

## Controllo della ripetibilità del metodo

Su campioni di acqua destinata al consumo umano si dovrà effettuare il conteggio dei microrganismi presenti e considerando, come requisito minimo, i parametri indicati nel D.Lvo n. 31 del 2 febbraio 2001 relativo alla qualità delle acque destinate al consumo umano e applicando i metodi di prova o i metodi alternativi selezionati e approvati sulla base degli studi comparativi, così come richiesto dalla Direttiva Europea 83/98/CE.

La valutazione dell'incertezza di misura e della ripetibilità del dato analitico risulta molto critica ai livelli previsti dalla normativa. Vengono di seguito riportati alcuni modelli per il calcolo e la verifica della ripetibilità e dell'incertezza di misura all'interno dei laboratori.

Vista la complessità dell'argomento, la sua novità in campo microbiologico e la necessità di un progressivo approfondimento, si auspica che ogni laboratorio sperimenti e verifichi al suo interno l'applicabilità dei metodi proposti.

È necessario innanzitutto specificare che, per i controlli analitici da effettuare in microbiologia delle acque, per ciascun metodo dovrà essere fornito almeno il valore di ripetibilità interno del laboratorio.

Per calcolare la ripetibilità di un metodo è necessario che uno stesso operatore svolga una serie di almeno 10 prove sullo stesso campione di acqua. Il valore medio dovrà essere calcolato nel modo consueto per ciascuna serie di prove effettuate. Calcolare lo scarto quadratico medio mediante la seguente formula.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n-1}}$$

dove:

$x_m$  = valore medio calcolato

$x_i$  = valore riscontrato nella  $i$ -esima prova

$n$  = numero di prove

Il valore di ripetibilità  $r$  è quindi calcolato con la formula

$$r = \sqrt{2} \cdot t \cdot s$$

dove:

$t = t$  di Student relativo al numero di prove svolte ed ai gradi di libertà considerati relativamente al 95% di probabilità: per 10 prove il  $t$  di Student vale 2,2622.

In questo caso quindi il valore  $r$  corrisponde a

$$r = 3,2 \times s$$

Per valori di lettura compresi fra 0 e 15 U.F.C è possibile riferirsi alla Tabella 1 rilevata dalla norma ISO 7218: 1996 "Microbiology of food and animal feeding stuff - General rules for microbiological examinations" per le singole specie di microrganismi e alla Tabella 2, estratta dalla stessa norma, per la valutazione della carica batterica.



Quando si devono esaminare campioni di acqua in alimentazione agli impianti di potabilizzazione oppure provenienti da corsi d'acqua o bacini superficiali è probabile riscontrare valori di microrganismi superiori a 20 unità. Pertanto, in questi casi, è consigliabile valutare l'incertezza di misura applicando il modello di distribuzione di Poisson e calcolare la "ripetibilità" in termini di scarto tipo di questa distribuzione.

Sulla base del modello di distribuzione di Poisson si ha che:

- il valore della varianza è numericamente uguale al valore del conteggio effettuato (C);
- lo scarto tipo risulta essere la radice quadrata del conteggio stesso.

Per una singola prova si può pertanto accettare che l'intervallo di confidenza sia assunto come :

$$C \pm 2 \times s$$

dove:

C = conteggio delle colonie presenti nel terreno di coltura;

s = scarto tipo espresso come  $C^{0.5}$ .

Il controllo della ripetibilità del dato analitico può essere effettuato eseguendo prove in doppio (stesso campione e stesso operatore) e verificando poi se la seguente equazione viene rispettata :

$$|X_1 - X_2| \leq 2 \times \sqrt{X_1 + X_2}$$

dove:

$X_1$  e  $X_2$  sono rispettivamente i due conteggi della prova ripetuta.

Se  $|X_1 - X_2| \leq 2 \times \sqrt{X_1 + X_2}$  la differenza è accettabile

Se  $|X_1 - X_2| \leq 3 \times \sqrt{X_1 + X_2}$  la differenza è accettabile con riserva

Se  $|X_1 - X_2| > 3 \times \sqrt{X_1 + X_2}$  la differenza è anomala

Se l'espressione data viene rispettata è possibile effettuare la media delle due prove per dare il valore, espresso come conteggi, nel campione in esame.

ESEMPIO: Supponiamo di avere riscontrato i seguenti valori in due prove consecutive indipendenti effettuate sullo stesso campione dallo stesso operatore  $X_1 = 20$  e  $X_2 = 29$ ; avremo che la differenza in termini numerici è 9 e la radice quadrata della somma è 7 (che è anche il valore dello scarto tipo di  $(X_1 - X_2)$  secondo la distribuzione di Poisson).

Pertanto 9 è minore di  $(2 \times 7) = 14$ , quindi la differenza viene accettata.

ESEMPIO: Supponiamo di avere riscontrato i seguenti valori in due prove consecutive indipendenti effettuate sullo stesso campione dallo stesso operatore  $X_1 = 17$  e  $X_2 = 32$ ; avremo che la differenza in termini numerici è 15 e la radice quadrata della somma è 7 (che è anche il valore dello scarto tipo di  $(X_1 - X_2)$  secondo la distribuzione di Poisson) pertanto 15 non è minore di  $(2 \times 7) = 14$ , ma è minore di  $(3 \times 7) = 21$ , quindi la differenza viene accettata con riserva.

ESEMPIO: Supponiamo di avere riscontrato i seguenti valori in due prove consecutive indipendenti effettuate sullo stesso campione dallo stesso operatore  $X_1 = 13$  e  $X_2 = 36$ ; avremo che la differenza in termini numerici è 23 e la radice quadrata della somma è 7 (che è anche il valore dello scarto quadratico medio di  $(X_1 - X_2)$  secondo la distribuzione di Poisson).

Pertanto 23 non è minore di  $(2 \times 7) = 14$ , non è minore di  $(3 \times 7) = 21$ , ma è maggiore di  $(3 \times 7) = 21$  quindi la differenza è anomala.

Tabella 1 (informativa) - Limiti dell'intervallo di confidenza a livello di significatività 95% del conteggio effettuato su una capsula di Petri.

Numero di microrganismi <sup>1)</sup>	Limite di confidenza		Errore percentuale <sup>2)</sup>	
	inferiore	superiore	inferiore	superiore
1	< 1	6	- 97	+ 457
2	< 1	7	- 88	+ 261
3	< 1	9	- 79	+ 192
4	1	10	- 73	+ 156
5	2	12	- 68	+ 133
6	2	13	- 63	+ 118
7	3	14	- 60	+ 106
8	3	16	- 57	+ 97
9	4	17	- 54	+ 90
10	5	18	- 52	+ 84
11	6	20	- 50	+ 79
12	6	21	- 48	+ 75
13	7	22	- 47	+ 71
14	8	24	- 45	+ 68
15	8	25	- 44	+ 65

<sup>1)</sup> Equivalente al numero di colonie presenti

<sup>2)</sup> Riferito al conteggio dei microrganismi della 1ª colonna

Tabella 2 (informativa) - Limiti dell'intervallo di confidenza a livello di significatività 95% del conteggio effettuato su due capsule di Petri

Numero di colonie <sup>1)</sup>	Numero di microrganismi	Limite di confidenza		Errore percentuale <sup>2)</sup>	
		inferiore	superiore	inferiore	superiore
1	1	< 1	3	- 97	+ 457
2	1	< 1	4	- 88	+ 261
3	2	< 1	4	- 79	+ 192
4	2	1	5	- 73	+ 156
5	2	1	6	- 68	+ 133
6	3	1	6	- 63	+ 118
7	4	2	7	- 60	+ 106
8	4	2	8	- 57	+ 97
9	4	2	9	- 54	+ 90
10	5	2	9	- 52	+ 84
11	6	3	10	- 50	+ 79
12	6	3	10	- 48	+ 75
13	6	3	11	- 47	+ 71
14	7	4	12	- 45	+ 68
15	8	4	12	- 44	+ 65
16	8	5	13	- 43	+ 62
17	8	5	14	- 42	+ 60
18	9	5	14	- 41	+ 58
19	10	6	15	- 40	+ 56
20	10	6	15	- 39	+ 54
21	10	6	16	- 38	+ 53
22	11	7	17	- 37	+ 51
23	12	7	17	- 36	+ 50
24	12	8	18	- 36	+ 49
25	12	8	18	- 35	+ 48
26	13	8	19	- 35	+ 47
27	14	9	20	- 34	+ 46
28	14	9	20	- 34	+ 45
29	14	9	21	- 33	+ 44
30	15	10	21	- 32	+ 43

<sup>1)</sup> Conta totale su due capsule di Petri per lo stesso campione

<sup>2)</sup> Riferito al valore di microrganismi della colonna 2

