutta voidaan käyttää sekä homeiden, hiivojen, bakteerien että aktinomykeettitulosten epävarmuuslaskennoissa, mikäli sarja on suoritettu yhteneväisesti.

4.2.1.5 Pesäkelaskennan epävarmuus

Laimennussarjamenetelmän eri kasvualustojen pesäkkeiden laskemiseen liittyvä epävarmuus on merkittävämpi kuin näytetilavuuden mittausepävarmuus. Eri henkilöiden suorittamat toistetut pesäkelaskennat sopivat yleensä huomommin yhteen kuin henkilön oman laskennan toistaminen. Laskentatulokseen saattaa siis liittyä laboratorion sisäistä epävarmuutta.

Laboratorion sisäistä pesäkelaskennan toistettavuutta ja uusittavuutta arvioidaan luettamalla samat kasvualustat joko yhdellä henkilöllä toistamiseen tai kaikilla pesäkelaskennan pätevyiden omaavilla. Näytteiden on hyvä olla sellaisia, joita laboratorio tyypillisesti tutkii ja maljoja pitäisi valita toistolaskuihin satunnaisesti. Ongelmallisia kasvualustoja pitäisi ottaa mukaan vain sen verran, kuin niitä arjen työskentelyssä tulee vastaan. Referenssimateriaalit tai pätevyyskokeen näytteet eivät ilman näytematriisia vastaa todellisia näytteitä, joten niiden viljelyiden kasvualustat eivät sovellu pesäkelaskennan epävarmuuden arviointiin.

Pesäkelaskennan toistettavuus arvioidaan rakennusmateriaali- ja pintanäytteiden osalta erikseen, koska edellisessä näytemateriaali vaikuttaa pesäkelaskentatarkkuuteen jälkimmäistä enemmän.

Esimerkki 11. Sienten, aktinomykeettien ja bakteerien pesäkelaskennan suhteellinen standardiepävarmuus ($u_{rel,L}$) määritettiin laboratorikohtaisena lukemaepävarmuutena (SFS-ISO 29201:2017, Liite L). Pesäkelaskentaan pätevytetetyt henkilöt laskivat toistensa kanssa neuvottelematta satunnaisesti valittujen näytteiden pesäkemäärät M2, DG18 ja THG-maljoilta. THG maljoilta suoritettiin erikseen aktinomykeettien ja muiden bakteerien pesäkelaskennat.

Kunkin maljan lukemisen suhteellisista standardiepävarmuuksista $u_{rel,Li}$ laskettiin varianssien eli $u_{rel,L}^2$ summan keskiarvo. Se on laboratorion sisäisen laskentatulosten uusittavuuden (tai toistettavuuden) suhteellisen varianssin arvo. Tätä arvoa käytetään jatkossa yhdistetyn teknisen epävarmuuden laskemisessa. Kun menetelmäkohtaisesta suhteellisesta varianssiarvosta otetaan neliöjuuri, saadaan ilmaistua laboratorion ko. menetelmän pesäkelaskennan suhteellinen standardiepävarmuus ($u_{rel,L}$) ko. menetelmällä ja henkilöillä. Taulukossa 5 on yhteenvedo saaduista tuloksista eri kasvualustoilla.

Taulukko 5. Esimerkki pesäkelaskennan lukemaepävarmuuksista eri kasvualustoilla.

Kasvualusta	$u_{rel, L}$	$u_{rel, L}^2$
M2	0,2891 (28,9 %)	0,083579
DG18	0,1842 (18,4 %)	0,033930
THG bakteerit *)	0,1325 (13,3 %)	0,017556
THG aktinomykeetit *)	0,0441 (4,4 %)	0,001945

*) Andersen-keräimen kasvualustat

Henkilökohtaisen/laboratorikohtaisen pesäkelaskennan lukemaepävarmuuksien seuranta sisältyy laboratorion sisäisiin laadunvarmistuksiin ja perehdytyksiin.

4.2.1.6 Laimennussarjaviljelyn tuloksen yhdistetty tekninen epävarmuus

Komponenttiperiaatetta noudatettaessa tekninen (operatiivinen) epävarmuus saadaan vaikuttavien epävarmuustekijöiden suhteellisten varianssien summasta

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

missä

$u_{rel,M}$ = osanäytteiden välisestä vaihtelusta aiheutuva matriisiepävarmuus

$u_{rel,F}$ = laimennusepävarmuus

$u_{rel,\Sigma V}$ = siirrostilavuuden (koeannosten) epävarmuus

$u_{rel,L}$ = pesäkelaskennan epävarmuus

$u_{rel,I}$ = inkuboinnin epävarmuus.

Esimerkki 12. Laboratorio oli määritellyt rakennusmateriaalinäytteen laimennussarjaviljelyn tulosten mittausepävarmuuden arviointimenettelyksi ns. komponenttiperiaatteen. Merkittävimmän tulokseen vaikuttaviksi tekijöiksi oli tunnistettu viljelytilavuuksiin ja pesäkelaskentaan liittyvät epävarmuudet. Teknisen epävarmuuden laskelmiin ei ole sisällytetty osanäytteiden välistä vaihtelua eikä inkuboinnin epävarmuutta.

Laboratorion laadunvarmistuksistaan saamat M2 laimennussarjaviljelyn teknisen suorituksen epävarmuustekijöiden arvot ja niistä yhteenlaskettu tekninen epävarmuus suhteellisina variansseina ilmaistuna olivat:

- Laimennusepävarmuus $u_{rel,F} = 0,01749$ (ks. 4.2.1.4)
- Siirtotilavuuden epävarmuus $u_{rel,V} = 0,003975$ (ks. 4.2.1.3)
- Pesäkelaskennan epävarmuus $u_{rel,L} = 0,2891$ (ks. 4.2.1.5)
- Yhdistetty epävarmuus

$$u_{o,rel}^2 = 0,01749^2 + 0,003975^2 + 0,2891^2 = 0,08390$$

$$u_{o,rel} = \sqrt{0,0839005} = 0,28966 \approx 29 \%$$

Kolmen teknisen suorituksen osatekijän yhdistetty suhteellinen standardiepävarmuus oli siis 29 %.

Taulukon 4 yhteenvedosta nähdään hyvin, että tilavuusmittausten (laimennuserroin ja koeannosten siirrostilavuus) vaikutus kokonaisepävarmuuteen on tässä esimerkissä olematon. Ilman näitä kahta komponenttia tekniseksi epävarmuudeksi olisi jäänyt pesäkelaskennan epävarmuus 0,2891 eli 29 %. Tässä esimerkin tapauksessa olisi siis voinut jättää huomioon ottamatta tilavuusmittauksiin liittyvät epävarmuudet. Pipettien kalibrointien ja tarkistusten perusteella seurataan tilavuusmittauksiin liittyvää epävarmuutta ja tarvetta arvioida sitä uudestaan.

4.2.2 Suoraviljelymenetelmän tekninen epävarmuus

Rakennusmateriaalissa voidaan katsoa esiintyvän mikrobikasvustoa, kun suoraviljelyssä havaitaan sieni- tai aktinomykeettipesäkkeitä suhteellisella asteikolla +++/++++.

Esimerkki 13. Henkilö A on viljellyt suoraviljelytekniikalla 10 erityyppisestä rakennusmateriaalinäytteestä 3 rinnakkaismaljaa M2-elatusainemaljalle. Kasvatuksen jälkeen hän arvioi suhteellisella asteikolla kullakin maljalla esiintyvän kasvun määrän. Henkilö B toistaa arvion (henkilö A voi myös toistaa oman arvionsa).

Taulukko 6. Rinnakkaisten suoraviljelymaljojen suhteellisten pesäkemäärien toistettua luokittelua.

Malja	Henkilö	Tulos 1	Tulos 2	Tulos 3
1	A	+	+	+
1	B	++	++	++
2	A	+	+	+
2	B	++	++	++
3	A	++	+	+
3	B	++	+	+
4	A	++	++	+++
4	B	++	++	++
5	A	++	+++	+++
5	B	++	++	+++
6	A	++++	++++	++++
6	B	++++	++++	++++
7	A	++	++	++
7	B	++	+	+
8	A	++	++	+
8	B	++	++	++
9	A	+	+	+
9	B	+	+	+
10	A	-	+	+
10	B	-	+	-

- = ei mikrobeja
- + = 1-19 pesäkettä (niukasti mikrobeja)
- ++ = 20-49 pesäkettä (kohtalaisesti mikrobeja)
- +++ = 50-199 pesäkettä (runsaasti mikrobeja)
- ++++ = \geq 200 pesäkettä (erittäin runsaasti mikrobeja).

Tuloksen tulkinnan riskin kannalta merkittäviä luokitteluja ovat ne näytteet, joissa tulkinta eroaa mikrobien kohtalaisen tai runsaan esiintyvyyden välillä. Esimerkissä yksittäisten kasvualustojen tulosten tulkinta ei ollut kahden henkilön välillä yhteneväinen kahden maljan osalta. Henkilö A arvioi näytteiden 4 ja 5 yhdellä rinnakkaismaljan pesäkemäärän sellaiseksi, että tulosten perusteella rakennusmateriaalissa olisi runsaasti mikrobeja. Henkilö B tulkitsee ko. maljat mikrobimäärältään kohtalaisiksi.

Epäyhteneväisen tuloksen tulkinnan riski oli

$\frac{2}{30} \times 100 \% = 6,7 \%$, jonka voidaan katsoa olevan pesäkkeiden havainnointiin liittyvä laboratorion teknisen epävarmuus.

Mikäli laboratorio laskee suoraviljelymaljojen pesäkkeet, se voi arvioida pesäkelaskennan lukemaepävarmuutta menetelmän teknisenä epävarmuutena kuten on kuvattu laimennussarjamenetelmän yhteydessä.

4.2.3 Andersen-keräimen ilmanäytteen tekninen epävarmuus

Pesäkelaskennan epävarmuus laboratorikohtaisena lukemaepävarmuutena arvioidaan Andersen-keräimen maljoilta, kuten on esitetty rakennusmateriaalin laimennussarjamenetelmän yhteydessä. Koska lopullisen tuloksen laskeminen perustuu keräimen vaiheiden 3-6 taulukkokorjattuihin pesäkelukuihin, epävarmuuslaskuissa käytetään näitä pesäkelukuja. Pesäkelaskennan epävarmuus määritetään todellisilla näytteillä eikä ole tarvetta toteuttaa erillisiä koejärjestelyjä.

Andersen-keräimen ilmavirtauksen suuruus (28,3 l/min) vaikuttaa suoraan analyysitulokseen. Ilman tilavuusvirta keräimessä kalibroidaan tai tarkistetaan mittarilla, joka puolestaan on kalibroitu niin, että tulosten metrologinen jäljitettävyys SI-mittausjärjestelmään toteutuu. Pumpun ilmavirran tarkistuksessa mahdollisesti havaittu keskimääräinen virhe virtauksessa korjataan pumpun säädöillä tai se huomioidaan lopullisen testaustuloksen laskemisessa.

Ilmanäytteen tuloksen tekniseksi epävarmuudeksi jää siis ainoastaan pesäkelaskennasta aiheutuva epävarmuus.

4.3 Sieni- ja aktinomykeittitunnistuksen epävarmuus

Mikrobipesäkkeiden tunnistukseen liittyvää epävarmuutta voidaan arvioida laskemalla tunnistustuloksista virheellisten tunnistusten osuus. Myös oman tunnistuksen toistotarkkuus tai useamman henkilön välisten tunnistustulosten yhteneväisyys kertoo tunnistukseen liittyvästä epävarmuudesta.

Laboratorion testikannoilla suoritetuista tunnistuksen laadunvarmistustuloksista ja osaamisen monitorointituloksista saadaan kerättyä tietoa tunnistukseen liittyvästä laboratorikohtaisesta epävarmuudesta. Lisäksi laboratorion pitää

hyödyntää ulkoisten pätevyyskokeiden tuloksia, mikäli niissä esiintyy sieniä, jotka kuuluvat laboratorion tunnistamien sienten valikoimaan.

Esimerkki 14. Laboratorio on kerännyt yhteen henkilöiden A ja B suorittamia sieni- ja aktinomykeettikantojen tunnistustuloksia. Kumpikin henkilö suoritti 162 tunnistusta eli tunnistusten kokonaismäärä oli 324 tunnistusta. Henkilö A tunnisti virheellisesti 7 mikrobikantaa, henkilö B puolestaan 5 kantaa.

Henkilön A todennäköisyys saada hometunnistuksesta väärä tulos on

$$\frac{7}{162} * 100 \% = 4,3 \%$$

Henkilön B tunnistuksessa vastaavat sienet, hänen todennäköisyytensä saada virheellinen tunnistustulos oli 3,1 %.

Laboratoriokohtainen virheellisen tunnistuksen todennäköisyys on

$$\frac{7+5}{162+162} * 100 \% = 3,7 \%$$

4.4 Suoramikroskopoinnin epävarmuus

Suoramikroskopoinnin teknisen epävarmuuden arvioinnissa voidaan käyttää standardissa SFS-EN ISO 29201:2017 liitteessä L3 annettua esimerkkiä korvaamalla pesäkeluvut sienikasvustoon viittaavilla mikroskooppisten havaintojen määrällä.

Esimerkki 15. Laboratorion kaksi henkilöä on tutkinut toistamiseen rakennusmateriaalinäytteiden suoramikroskopointipreparaatteja ja merkinnyt muistiin tekemiensä mikrobikasvustoon viittaavien havaintojen määrät (A1, A2, B1 ja B2) kuten sienirihmojen, -itiöiden, itiöaggregaattien tai muiden sienirakenteiden esiintyminen. Preparaatteja oli valmistettu ja analyysin toistotarkkuutta arvioitu pitkällä aikavälillä erilaisista rakennusmateriaaleista, joita laboratorio tyypillisesti tutkii. Jotta eri henkilöiden tuloksia voitiin suoraan verrata, tarkastelivat he sovitusti preparaateista 70 näkökenttää.

Havainnoista laskettiin laboratorion suoramikroskopoinnin tekninen epävarmuus hiukkaslaskennan tulosten suhteellisenä epävarmuutena.

Taulukko 7. Suoramikroskooppipreparaattien toistetun hiukkaslaskennan tuloksia.

A1	B1	A2	B2	ka	s	u_i	u_i^2
1	1	1	1	1,0	0,000	0,0000	0
10	12	11	12	11,3	0,957	0,0851	0,0072428
13	13	15	14	13,8	0,957	0,0696	0,0048485
2	2	2	2	2,0	0,000	0,0000	0
22	25	25	24	24,0	1,414	0,0589	0,0034722
23	26	27	26	25,5	1,732	0,0679	0,0046136
26	23	24	25	24,5	1,291	0,0527	0,0027766
26	26	28	29	27,3	1,500	0,0550	0,00303
31	28	27	31	29,3	2,062	0,0705	0,0049675
33	26	30	28	29,3	2,986	0,1021	0,010422
36	39	41	47	40,8	4,646	0,1140	0,0129976
64	67	66	63	65,0	1,826	0,0281	0,000789
65	66	61	69	65,3	3,304	0,0506	0,0025641
61	70	65	69	66,3	4,113	0,0621	0,0038543
68	70	66	63	66,8	2,986	0,0447	0,0020012

ka=havaintojen aritmeettinen keskiarvo

s= otoskeskihajonta

u_i = i:nnen mikroskooppipreparaatin havaintojen suhteellinen standardiepävarmuus

u_i^2 = varianssi.

Esimerkissä varianssien summa on 0,0635794 ja u_i^2 -arvojen summan keskiarvo on 0,004239. Sen neliöjuuri $0,0651 \approx 6,5\%$ on laboratorion keskimääräinen suoramikroskopian hiukkaslaskennan epävarmuus ko. näytetyypeillä.

4.5 Luontainen vaihtelu - hiukkastilastollinen hajonta

4.5.1 Pesäkelukumäärä

Hiukkastilastollisella hajonnalla tarkoitetaan täydellisesti sekoitetun suspension samankokoisiin, virheettömästi mitattuihin rinnakkaisnäytteisiin sattuvien hiukasmäärien vaihtelua.

Pesäkelukumäärän luontainen vaihtelu on kääntäen verrannollinen pesäkkeiden summaan. Suhteellinen varianssi lasketaan kaavasta

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

missä $\sum n_{c_i}$ on maljoilta laskettujen pesäkkeiden kokonaismäärä.

Esimerkki 16. Laboratorio määrittä laimennussarjaviljelyn tulokseen liittyvän pesäkeluvun hiukkastilastollisen hajonnan laskemistaan rinnakkaismaljojen pesäkemääristä.

Laimennuksella 10^{-3} rinnakkaismaljojen pesäkemäärät olivat 85 ja 56, yhteensä 141. Laimennuksella 10^{-4} rinnakkaismaljojen pesäkemäärät olivat 6 ja 54, yhteensä 10.

Maljoilla olevien pesäkkeiden kokonaismäärä (n_{c_i}) on tällöin 151, jolloin suhteelliseksi varianssiksi saadaan

$$u_{d,rel}^2 = \frac{1}{\sum n_{c_i}} = 0,00662$$

Pesäkeluvun luontaisesta hajonnasta tulokseen aiheutuva epävarmuus on siten $\sqrt{0,00662} = 0,08136$ eli 8,1 %.

Laskukaavasta seuraa, että lukuarvo pienenee pesäkkeiden kokonaismäärän kasvaessa eli rinnakkaismaljauksia lisäämällä.

4.5.2 Andersen-tuloksen MPN-arvo

Andersen-tulos on kooste kuuden keräysvaiheen tuloksista. Määrittämenetelmä huomioi sen todennäköisyyden, että rei'istä voi iskeytyä kasvatusaljalle useampi kuin yksi mikrobi, mutta että näistä kuitenkin muodostuu vain yksi pesäke laskettavaksi. Tämä koskee vaiheiden 3-6 pesäkemääriä. Niiden lasketut pesäkemäärät korjataan "positive hole conversion"-menettelyllä.¹⁰ Käytettävissä on korjaustaulukko, jonka arvojen voi katsoa olevan 400 reiän MPN-lukuja.^{9, 10} Vaiheiden 1 ja 2 pesäkemääriä käsitellään tavallisina pesäkelukuina.

Jos tulos maljoilla 3-6 sattuu olemaan pienempi kuin 20 pesäkettä, korjaus on niin pieni, että se ei näy kokonaisluvuksi pyöristetyssä tuloksessa. Mittausepävarmuuslaskuissa on kuitenkin otettava huomioon, että kysymyksessä on MPN-arvo.

Andersen-tulos on siis aina summa (A), jossa yhteenlaskettavina on kaksi, vaiheiden 1 ja 2, "tavallista" pesäkelukua (C) ja neljä 400-paikkaisen yhden laimennuksen MPN-arvoa (M):

$$A = C_1 + C_2 + M_1 + M_2 + M_3 + M_4.$$

¹⁰ Andersen, A.A. (1958) New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles. Journal of Bacteriology 76:471-484.

Andersen-tuloksen eli summan A varianssi on aina

$$u^2(A) = C_1 + C_2 + u^2(M_1) + u^2(M_2) + u^2(M_3) + u^2(M_4)$$

Koska pesäkeluvut (C) noudattavat Poisson-jakaumaa, $u^2(C)=C$ ja ne kelpaavat tuloksen epävarmuuslaskentaan sellaisenaan. Vaiheiden 3-6 korjatuille pesäkeluvuille eli MPN-luvuille saadaan varianssit $u^2(M)$ kaavasta

$$u^2(M) = \frac{n_+ n}{n - n_+}$$

missä

$n = 400$ eli kaikkien mahdollisten pesäkkeiden kasvupaikkojen lukumäärä
 $n_+ =$ maljalta laskettujen pesäkkeiden määrä (ilman korjausta).

Esimerkki 17. Asiakkaan Andersen-keräimellä ottamista THG- ja M2-maljasarjoista laskettiin pesäkkeet, suoritettiin tarvittavat pesäkelukujen korjaukset ja arvioitiin MPN-arvon epävarmuus. Tulosten yhteenveto on Taulukoissa 8a ja 8b.

Taulukko 8a. Andersen-keräimen THG-maljojen MPN-tuloksien varianssi, jonka avulla saadaan laskettua standardiepävarmuus ja suhteellinen standardiepävarmuus.

THG	n	n ₊	korj. n ₊	n-n ₊	u ²
C ₁		33	33		33
C ₂		12	12		12
M ₁	400	15	15	385	15,58
M ₂	400	36	38	364	39,56
M ₃	400	18	18	382	18,85
M ₄	400	3	3	397	3,02
		summa	119		122,02

Taulukko 8b. Andersen-keräimen M2-maljojen MPN-tuloksien epävarmuus

M2	n	n ₊	korj. n ₊	n-n ₊	u ²
C ₁		60	60		60
C ₂		20	20		20
M ₁	400	33	34	367	35,97
M ₂	400	50	53	350	57,14
M ₃	400	36	38	364	39,56
M ₄	400	2	2	398	2,01
		summa	207		214,68

THG-esimerkissä (taulukko 8a) Andersen-tuloksen, 119 pmy/tutkittu ilmatilavuus, varianssi on $u^2(A) = 122,02$, josta saadaan tuloksen

$$\text{standardiepävarmuus } u(A) = \sqrt{u^2(A)} = \sqrt{122,02} = 11,05$$

Andersen-tuloksen hiukkastilastollinen hajonta ilmaistaan suhteellisenä standardiepävarmuutena, joka tässä tapauksessa on

$$u_{d,rel} = \frac{\text{standardiepävarmuus } u(A)}{\sum pmy} = \frac{11,05}{119} = 0,0929 = 9,3 \%$$

Vastaavasti M2 esimerkissä (taulukko 8b) Andersen-tuloksen (207 pmy/tutkittu ilmatilavuus) varianssi on $u^2(A) = 214,68$, joten sen standardiepävarmuus on

$$u(A) = \sqrt{u^2(A)} = \sqrt{214,68} = 14,65$$

Andersen-tuloksen hiukkastilastollinen hajonta on

$$u_{d,rel} = \frac{14,65}{207} = 0,0708 = 7,1 \%$$

Hiukkastilastollisen hajonnan suuruus riippuu siis kunkin maljan pesäkeluvusta.

4.6 Yhdistetty ja laajennettu mittausepävarmuus

Lopullisen testaustuloksen menetelmäkohtainen suhteellinen yhdistetty mittausepävarmuus saadaan yhdistämällä analyysin suorittamiseen liittyvä tekninen epävarmuus ja pesäkelukumäärään tai MPN-arvoon liittyvä hiukkastilastollinen hajonta.

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

missä

$u_{c,rel}$ = yhdistetty suhteellinen standardiepävarmuus

$u_{o,rel}$ = yhdistetty tekninen epävarmuus (suhteellinen standardiepävarmuus)

$u_{d,rel}$ = suhteellinen hiukkastilastollinen hajonta (suhteellinen standardiepävarmuus).

Laajennettu epävarmuus saadaan kertomalla yhdistetty standardiepävarmuus kattavuuskertoimella k . Käytettäessä kattavuuskerrointa $k=2$ saavutetaan noin 95 % luottamustaso.

Esimerkki 18. Esimerkissä 12 laskettu laimennussarjamenetelmän (M2) yhdistetty tekninen suhteellinen epävarmuus oli

$$u_{o,rel} = \sqrt{0,0839005} = 0,28966$$

ja pesäkeluvun (151 pmy) hiukkastilastollinen hajonta oli

$$u_{d,rel} = \sqrt{0,00662} = 0,081380$$

joten mittauksen yhdistetty standardiepävarmuus on

$$u_{c,rel} = \sqrt{0,0839005 + 0,00662} = 0,3008667 \approx 30,1 \%$$

ja mittauksen laajennettu epävarmuus 95 %:n luottamustasolla on $2 \times 0,3008667 = 0,6017$ eli 60,2 %.

Esimerkki 19. Andersen-keräimen THG bakteeripesäkelaskennan suhteellinen epävarmuus oli ainoa tekninen epävarmuustekijä, jonka standardiepävarmuus oli Taulukon 5 mukaisesti $u_{rel,L} = 0,1325$. Taulukon 8a mukaisesti MPN-arvo oli 119 ja sen hiukkastilastollinen jakaumaepävarmuus $u_{d,rel} = 0,09292$.

Yhdistetty epävarmuus saadaan laskettua seuraavasti

$$u_{c,rel} = \sqrt{0,1325^2 + 0,09292^2} = 0,161834 \approx 16,2 \%$$

5 Huomioon otettavat asiakohdat muiden kvantitatiivisten menetelmien käyttöönotossa ja mittausepävarmuudessa

Mittausepävarmuus voidaan laskea standardin SFS-EN ISO 19036:2019 mukaisesti MPN-tekniikoille, ATP-laitteille sekä qPCR-menetelmille.

Vaihtoehtoisten menetelmien mittausepävarmuuksia laskettaessa voi hyödyntää standardia SFS-EN ISO 19036:2019 tai SFS-ISO 29201:2017 soveltuvin osin ja arvioida lisäksi validoinnissa ja verifiointissa kertyvää tietoa uuden tai vaihtoehtoisen menetelmän epävarmuustekijöistä.

6 Mittausepävarmuustietojen ilmoittaminen asiakkaille ja käyttö tulosten tulkinnassa

Standardin SFS-EN ISO/IEC 17025:2017¹ mukaan testausselosteen on sisällytettävä arvio mittausepävarmuudesta, mikäli se on mittaustuloksen tulkinnan kannalta tarpeellista tai tarkoituksenmukaista tai mikäli asiakas sitä edellyttää. Mittausepävarmuus esitetään joko samassa yksikössä kuin mittaussuure tai suhteellisena osuutena (esim. prosenteissa).

Asiakkaalle pitää kertoa mahdollisuudesta saada tieto mittausepävarmuudesta ja menettelystä, jolla mittausepävarmuus on laskettu tai arvioitu.

Mittausepävarmuus on liitettävä testausselosteseen asiakkaan sitä pyytäessä. Se voidaan ilmoittaa myös erillisellä dokumentilla.

On suositeltavaa, että laajennettu mittausepävarmuus pyöristetään kahden merkitsevän numeron tarkkuuteen. Pyöristäminen tulee kuitenkin tehdä vasta laskentaprosessin lopussa.

Mittausepävarmuus voidaan ilmoittaa testausselosteeissa seuraavilla tavoilla:

- a) x pmy/g tai pmy/ml ($10^{y-U} - 10^{y+U}$),
esimerkiksi 100 000 pmy/g (90 000–110 000)
- b) 100 000 pmy/g \pm 10 000 pmy/g
- c) (100 000 \pm 10 000) pmy/g
- d) 100 000 pmy/g \pm 10 %.

Testausselosteeissa on lisäksi ilmoitettava, mihin mittausepävarmuuden arviointi perustuu.

Tämä voidaan ilmoittaa esimerkiksi seuraavalla tavalla: Laajennettu epävarmuus on arvioitu standardin SFS-EN ISO 19036:2019 mukaisesti ja se perustuu laboratorion teknisen suorituksen uusittavuuden standardiepävarmuuteen kerrottuna kattavuuskertoimella $k = 2$, joka vastaa luottamustasoa 95 %.

Jos mittausepävarmuus perustuu vain uusittavuuden keskihajontaan, se on myös ilmaistava testausselosteeissa.

Euroopan unionissa ei ole säädöksiä mittausepävarmuuden huomioon ottamisesta elintarvikkeiden mittaustulosten tulkinnassa. Yhteisön strategiassa elintarvikkeiden mikrobiologisten vaatimusten asettamiseksi todetaan, että toimijan tulee tulkita kaikki raja-arvot ylittävät tulokset ei-hyväksyttäviksi ilman mittausepävarmuuden tarkastelua.¹¹

¹¹ SANCO/ 1252/2001 Rev. 11 Discussion paper On strategy for setting microbiological criteria for foodstuffs in Community legislation.
https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/biosafety_fh_microbio_criteria-discussion_paper_en.pdf

Valviran mukaan vesitulosten yhteydessä ei huomioida mittausepävarmuuksia: "Menetelmän mittausepävarmuus ei ole sallittu poikkeama muuttujan enimmäisarvosta."¹²

Asumisterveydessä mittausepävarmuus huomioidaan: "Toimenpiderajan ylittymistä arvioitaessa on tehtävä mittaus- tai näytteenottotapahtumaa ja jatkoanalyysiä koskeva epävarmuustarkastelu. Toimenpideraja ylittyy, jos tässä asetuksessa tarkoitettujen altisteiden numeeriset arvot ylittävät mittausepävarmuus huomioon ottaen."¹³

¹² Sosiaali- ja terveysministeriön asetus talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista 1352/2015, 14 §.

¹³ Sosiaali- ja terveysministeriön asetus asunnon ja muun oleskelutilan terveydellisistä olosuhteista sekä ulkopuolisten asiantuntijoiden pätevyysvaatimuksista 545/2015, 4 § 3 mom.

7 Mittausepävarmuustietojen ylläpitäminen

Menetelmän käyttöönoton yhteydessä suoritettava mittausepävarmuuden arviointi antaa käsityksen menetelmän suorituskyvystä. Menetelmää käytettäessä laboratorion on itse arvioitava mittausepävarmuustietojen päivittämisen tarve. Käyttääpä laboratorio sitten globaalia määrittäisperiaatetta tai komponentteihin perustuvaa määrittäystapaa, päivitystarvetta aiheuttavat erityisesti muutokset teknisessä toiminnassa. Teknisen epävarmuuden arvo on päivitettävä aina, kun jokin siihen vaikuttava seikka muuttuu.

Tällaisia ovat esimerkiksi

- uudet mittauksilokseen vaikuttavat laitteet ja välineet
- elatusaineen tai PCR-kitin verifiointimenettely
- tekniseen suoritukseen osallistuvien työntekijöiden vaihtuvuus
- menetelmän uudelleenvahvistus tai verifiointi.

Matriisiepävarmuuden voidaan katsoa pysyvän muuttumattomana kullekin matriisille. Jos laboratorio ottaa testaukseen uuden matriisin, sen matriisiepävarmuus on määritettävä, mikäli laboratorio ei käytä kirjallisuus- tai vastaaviin tietoihin perustuvaa matriisiryhmäkohtaista epävarmuuden arvoa.

Laboratorion tulee luoda periaatteet mittausepävarmuustietojen päivittämiselle ja dokumentoida ne. Laboratorion on määritettävä esimerkiksi, kuinka pian tapahtuneen muutoksen jälkeen teknisen mittausepävarmuuden tiedot päivitetään, onko tarpeen määrittää päivitysvälille enimmäispituus, ja millaisesta mittausepävarmuusarvojen muutoksesta tiedotetaan asiakkaalle.

Laboratorio voi myös hyödyntää ulkoisista vertailumittauksista laskettavaa zeta-arvoa varmistuakseen käyttämänsä mittausepävarmuusarvon realiteetisuudesta.¹⁴

Osa ulkoisten vertailumittausten järjestäjistä laskee zeta-arvon osallistujille, mutta sen voi myös laskea itse, mikäli vertailumittausjärjestäjä on ilmoittanut vertailuarvon standardiepävarmuuden. Mikäli zetan itseisarvo on pienempi kuin 2, osallistujan tulosta voidaan pitää hyväksyttävänä.

$$zeta = \frac{x_i - x_{ref}}{\sqrt{u_i^2 + u_{ref}^2}}$$

missä

x_i = yksittäisen osallistujan testitulokset

x_{ref} = vertailuarvo (the assigned value)

u_i = yksittäisen osallistujan tuloksen mittausepävarmuus

u_{ref} = vertailuarvon standardiepävarmuus.

¹⁴ ISO 13528:2022 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison.

Profest Syke, Asiakasohje 21-109 versio 02. <https://www.wp5.ymparisto.fi/Labtest/>

Kiitokset

Oppaan ensimmäisen version tekemiseen ovat osallistuneet emeritusprofessori Seppo Niemelä, FINAS-akkreditointipalvelusta Margareta Hägg, Annika Wikström ja Katriina Luoma sekä mikrobiologian tekniset arvioijat Tuula Pirhonen, Tuula Laakso ja Seija Kalso.

Tekijät kiittävät Martti Heinosta (VTT MIKES) ja Jaana Järvistä (VTT MIKES) sekä kaikkia, jotka ovat vaikuttaneet tämän oppaan syntyyn.

Kiitämme myös Ruokavirastoa sen antamasta laskentaesimerkistä.

Oppaan päivitykseen ovat osallistuneet Margareta Hägg (FINAS), Seija Kalso (MetropoliLab), Maija Kirsi (Työterveyslaitos), Pirjo Sainio (Tullilaboratorio) ja Annikki Welling (Ruokavirasto).

Syventävää kirjallisuutta

Linkkien toimivuus on tarkistettu keväällä 2024.

Hurley, M.A. & Roscoe, M.E. (1983) Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *Journal of Applied Bacteriology* 55:159-164.

ILAC G8:09/2019. Guidelines on Decision Rules and Statements of Conformity.

ILAC G17:01/2021. Guidelines for Measurement Uncertainty in Testing.

Kenttä, E. 2009. Mittausepävarmuuden kahden lähestymistavan vertailu. Insinööriyö, Metropolia Ammattikorkeakoulu, Bio- ja elintarviketekniikka. <https://www.theseus.fi/handle/10024/2794>

Ljevaković-Musladin, I. 2020. Measurement Uncertainty According to ISO 19036:2019, 17th IMEKO TC 10 and EUROLAB Virtual Conference, "Global Trends in Testing, Diagnostics & Inspection for 2030" October 20-22, 2020. <https://www.imeko.org/publications/tc10-2020/IMEKO-TC10-2020-044.pdf>

Magnusson, B. 2022. Evaluating uncertainty for microbiological methods. According to ISO 29201 Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods. Eurachem workshop May 2022. https://www.eurachem.org/images/stories/workshops/2022-05_QA_17025/presentations/S3-P3-B.Magnusson.pdf

Liite 1 Termit ja määritelmät

Globaali mittausepävarmuus eli laboratorion sisäinen uusittavuus on analyysitulosten keskihajonta, kun analyysi suoritetaan samassa laboratoriossa eri tekijöitä, eri reagenssieriä, eri annostelijoita ja muita tekijöitä vaihtelemalla.

Hiukkastilastollisella hajonnalla (luontainen vaihtelu, satunnainen vaihtelu, luontainen jakaumaepävarmuus, suhteellinen ominaisvaihtelu) tarkoitetaan mikrobien sattumanvaraista hajontaa homogeenoidussa suspensiossa siitäkin huolimatta, että tekninen suoritus on hyväksyttävällä tasolla. Laboratorio ei voi vaikuttaa tähän hajontaan muuten kuin lisäämällä rinnakkaismaljojen ja siten laskettavien pesäkkeiden määrää.

Keskihajonta kertoo, miten kaukana havainnot keskimäärin ovat keskiarvosta.

Komponenttiperiaatetta käytettäessä yksittäisten epävarmuuteen vaikuttavien tekijöiden vaikutukset arvioidaan erikseen ja ne yhdistetään matemaattisesti.

Laajennettu epävarmuus saadaan kertomalla yhdistetty standardiepävarmuus kattavuuskertoimella. Kattavuuskerroin $k=2$ vastaa likimain 95 % luotettavuutta.

Laboratorion sisäinen uusittavuus eli globaali mittausepävarmuus on analyysitulosten keskihajonta, kun analyysi suoritetaan samassa laboratoriossa eri tekijöitä, eri reagenssieriä, eri annostelijoita ja muita tekijöitä vaihtelemalla.

Matriisiepävarmuus on matriisista johtuva vaihtelu, kun analyysi toistetaan saman laboratorionäytteen testiannoksista toistettavissa olosuhteissa.

Mittausepävarmuus on ei-negatiivinen parametri, joka käytettyjen tietojen perusteella kuvaa mittasuurelle saatujen arvojen oletettua vaihtelua.

Mittaustulos tarkoittaa tässä oppaassa mittauksen lopullista keskimääräistä arvoa eli odotusarvoa asianmukaisessa yksikössä ilmaistuna. Tämä tulos ilmoitetaan analyysiprosessin päätteeksi testausselosteessa asiakkaalle. Huom! Tässä oppaassa poiketaan mittaustuloksen yleisestä määritelmästä, jonka mukaan mittaustulos koostuu odotusarvosta ja sen epävarmuudesta.

Operatiivinen (epävarmuus)komponentti on yksittäinen teknisen suorituksen epävarmuustekijä.

Sisäisen uusittavuuden keskihajonta on laboratorion sisäinen uusittavuus.

Sisäisen uusittavuuden olosuhteet. Olosuhteet, joissa koetulokset mitataan samaa menetelmää käyttäen identtististä näytteistä samassa laboratorioissa, eri operaattoreilla ja eri välineillä.

Standardiepävarmuus ilmaisee mittaustuloksen epävarmuuden keskihajontana, joka on määritetty joko tilastollisin menetelmin riittävästä havaintosarjasta tai muilla tähän tarkoitukseen hyväksytyillä menetelmillä.

Suhteellinen keskihajonta ja suhteellinen standardiepävarmuus saadaan jakamalla tuloksen keskihajonta tuloksen keskiarvolla.

Suhteellinen varianssi on suhteellisen standardiepävarmuuden neliö.

Teknisen epävarmuus koostuu kvantitatiivisen analyysin suorittamiseen liittyvien eri teknisten tekijöiden aiheuttamasta vaihtelusta tulokseen. Teknisen suorituksen epävarmuus määritetään joko tunnistetut epävarmuustekijät yhdistämällä tai testaustuloksen uusittavuuden perusteella. Laboratorion tulee laadunvarmistusmenettelyjen avulla tunnistaa, seurata ja hallita mittaustensa epävarmuustekijät myös jälkimmäisessä menettelyssä.

Toistettavuus saadaan laskemalla keskihajonta analyysituloksista toistettavuusolosuhteissa.

Toistettavuusolosuhteet ovat olosuhteet, joissa itsenäiset koetulokset on mitattu identtisistä näytteistä samalla menetelmällä, samassa laboratorioissa, saman operaattorin mitatessa samoilla välineillä lyhyen ajan kuluessa.

Uusittavuus saadaan laskemalla keskihajonta uusittavuusolosuhteissa.

Uusittavuusolosuhteet. Olosuhteet, joissa koetulokset mitataan samaa menetelmää käyttäen identtisistä näytteistä eri laboratorioissa, eri operaattoreilla ja eri välineillä.

Varianssi on standardiepävarmuuden neliö.

Yhdistetty (standardi)epävarmuus saadaan yhdistämällä analyysin suorittamiseen liittyvät epävarmuuden osatekijät.

Liite 2 MPN-menetelmät

MPN-menetelmien mittausepävarmuus

MPN-tulosten suhteellinen mittausepävarmuus riippuu ennen kaikkea havaittujen positiivisten kasvupaikkojen määrästä. Siitä seuraa, että luontainen mittausepävarmuus on näytekohtainen samaan tapaan kuin pesäkemenetelmien Poisson-hajonta. Kasvupaikkojen kokonaismäärä ratkaisee, miten alhaiseen mittausepävarmuuteen on mahdollista teoriassa päästä. Erona pesäkemenetelmiin on se, että MPN-menetelmien mittausepävarmuus ei alene monotonisesti positiivisten määrän kasvaessa vaan sillä on minimiarvo, jonka molemmiin puolin epävarmuus kasvaa. On esitetty, että epävarmuuskomponentit, jotka ovat enemmän kuin 1/5 (eli 20 %) suurimmasta, pitäisi ottaa huomioon yhdistetyssä mittausepävarmuudessa (SFS-EN ISO 19036:2019). Suuri rinnakkaisten kasvupaikkojen määrä sallii positiivisten määrän kasvattamisen ja sitä kautta mahdollisuuden pienentää MPN-menetelmien mittausepävarmuutta. Monen rinnakkaisen kasvupaikan menetelmissä (esim. Colilert, Tempo, HGMF, Bio-Rad, Andersen) luontainen mittausepävarmuus saattaa tulla niin pieneksi, että muutkin virhelähteet voivat näkyä sen rinnalla.

Luontainen mittausepävarmuus

Kun n kpl:een sarjassa on positiivisia tuloksia 80 %, yhden sarjan MPN-menetelmän suhteellisen luontaisen hajonnan minimiarvo on likimain

$$u_{rel} = \frac{1,24}{\sqrt{n}}$$

Samaa likiarvoa voi pitää kelvollisena koko sillä alueella, missä positiivisia on 60 % - 95 %. Esimerkiksi Colilertillä ($n=51$), on suhteellisen mittausepävarmuuden minimiarvo tämän mukaan välillä 30-48 positiivista suunnilleen $1,24/\sqrt{51} = 0,17$ eli 17 %. Viiden putken MPN:n sarjoissa pienin mahdollinen mittausepävarmuus olisi vastaavasti $1,24/\sqrt{5} = 0,55$ eli 55 %. Tällaisilla laskelmilla voi alustavasti arvioida tarvitseeko muitakin komponentteja huomioida.

Jos noudatetaan 1:5 periaatetta, niin kaikki n . 3 % - 4 % tai sitä pienemmät virhekomponentit voi unohtaa arvioitaessa yhdistettyä mittausepävarmuutta jopa optimalalueella esimerkiksi Colilertin kaltaisessa MPN-systeemissä. Vanhoissa MPN-systeemeissä, kuten 5+5+5 putken MPN:ssä, missä luontainen hajonta on vähintään 50 %, eivät edes 10 % lisäepävarmuudet olisi merkittäviä. Positiivisten osuuden ollessa paljon alle 50 % tuskin muu kuin huomattava matriisiepävarmuus voi olla merkityksellistä.

Luontaisen hajonnan arviot

Epävarmuuskomponenttien yhdistämiseksi kokonaisepävarmuudeksi tarvitaan yksinkertainen mittausepävarmuus (keskihajonta tai suhteellinen keskihajonta). Sen voi helposti laskea yhden laimennoksen MPN-menetelmissä perustuloksista lähtien, kun koetulos (positiivisten lukumäärä) ja sarjan koko pituus ovat tiedossa.

Usean laimennuksen tapauksessa lähtötietoina tarvitaan paitsi positiivisten lukumäärät myös koeannosten tilavuudet eri laimennoksissa.

Kaupallisten tuotteiden valmistajat ilmoittavat epävarmuuden laajennettuna epävarmuutena 95 %:n luottamustasolla. Luontainen epävarmuus voidaan aina laskea niistä kattavuuskerroin huomioiden. Ongelmia syntyy, jos luottamusvälin arvoja ei ole ilmoitettu MPN-taulukoiden yhteydessä.

Yhden laimennoksen sarjat

Käyttökelpoisin muoto yhden laimennoksen menetelmien suhteelliselle mittausepävarmuudelle on annettu kaavassa D.4 standardissa SFS-ISO 29201:2017:

$$s_{MPN} = \frac{p}{\ln\left(\frac{n}{n-p}\right)\sqrt{np(n-p)}}$$

missä

n = koko sarjan kasvupaikkojen lukumäärä

p = positiivisten kasvupaikkojen lukumäärä

s_{MPN} = keskihajonta \ln -asteikolla.

Esimerkki L1. On havaittu 32 positiivista Colilert-levyllä ($n = 51$). Suhteellinen hiukkastilastollinen hajonta on tällöin

$$\begin{aligned} s_{MPN} &= \frac{p}{\ln\left(\frac{n}{n-p}\right)\sqrt{np(n-p)}} = \frac{32}{\ln\left(\frac{51}{19}\right)\sqrt{51 \times 32 \times 19}} \\ &= \frac{32}{173,87} = 0,18 = 18 \% \end{aligned}$$

Esimerkki L2. On havaittu $p = 4$ positiivista putkea a) $n = 5$ kasvupaikan ja b) $n = 51$ kasvupaikan MPN sarjoissa. Lasketaan luontainen mittausepävarmuus kummassakin tapauksessa.

a)
$$s_{MPN} = \frac{p}{\ln\left(\frac{n}{n-p}\right)\sqrt{np(n-p)}}$$

$$= \frac{4}{\ln\left(\frac{5}{1}\right)\sqrt{5 \times 4 \times 1}}$$

$$= \frac{4}{7,1976} = 0,556 = 56 \%$$

b)

$$S_{MPN} = \frac{p}{\ln\left(\frac{n}{n-p}\right)\sqrt{np(n-p)}}$$

$$= \frac{4}{\ln\left(\frac{51}{47}\right)\sqrt{51 \times 4 \times 47}}$$

$$= \frac{4}{7,8978} = 0,500 = 50 \%$$

Tämä esimerkki kertoo, miten voimakkaasti mittausepävarmuus riippuu nimenomaan havaittujen positiivisten määrästä. Arvo on melkein sama kummassakin tapauksessa. Viiden putken sarjan mahdollisuudet on käytetty loppuun, kun positiivisia on 4 kpl. 51 putken sarjan positiivisten määrää voitaisiin periaatteessa kasvattaa ja sitä kautta päästä pienentämään mittausepävarmuutta.

Usean laimennoksen tapaukset

On kolme tapaa arvioida luontainen hajonta usean laimennoksen tapauksessa:

- 1) Käytettävissä on tietokoneohjelma (esim. Hurley and Roscoe 1983), joka antaa paitsi MPN-arvon myös 95 % luottamusvälin ja suhteellisen keskihajonnan (log₁₀ arvon muodossa).
- 2) Kaupallisen systeemin valmistajan taulukoissa on ilmoitettu paitsi MPN myös 95 % luottamusvälin ylä- ja alalikiarvot. Laskuohje on esitetty mm. standardissa SFS-ISO 29201:2017, kohta D.2.
- 3) Jos kaupallisen valmistajan taulukot antavat vain MPN-arvot ilman luottamusvälin raja-arvoja, niin joko käytetään tietokoneohjelmaa (vaihtoehto 1) tai sovelletaan SFS-EN ISO 19036 laskukaavoja (alla).

SFS-EN ISO 19036:n monen laimennoksen kaava antaa tuloksen kymmenkantaisina logaritmeina. Kertomalla osoittaja 2,3026:lla tulos muuntuu luonnolliseen logaritmijärjestelmään eli suunnilleen suhteelliseksi epävarmuudeksi (RSD). Luonnollisessa logaritmijärjestelmässä kaava on:

$$s_{MPN} = \frac{1}{\mu \sqrt{\sum_{i=1}^k \frac{x_i m_i^2 e^{-m_i \mu}}{(1 - e^{-m_i \mu})^2}}}$$

missä

s_{MPN} = standardiepävarmuus \ln -asteikossa

μ = MPN-arvo yksiköissä pmy/ml tai pmy/g (ei logaritmiasteikon arvona)

m_i = näytteen määrä (ml tai g) yhtä siirrosta kohti laimennoksessa i

x_i = positiivisten tulosten määrä laimennoksessa i .

Sovellusesimerkki alkuperäisen kaavan käytöstä on esitetty mm. SFS-EN ISO 19036:2019 (Annex C). Sama periaate sopii yhtä hyvin myös yllä esitettyyn kaavaan.

Vesianalysejä varten tehdyissä taulukoissa MPN-arvot on yleensä ilmoitettu 100 ml:aa kohti, joten $\mu = \text{MPN}/100$.

Mutkikkaalta näyttävän kaavan soveltamiseksi kirjoitetaan se ensin muotoon

$$s_{MPN} = \frac{1}{\mu \sqrt{T}}$$

ja puretaan nimittäjässä oleva T sen edustamaksi yhteenlaskuksi:

$$T = \frac{x_1 m_1^2 e^{-m_1 \mu}}{(1 - e^{-m_1 \mu})^2} + \frac{x_2 m_2^2 e^{-m_2 \mu}}{(1 - e^{-m_2 \mu})^2} + \frac{x_3 m_3^2 e^{-m_3 \mu}}{(1 - e^{-m_3 \mu})^2} + \dots$$

Kannattaa huomata, että osoittajan kolmas tekijä $e^{-m_i \mu}$ esiintyy aina myös nimittäjässä.

Huom. Laimennokset, joissa kaikki kasvupaikat ovat positiivisia tai kaikki negatiivisia, eivät vaikuta lopputulokseen. Ne voidaan jättää pois laskuista.

Esimerkki L3. Monen laimennoksen luontaisen epävarmuuden arvioiminen kahdella tavalla

Bio-Rad menetelmän 96 kuopan mikrotiiterilevyä voidaan käyttää 2, 4 tai 6 laimennoksen MPN sarjana (64+32 tai 4x24 tai 6x16). Siirroksen tilavuus kuoppaa kohti on aina 0,1 ml, mutta laimennokset ovat 1/2, 1/20, 1/200 jne, minkä vuoksi oikeat koeannokset ovat 0,1 ml, 0,01 ml, 0,001 ml, jne. alkuperäistä näytettä tai sen testilaimennusta.

Oletetaan, että 64+32 kuopan systeemissä on havaittu 48/64 ja 7/32 positiivista. (64 kuopan sarjassa koeannokset olivat 0,1 ml ja 32 kuopan sarjassa 0,01 ml). Valmistajan taulukon mukaan MPN-arvo on tällöin 1482 tilavuudessa 100 ml ja sen 95 % luottamusvälin alaraja 1109 ja yläraja 1980.

- A) SFS-ISO 29201:2017 D.2 ohjetta noudattaen suhteellinen epävarmuus lasketaan ylä- ja alalikiarvojen luonnollisten logaritmien erotuksesta $u_{rel} = (\ln 1980 - \ln 1109) / 2 \times 1,96 = 0,5796 / 3,92 = 0,148 = 14,8 \%$.
- B) SFS-EN ISO 19036:2019 Annex C:n ohjeen mukaan laskettaessa kaavoihin sijoitetaan $\mu = 14,82/\text{ml}$, $x_1 = 48$, $m_1 = 0,1 \text{ ml}$, $x_2 = 7$, $m_2 = 0,01 \text{ ml}$.

$$T = \frac{48 \times 0,1^2 e^{-0,1 \times 14,82}}{(1 - e^{-0,1 \times 14,82})^2} + \frac{7 \times 0,01^2 e^{-0,01 \times 14,82}}{(1 - e^{-0,01 \times 14,82})^2}$$

$$= \frac{0,48 e^{-1,482}}{(1 - e^{-1,482})^2} + \frac{0,0007 e^{-0,1482}}{(1 - e^{-0,1482})^2} = 0,2144$$

$$S_{MPN} = \frac{1}{14,82 \sqrt{0,2144}} = 0,146 = 14,6 \%$$

Molemmilla tavoilla saatiin siis käytännöllisesti katsoen sama tulos.

Luontaisvaihtelun varianssi

Yhdessä erikoistapauksessa (Ilmanäytteen mikrobipitoisuuden arvio Andersen-keräimellä) tarvitaan yhden sarjan MPN-arvojen varianssin arvoja. Ne saadaan kaavasta:

$$\text{var}(MPN) = \frac{np}{(n-p)}$$

missä

n = sarjan kasvupaikkojen lukumäärä

p = positiivisten kasvupaikkojen lukumäärä.

Lisävaihtelun aiheuttajat ja vaikutukset

Mahdollisia lisävaihtelun syitä ovat tilavuusmittausten epävarmuus ja lukemaepävarmuus. On mahdollista, että lisävaihtelujen vaikutus epävarmuuteen saattaisi olla huomattava samalla tavalla kuin pesäkemenetelmissä. Nykyisissä MPN-systeemeissä ei käytetä varmistuksia lisävaihtelujen vaikutusten huomioimiseksi.

- (1) Nykyaikaisilla tilavuuden mittausvälineillä epävarmuus on pientä. Niistä on laboratoriolta havaintoja muiden menetelmien yhteydessä. Ovat tuskin merkittäviä.

- (2) Emilia Kentän Metropolia Ammattikorkeakoulun insinööriyössä vuodelta 2009 julkaistuissa tuloksissa on esimerkkejä MPN-menetelmän lukemaepävarmuudesta
<https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/2794/mittause.pdf?sequence=1>
- (3) Kentän tulosten perusteella voi olettaa lukemaepävarmuuden olevan yksittäisen paikan lukemisen osalta yleisesti 3 %:n luokkaa. Koska positiivisten kasvupaikkojen määrä on aina pienempi kuin siitä johtuva MPN-arvo, niin myös lukemaepävarmuus kasvaa positiivisten määrän kasvaessa ja on suurempi kuin yksittäisen kasvupaikan lukemaepävarmuus. Emilia Kentän työssä menetelmästä ja näytetyypistä riippuen lukemaepävarmuus oli keskimäärin 5 % -10 %. Lukemaepävarmuus voisi siis olla rajan 1:5 ylittävä merkittävä vaihtelun aihe varsinkin yhdistettynä henkilövaikutukseen. Laboratorion oman laadunvarmistuksen kannalta henkilövaikutus kannattaa mahdollisesti selvittää.
- (4) Jos matriisivaikutus luetaan osaksi mittausepävarmuutta, se voi elintarvikepuolella hyvin helposti ylittää merkittävän lisävaihtelun rajan.
- (5) Inkubaattorivaikutus, joka sisältää epämääräisen joukon tekijöitä inkubaatioajasta paikkaan hyllyillä, saattaa olla hyvinkin huomattava. Se näkyy lisävaihteluna rinnakkais tuloksissa. Emilia Kentän työssä tämä vaikutus arvioitiin olevan 10 % - 28 %. Tämä on hankala tutkittava, mutta epäilemättä kuuluisi laboratorion sisäisen laadunvarmistuksen aiheisiin.

Yhteenveto

Myös MPN menetelmiin voi liittyä niin suuresti luontaisen vaihtelun ylittävää hajontaa, että sen voi joutua ottamaan huomioon. Asiaa voitaisiin alustavasti tutkia arvioimalla laboratorion sisäistä uusittavuutta rinnakkaisista tuloksista, missä vaihdeltaisiin materiaalieriä, työntekijöitä ja inkubaattorioloja suunnitelmallisesti. Tuloksista laskettaisiin lisävaihtelu vähentämällä hajonnasta luontaisen vaihtelun osuus.

Liite 3 Mittausepävarmuuteen vaikuttavat tekijät kvalitatiivisissa menetelmissä

Mikrobien tunnistus- ja toteamismenetelmät ovat tyypillisesti laadullisia eli kvalitatiivisia ja tuloksena raportoidaan määrätyn mikrobin puuttuminen tai läsnäolo (todettu/ei todettu). Kvalitatiivisen menetelmän epävarmuuden arvioinnissa ei voida käyttää standardoituja mittausepävarmuuslaskennan menetelmiä.

Tästä huolimatta yksittäisten tulosten vaihtelulähteitä kuten reagenssien toimivuutta, laboratorion suorituskykyä, osaamista jne. tulee seurata ja arvioida. Lisäksi sellaisille menetelmille (esim. *L. monocytogenes* -bakteerin toteaminen), joille määritysraja on tärkeä tuloksen käytettävyyden kannalta, tulee siirrokseen liittyvä mittausepävarmuus arvioida. Vaakojen ja annostelijoiden tarkkuuden ansiosta se jäänee alhaiseksi. Kvalitatiivisille menetelmille voidaan laskea väärän positiivisen tai negatiivisen tuloksen todennäköisyys ja ilmoittaa tämä tulosten yhteydessä.¹⁵

Mikrobien tunnistusmenetelmän suhteellinen oikeellisuus tarkoittaa saadun tunnistustuloksen ja ”oikean” tuloksen vastaavuutta/lähekkäisyyttä tutkittaessa samaa näytettä tai testikantaa. Mikrobiologiassa oikeaa tulosta edustaa referenssimateriaalin tai pätevyyskokeen järjestäjän ilmoittama tulos.

Taulukko L1. Kvalitatiivisten testaustulosten ristiintaulukointi.

	oikea positiivinen	oikea negatiivinen	yhteensä
laboratorion tulos			
positiivinen	OP	VP	OP +VP
negatiivinen	VN	ON	VN + ON
yhteensä	OP + VN	VP + ON	N

¹⁵ ILAC G17 (2021).

Laboratorion menetelmän antaman tulosten virhepositiivisten osuus on

$$VP\% = \frac{VP}{VP + ON} 100\%$$

ja virhenegatiivisten osuus

$$VN\% = \frac{VN}{OP + VN} 100\%$$

missä

N = analysoitujen näytteiden/testikantojen määrä

VP = väärä positiivinen tulos (tulos todellisuudessa negatiivinen)

OP = oikea positiivinen tulos (tulos myös todellisuudessa positiivinen)

VN = väärä negatiivinen tulos (tulos todellisuudessa positiivinen)

ON = oikea negatiivinen tulos (tulos myös todellisuudessa negatiivinen).

Patogeenimikrobien tunnistuksen epävarmuutta seurataan ja arvioidaan kiinnittämällä huomiota menetelmän herkkyyteen, analyysimenetelmän kykyyn löytää esim. eri salmonellalajeja. Perinteisten kvalitatiivisten menetelmien lisäksi kvalitatiivisille immunologisille menetelmille kuten Vidas-patogeenianalysaattorille ja molekyylibiologisille menetelmille tulee arvioida mittausepävarmuuteen vaikuttavat tekijät.

Nimeke	Mikrobiologisten menetelmien epävarmuuden laskeminen Elintarvikkeet, vesi ja asumisterveys
Tekijä(t)	Metrologian neuvottelukunta
Tiivistelmä	<p>Oppaan tavoite on mahdollistaa yhtenäisten meneteltelyjen käyttö mikrobiologisten menetelmien mittausepävarmuuden arvioimisessa. Oppaassa on tarkoituksellisesti käsitelty sellaisia mittausepävarmuustekijöitä, joilla on arvioitu olevan merkittävä vaikutus tulosten mittausepävarmuuteen.</p> <p>Oppaassa käsitellään kokonaismittausepävarmuuden laskemista elintarvikkeetjun kvantitatiivisille menetelmille, kvantitatiivisten vesimikrobiologisten menetelmien mittausepävarmuuden arviointia, asumisterveysmenetelmien mittausepävarmuuden arviointia, huomioon otettavia asiakohtia muiden kvantitatiivisten menetelmien käyttöön otossa ja mittausepävarmuudessa, mittausepävarmuustietojen ilmoittamista asiakkaille ja käyttöä tulosten tulkinnassa sekä mittausepävarmuustietojen ylläpitämistä.</p> <p>Oppaassa on käsitelty teknisen epävarmuuden lisäksi laboratoriosuorituksesta riippumattoman hiukkastilastollisen hajonnan tulokseen aiheuttamaa epävarmuutta. Laboratorion on tunnettava mittausepävarmuuden merkitys tulokseen, vaikka sitä ei huomioitaisi tuloksen kokonaisepävarmuudessa.</p> <p>Opas on laadittu Metrologian neuvottelukunnassa.</p>
ISBN, ISSN, URN	ISBN 978-951-38-8794-0 ISSN-L 2242-1211 ISSN 2242-122X (Verkkojulkaisu) DOI: 10.32040/2242-122X.2024.T430
Julkaisuaika	Kesäkuu 2024
Kieli	Suomi
Sivumäärä	51 s. + liitt. 10 s.
Projektin nimi	
Rahoittajat	
Avainsanat	mikrobiologia, mittausepävarmuus, elintarvikkeet, vesi, asumisterveys, opas
Julkaisija	Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy PL 1000, 02044 VTT, puh. 020 722 111, https://www.vtt.fi/

Mikrobiologisten menetelmien epävarmuuden laskeminen

Elintarvikkeet, vesi ja asumisterveys

Oppaan tavoite on mahdollistaa yhtenäisten menettelyjen käyttö mikrobiologisten menetelmien mittausepävarmuuden arvioimisessa. Tämä opas on tarkoitettu palvelemaan erityisesti ns. rutiinilaboratorioita, jotka tarvitsevat menettelyä mittaustuloksen epävarmuuden arvioimiseen.

Oppaassa käsitellään kokonaismittausepävarmuuden laskemista elintarvikeketjun kvantitatiivisille menetelmille, kvantitatiivisten vesimikrobiologisten menetelmien mittausepävarmuuden arviointia, asumisterveysmenetelmien mittausepävarmuuden arviointia, huomioon otettavia asiakohtia muiden kvantitatiivisten menetelmien käyttöönotossa ja mittausepävarmuudessa, mittausepävarmuustietojen ilmoittamista asiakkaille ja käyttöä tulosten tulkinnassa sekä mittausepävarmuustietojen ylläpitämistä.

Opas on laadittu Metrologian neuvottelukunnassa.

ISBN 978-951-38-8794-0
ISSN-L 2242-1211
ISSN 2242-122X (Verkojulkaisu)
DOI: 10.32040/2242-122X.2024.T430



beyond the obvious