
Statistische onzekerheid met betrekking tot microbiologische analysetechnieken

Robert Abrams

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze presentatie mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen.

Inhoudstabel

1	Voorafgaande opmerkingen	4
2	Microbiologische testmethoden	4
2.1	Kwantitatieve testmethoden (QN).....	4
2.2	Kwalitatieve testmethoden (QL)	5
2.3	Microbiologie gerelateerde chemische testmethoden	5
2.4	Fysische methoden.....	5
2.5	Alternatieve technieken die worden gebruikt bij de uitvoering van de klassieke QN en QL testmethoden.	5
2.6	Determinatie van micro-organismen.....	5
3	Definities – statistische factoren die een rol spelen bij onzekerheid	6
3.1	Enkele algemene begrippen van statistiek	6
3.2	Verzamelingen	6
3.2.1	Soorten verzamelingen.....	6
3.2.2	De normaalverdeling.....	6
3.2.3	Boxplot	9
3.3	Wat is onzekerheid	9
3.3.1	Onzekerheid.....	9
3.3.2	Accuraatheid	9
3.3.3	Juistheid, bias	9
3.3.4	Precisie	10
3.3.4.1	Herhaalbaarheid.....	11
3.3.4.2	Reproduceerbaarheid.....	11
3.3.4.2.1	Intralaboratorium reproduceerbaarheid	11
3.3.4.2.2	Interlaboratorium reproduceerbaarheid	11
3.3.5	Standaard onzekerheid (u)	12
3.3.6	Geëxpandeerde onzekerheid (U)	12
3.3.7	Expansiefactor (k).....	12
3.3.8	Gecombineerde standaardonzekerheid (u_c).....	12
3.3.8.1	Hoofdgeregels voor bepaling van gecombineerde onzekerheid	12
3.3.8.1.1	Somregel.....	12
3.3.8.1.2	Productregel.....	12
3.3.9	Onzekerheid bij QL-microbiologische testen	13
3.3.10	Poissonverdeling	13
3.3.10.1	Binomiaalverdeling	13
3.3.10.2	Poissonverdeling	14
3.3.11	Poissonverdeling – relatie met microbiologie	15
3.3.12	Waarom zijn microbiologische tellingen logaritmisch normaal verdeeld?	16
3.3.13	Kritisch relatief verschil – geometrische relatieve standaardafwijking.....	16
3.3.14	Uitbijters	16
3.3.14.1	meenemen of niet in de berekeningen?	16
3.3.14.2	bepalingswijzen	17
3.3.14.2.1	Dixon's toets	17
3.3.14.2.2	Grubb's toets	17
3.3.15	Toepassing van statistische toetsen:.....	18
3.3.15.1	χ^2 -toets	18
3.3.15.2	F-toets (Fisher's toets)	18
3.3.15.3	T-toets (Student's T-toets).....	19
3.3.15.4	overige statistische testen	20
3.3.15.4.1	Youden-plot	20
4	Statistische factoren die een rol spelen bij microbiologische analyses	21
4.1	Algemene en voorafgaande overwegingen	21
4.2	Omgevingsgebonden factoren	22
4.2.1	Opslagomstandigheden (deels voorafgaande aan de laboratoriumactiviteiten)	22
4.2.2	Cultuurmedia en reagentia	22
4.2.3	Apparatuur en materiaal	22
4.2.4	Analysegebonden	23
4.2.4.1	Analysemethode.....	23
4.3	Monster (matrix) gebonden factoren	23

4.3.1	Voorafgaande aan de laboratoriumactiviteiten	23
4.3.2	Matrix	24
4.4	Manipulatiegebonden factoren (laborant).....	24
4.4.1	Bemonsteren (representativiteit).....	24
4.4.2	Afwegen	24
4.4.3	Verdunnen (QN).....	24
4.4.4	Uitplaten.....	25
4.4.5	Aflezen	26
4.4.6	Tellen en interpreteren (telonzekerheid).....	26
4.4.7	Bevestigen	27
4.4.8	berekenen.....	27
4.5	Residuele factoren:.....	27
4.6	Samenvattend.....	27
4.7	Nog even over bias.....	28
5	Aandachtspunten en voorbeelden bij de opstelling van een onderzoeksplan voor de bepaling van de meetonzekerheid	30
5.1	matrix en matrixgroepen	30
5.2	Besmetting.....	31
5.2.1	welke stammen	31
5.2.2	welk niveau	31
5.2.3	natuurlijke vs. kunstmatige besmetting.....	31
5.3	Enkele bijzondere analysetechnieken	32
5.3.1	MPN methoden	32
5.3.2	Overige	34
5.4	kwalitatieve testen (QL): detectielimiet.....	34
5.5	keuze van statistische technieken (QN)	35
5.5.1	onafhankelijke analyses	35
5.5.2	gepaarde duplomonsers	35
5.6	onderzoeksplannen	36
5.6.1	Kwantitatieve testen (QN).....	36
5.6.2	Kwalitatieve testen (QL).....	36
5.7	continue toetsing.....	36
5.8	enkele handige software tools voor berekening en toetsing (NMKL, andere).....	37
6	Haalbare en realistische criteria van meetonzekerheid	37
6.1	studies, literatuur, overige beschouwingen	37
7	Relatie met beoordeling van laboranten.....	38
8	Publicaties – naslagwerken.....	39

Acht figuren en veertien tabellen toegevoegd.

Formules zijn rechts uitgelijnd genummerd.

Verwijzingen naar referenties, zoals vermeld in hoofdstuk 7, zijn in *cursief* en tussen haakjes toegevoegd.

Twee Excel werkdocumenten bijgevoegd:

- Excel werkdocument voor toepassingen van deze syllabus
- Excel werkdocument van de Noorse School voor Diergeneeskundige Wetenschappen, gebaseerd op de NMKL norm nr. 8, 2002, tweede editie. Measurement of uncertainty in microbiological examinations of Foods.

1 Voorafgaande opmerkingen

1. In deze syllabus worden voor dezelfde begrippen en definities dikwijls meerdere symbolen of omschrijvingen gebruikt. Het is zeker niet de bedoeling om hierdoor verwarring te scheppen. Naargelang de referentiebron (gekoppeld aan bepaalde auteurs, aan bepaalde landen, de ontdekker, enz.), worden deze verschillende symbolen en definities preferentieel of zelfs exclusief gebruikt. Men zal hier dus onvermijdelijk mee geconfronteerd worden bij raadpleging van meerdere naslagwerken. Het is dus belangrijk om de gemeenschappelijke achterliggende betekenis van deze begrippen te vatten.
2. Het is dikwijls zo dat voor hetzelfde begrip in de statistiek er twee (of meer!) uitdrukkingen bestaan, waarbij de eerste eerder de mate van overeenkomen met de ware waarde uitdrukt, terwijl het tweede de nadruk legt op de afwijking ervan.

Enkele belangrijke voorbeelden:

- accuraatheid – onzekerheid
- juistheid – bias
- precisie – spreiding
- waarschijnlijkheidsgebied - uitzonderingsgebied

Deze begrippen komen verderop in deze syllabus meer in detail aan bod en worden bewust door elkaar gebruikt om de lezer eigen te maken met beide omschrijvingwijzen. Indien er nog andere courante belangrijke omschrijvingwijzen bestaan zijn deze ook tussen haakjes toegevoegd in de tekst.

3. In statistische formules betekenen Griekse lettersymbolen dat de resultaten gebaseerd zijn op de totaliteit van de verzamelingen. In de praktijk zijn deze bijna steeds niet gekend, en moeten de resultaten gebaseerd worden op een beperkte reeks waarnemingen. In dit geval worden dan gewone lettersymbolen gebruikt.
4. Voor een goede uitvoering van bacteriologische analysetechnieken, en bijgevolg ook om de meetonzekerheid ervan te bepalen, wordt er in deze syllabus van uit gegaan dat alle basistechnieken van goede laboratoriumpraktijken, zoals beschreven in ISO 7218 (16), worden toegepast.
5. Tabellen in Excelvorm zijn ook in het afzonderlijk bijgevoegd Excel werkdocument ter beschikking, en kunnen daar als oefening gebruikt worden.
6. Doorheen deze syllabus wordt stelselmatig de bepalingmethode van de meetonzekerheid, zoals voorgesteld in de ISO-norm 19306, als “eerste keuze” methode voor kwantitatieve analysetechnieken naar voor geschoven. Zij wordt omschreven als “global approach”. Er wordt dan ook zeer regelmatig naar verwezen doorheen deze syllabus.

2 Microbiologische testmethoden

2.1 Kwantitatieve testmethoden (QN)

Kwantitatieve microbiologische analysemethoden (ook telmethoden genoemd) hebben alle gemeen dat ze het aantal levensvatbare micro-organismen bepalen in een bepaalde hoeveelheid onderzocht monster.

In de **klassieke** telmethoden wordt dit aantal meestal uitgedrukt als “kolonievormende eenheden” (kve), omdat deze eenheden in staat zijn om macroscopisch waarneembare kolonies te vormen op een vast cultuurmedium, of in een vloeibaar medium via de MPN-techniek¹. Bij deze laatste techniek is de benaming kve eigenlijk niet echt correct, vermits hier geen kolonies worden gevormd, maar alleen groei

¹ MPN-techniek: Most Probable number techniek, in het Nederlands ook genoemd de techniek van het Meest Waarschijnlijke Aantal.

(troebeling) wordt vastgesteld. Via statistische interpretatie kan hier echter omgerekend worden naar “kve’s”.

Alternatieve bepalingwijzen kunnen een andere telbasis hebben, maar deze wordt meestal terug gerelateerd naar de klassieke “kve”-eenheid (vb. Fluorimetrische cytometrie als kwaliteitsonderzoek van melk).

De algemene flow van kwantitatieve methoden kan worden voorgesteld zoals weergegeven in fig. 8 achteraan deze syllabus.

2.2 Kwalitatieve testmethoden (QL)

Kwalitatieve microbiologische analysemethoden tonen aan of er al dan niet leefbare micro-organismen van een bepaalde soort aanwezig zijn in een bepaalde hoeveelheid monster. Men spreekt ook van “aantoonbaarheid”, “grensreactie”. Hierbij wordt dus niet gekwantificeerd.

Men kan stellen dat er op dit ogenblik geen echte consensus bestaat over de wijze van bepaling en uitdrukking van de (meet)onzekerheid aangaande de detectielimiet bij deze methoden.

Kwalitatieve testmethoden vallen dan ook buiten de scope van deze syllabus. Verderop worden er toch enkele vrijblijvende overwegingen dienaangaande geformuleerd (zie hoofdstuk 5.4).

2.3 Microbiologie gerelateerde chemische testmethoden

In bepaalde matrixdomeinen worden ook kwantitatieve chemische analysemethoden toegepast voor bepaling van analytes die door microbiologische activiteit worden gevormd. Dit is vooral het geval in de matrices (verse) vis en schaaldieren. Matrixeffecten kunnen hier een zeer grote variatie veroorzaken. Deze analyses vallen buiten het kader van deze syllabus.

2.4 Fysische methoden

Er bestaan ook meerdere alternatieve bepalingmethoden (zowel voor QN als voor QL technieken) die gebaseerd zijn op fysische kenmerken, welke een correlatie hebben met biologische of biochemische activiteit van de micro-organismen die worden onderzocht. Enkele toegepaste technieken zijn hier:

- ATP-meting (fluorescentie door verbruik van het ATP dat wordt gevormd door de micro-organismen), en
- impedantiemetrie (waarbij de invloed van micro-organismen op de impedantie van het cultuurmedium waarin ze groeien wordt gemeten).

Ook deze technieken vallen buiten het kader van deze syllabus.

2.5 Alternatieve technieken die worden gebruikt bij de uitvoering van de klassieke QN en QL testmethoden.

Hieronder vallen vb. het gebruik van de spiraalenter (voor QN methoden), het gebruik van de VIDAS apparatuur (voor QL methoden). De in deze syllabus bedoelde analysemethoden kunnen met aanwending van deze technieken evenzeer toegepast worden.

2.6 Determinatie van micro-organismen

Determinatie van micro-organismen speelt dikwijls een rol in zowel de QL als de QN microbiologische analysemethoden. In beide soorten toepassingen zal ze een invloed hebben op de meetonzekerheid. Dit wordt verder besproken in hoofdstuk 4.4.7.

3 Definities – statistische factoren die een rol spelen bij onzekerheid

3.1 Enkele algemene begrippen van statistiek

De wetenschap van statistiek kan in twee grote hoofdstukken worden onderverdeeld:

- de **beschrijvende statistiek**, die waarneembare feiten vastlegt en verwerkt
- de **verklarende statistiek**, die een verbinding maakt tussen de **kansberekening**, en de waargenomen feiten.

Kans kan men uitdrukken als de relatieve zekerheid dat:

- een bepaald feit of fenomeen zich voordoet, en/of
- de waarneming de ware waarde weergeeft.

3.2 Verzamelingen

Grootheden die waarneembaar / meetbaar zijn, kan men in **verzamelingen** onderbrengen.

3.2.1 Soorten verzamelingen

Verzamelingen zijn attributief of variabel, naargelang de kenmerken van hun samenstellende eenheden.

- **attributieve verzameling**: niet kwantificeerbaar (zoals vb. smaak, kwaliteit van vb. wijn, enz). Men kan hier wél een omzetting doen naar kwantificering (puntenschaal)
- **variabele verzameling**: wél kwantificeerbaar (uitdrukbaar in cijfers)

Een verzameling kan ook discreet of continu zijn

- in een **discrete verzameling** kunnen de grootheden slechts een beperkt aantal waarden hebben (zoals vb. de worpen van een teerling)
- in een **continue verzameling** kunnen de samenstellende eenheden (binnen bepaalde grenzen) gelijk welke waarde aannemen (vb. gewicht van een aardappel)

De resultaten van **kwantitatieve microbiologische metingen** kunnen beschouwd worden als attributieve verzamelingen, die omgezet zijn naar een discrete variabele verzameling, met een zo groot aantal mogelijke resultaten dat ze gelijk gesteld kan worden aan een continue variabele verzameling.

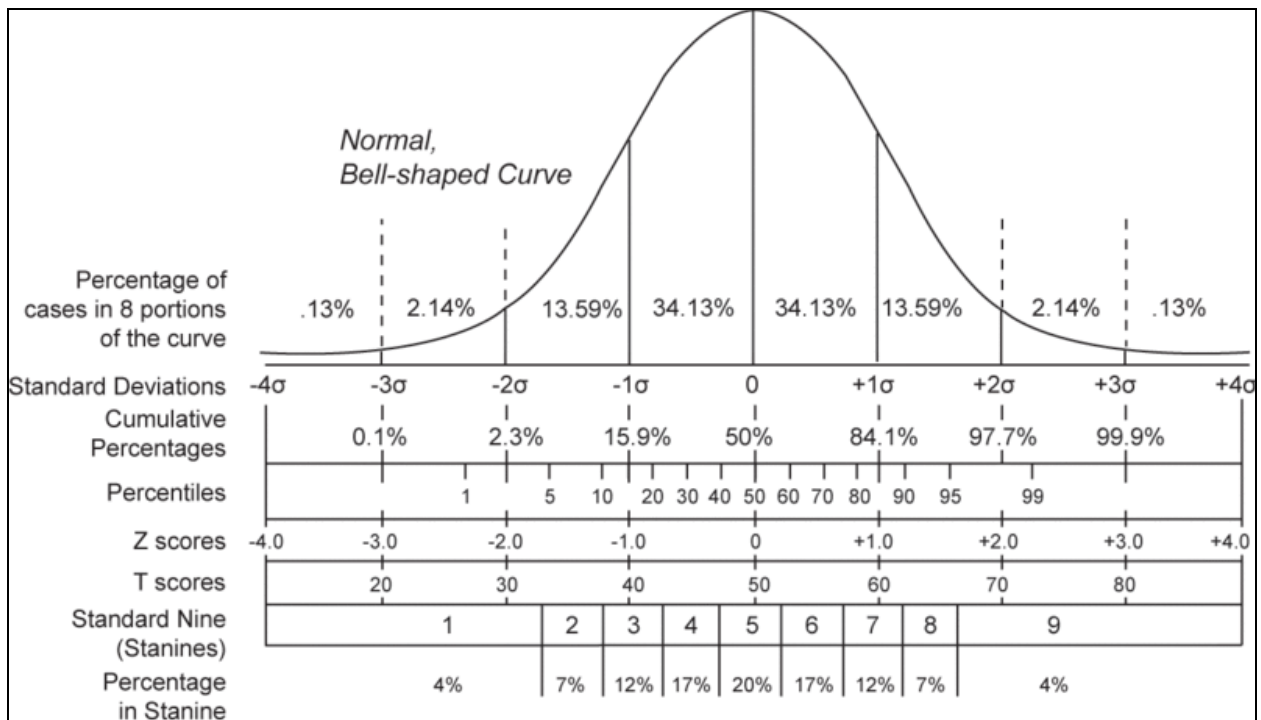
3.2.2 De normaalverdeling

Grootheden die voorkomen in de natuur hebben de neiging om – als verzameling - **normaal verdeeld** te zijn. Deze verdeling komt het best tot uiting in **grafiekvorm**.

Een normale verdeling is een verdeling die een aantal karakteristieke eigenschappen heeft:

1. de verzameling is symmetrisch verdeeld (de linkerhelft van de curve is een spiegelbeeld van de rechterhelft), er zijn dus evenveel metingen onder als boven het gemiddelde.
2. *het gemiddelde, de mediaan (de middelste meting), en de modus (de hoogste piek van de grafiek, dus de meting die het meeste voorkomt) vallen samen*

De **normaalverdeling** (of de curve van Gauss-Laplace) is een verdeling die kan berekend worden uit de theoretische kansberekening. Een klassiek voorbeeld hiervan is de kansverdeling van uitslagen met meerdere teerlingworpen. Als men het resultaat van meerdere worpen (reeds vanaf 4) in grafiek uitzet, bekomt men de grafiek zoals afgebeeld in onderstaande figuur 1.



Figuur 1: Normalverdeling (Gauss-curve) (17)

Deze figuur geeft ook nog enkele andere minder gebruikte klasse indelingen weer in relatie tot de Gauss-curve, zoals de T scores, en de Stanines. Dit valt eerder buiten de scope van deze syllabus.

Men spreekt ook enerzijds van het uitzonderingsgebied (aan de uiteinden van de curve), en anderzijds van het waarschijnlijkheidsgebied. (in het centrum).

Het uitzonderingsgebied is gelegen aan de uiteinden van de normaalverdeling, en duidt dus op resultaten die weinig frequent (en dus weinig waarschijnlijk) voorkomen.

Het waarschijnlijkheidsgebied is gecentreerd in het midden van de normaalverdeling, en betreft dus resultaten die frequent (en dus waarschijnlijk) voorkomen

Onzekerheid is de mate waarin een waargenomen resultaat afwijkt van de ware (echte) of de gemiddelde (berekende) waarde. De ware (gemiddelde) waarde is dikwijls niet gekend, en moet berekend worden uit (vele) waarnemingen. In hoofdstuk drie gaan we hier dieper op in. Voorafgaand volgen hier enkele algemene overwegingen

De eenheid van onzekerheid (ook dispersie, spreiding genoemd) rond het gemiddelde van een normaalverdeling wordt uitgedrukt als de standaardafwijking (standaarddeviatie, SD, σ).

Deze wordt berekend uit de variantie (σ^2 , **VAR**):

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum \delta^2 = \frac{1}{n} \sum (x - \mu)^2 = \frac{1}{n} \sum x^2 - \mu^2, \quad (17) \tag{1}$$

waarbij δ de verschillen zijn tussen de individuele metingen x , en het gemiddelde μ . De reden waarom eerst de variantie wordt berekend (via de gekwadrateerde verschillen), is dat via rechtstreekse berekening een nulwaarde zou uitgekomen worden. Positieve en negatieve verschillen zouden elkaar immers opheffen.

De standaardafwijking σ is dus een maat voor de toevallige meetonzekerheid. Ze is de vierkantswortel uit de variantie.

Waar de totale verzameling niet gekend is, maar moet geschat worden uit een steekproef – wat in de praktijk voor microbiologische analyses steeds het geval is - wordt de formule voor de variantie:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum \delta^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x - \bar{x})^2 = \frac{1}{n-1} \sum x^2 - \frac{n}{n-1} \bar{x}^2, \quad (2)$$

of ook nog, indien het gemiddelde niet gekend is:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \left(\sum x^2 - \frac{1}{n} (\sum x)^2 \right) \quad (3)$$

De standaardafwijking wordt dan s benoemd, en is de vierkantswortel uit s^2 .

hier kan een derde eigenschap van de normaalverdeling vermeld worden:

3. De curve van de normaalverdeling vertoont een beiderzijdse buiging op afstand σ (of s) van het gemiddelde μ (of het berekende gemiddelde uit de steekproef).

Bovenstaande figuur 1 is een “**genormaliseerde**” **normaalverdeling**, d.w.z. dat de gemiddelde waarde op nul gesteld is, en de standaardafwijking op 1:

De mate van afwijking van individuele metingen (“overschrijdingskans”) kan dan rechtstreeks worden uitgedrukt in verhouding tot de standaardafwijking. Dit is hetzelfde als de kans dat door zuiver toeval een gemeten waarde dergelijke afwijking vertoont van de ware (gemiddelde) waarde. Dit wordt uitgedrukt in de **Z-waarde**.

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}, \quad \text{waarbij het ware gemiddelde } (\mu) \text{ en standaardafwijking } (\sigma) \text{ gekend zijn} \quad (4)$$

Meestal wordt hierbij met enkele belangrijke standaard overschrijdingskansen gerekend. Deze kunnen tweezijdig (significante afwijking) of éénzijdig (significant groter of kleiner) worden uitgedrukt.

Enkele veelgebruikte waarden zijn weergegeven in onderstaande Tabel 1:

Waarschijnlijkheidsniveau	Z-waarde	
	tweezijdig	éénzijdig
95 %	1,96	1,64
95,4% *	2,00	
97,7%		2,00
99%	2,58	2,33
99,8%	3,00	
99,9%		3,00

Tabel 1: Enkele veel gebruikte overschrijdingskansen. *: dit niveau is weerhouden in de ISO-norm 19036.

3.2.3 Boxplot

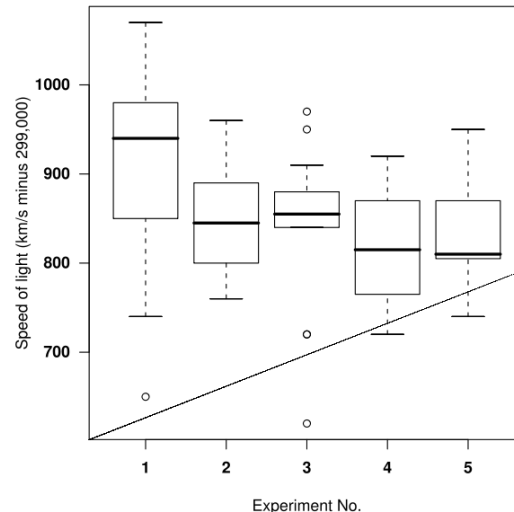
Een andere veel gebruikte weergavetechniek van een verzameling bekomen meetresultaten, is de boxplot, zoals weergegeven in onderstaande Figuur 2.

Figuur 2: Boxplot

Aangegeven zijn:

- Uitbijters (bolletjes) (zie voor verdere bespreking bij 3.3.14)
- onderste (geldige) waarde
- onderste kwartiel (25%-grens)
- mediaan
- bovenste kwartiel (75%-grens)
- bovenste (geldige) waarde.

Zie ook figuur 1 voor de relatieve ligging van de percentielen op de Gauss-curve.



3.3 Wat is onzekerheid

3.3.1 Onzekerheid

Onzekerheid (“*uncertainty of measurement*”) is de mate van afwijking van een waarneming van de ware waarde.

Onzekerheid wordt bepaald door twee soorten afwijkingen: de stelselmatige, en de toevallige. De totale samengevoegde onzekerheid bepaalt dan de **accuraatheid** (“*accuracy*”) van een meting (3, 10).

3.3.2 Accuraatheid

Accuraatheid wordt dus bepaald door de twee genoemde onzekerheden.

- de **systematische** overeenkomst (of afwijking) van een meting met de ware waarde wordt ook wel **juistheid** (de mate van overeenkomen, “*trueness*”) of ook wel **bias** (de mate van afwijking) genoemd. Het is de laatste term die veelal gebruikt wordt om dit aspect van meetonzekerheid te benoemen. Bias kan omschreven worden als de afwijking van het gemiddelde van de resultaten van een (grote) groep metingen t.o.v. de ware waarde.
- de **toevallige** overeenkomst (of mate van mogelijke afwijking), ook **precisie** (“*precision*”) genoemd. Men kan het ook definiëren als de mate van spreiding (dispersie, “*dispersion*”, “*scatter*”) van de individuele resultaten van de metingen rond het gemiddelde van de bekomen metingen.

3.3.3 Juistheid, bias

Bias is moeilijk te bepalen in het kader van QN microbiologische bepalingen, en al helemaal niet voor QL methoden. Men kan wel (gecertificeerde) referentiematerialen aankopen, en op basis van een aantal analyses een gemiddelde bepalen, dat een maatstaf is voor de bias. Nadeel van deze methode is dat

men een groot aantal variabele parameters uitsluit die de onzekerheid van microbiologische metingen bij routine onderzoeken bepalen. Belangrijke parameters (of het ontbreken hiervan) zijn hier o.a.:

- de variatie in besmettingsniveau (dat de onzekerheid van de verdunningen beïnvloedt)
- de variatie van begeleidende (storende) flora
- de variatie in matrixsamenstelling
- specifieke monstervoorbereiding (chocolade, boter, ...)

De juiste waarde die aan referentiematerialen kan verbonden worden, is bovendien steeds onrechtstreeks bepaald (via interlaboratorium onderzoeken, of via vergelijkende microbiologische technieken), aangezien er geen enkele methode bestaat om rechtstreeks levensvatbare micro-organismen te tellen .

Bias kan ook met een zekere mate van betrouwbaarheid via ringonderzoeken (3^e lijnscontrole, "proficiency testing") bepaald worden. Dezelfde nadelen (gebrek aan variatie in parameters die het resultaat beïnvloeden) gelden meestal ook voor deze bepalingwijze.

Referentiematerialen kan men o.a. verkrijgen via volgende instellingen:

- VWA-CHEK (http://www.vwa.nl/portal/page?_pageid=119,1639666&_dad=portal&_schema=PORTAL&_p_document_id=101846&_p_node_id=211840&_p_mode=BROWSE)
- PHLS (http://www.hpa.org.uk/cfi/quality/referencematerials/reference_materials.htm)
- EC Bureau van CRM's (http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/RM_Catalogue_2may07.pdf)
- Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/9641467>)
- CRM's van het Institut Pasteur te Lille (Fr). Coördinaten: <http://www.pasteur-lille.fr/fr/accueil/index.htm>

Ringonderzoeken (enkele voorbeelden):

- VWA-CHEK (http://www.vwa.nl/portal/page?_pageid=119,1639666&_dad=portal&_schema=PORTAL&_p_document_id=101846&_p_node_id=211837&_p_mode=BROWSE)
- Quality Management (<http://www.qualitymanagement.co.uk/products/schedules/2007/qms.htm>)
- FEPAS (<http://www.fapas.com/prog.cfm?currsch=fepas>)
- Zweeds schema (<http://www3.slv.se/absint/index.aspx?selected=start>)
- Smart QA (Lab M) (http://www.labm.com/news_press_release_details.htm?news_id=7)
- PHLS (<http://www.hpa.org.uk/cfi/quality/eqa/default.htm>)
- KIWA (<http://www.kiwa.nl/index-W.asp?id=548>)
- Reama: <http://www.itp.asso.fr/produitstransformes/tout/interlabo.htm#microbio>

3.3.4 Precisie

Precisie of spreiding kan onder verschillende omstandigheden worden bepaald. Hoe meer variabele factoren van invloed zijn op het resultaat van een meting, hoe groter de spreiding, of minder nauwkeurig de precisie wordt van een resultaat.

Meestal worden de bepalingsomstandigheden van de precisie in een van volgende klassen onderverdeeld:

- omstandigheden van **herhaalbaarheid** (repeteerbaarheid, "repeatability"), waarbij er naar gestreefd wordt om zoveel mogelijk bepalingsomstandigheden die betrekking hebben op een analyse **identiek** te houden
- omstandigheden van **reproduceerbaarheid** ("reproducibility"), waarbij er naar gestreefd wordt om zoveel mogelijk bepalingsomstandigheden **te laten variëren**.

Men kan meestal stellen dat een laboratorium voor microbiologie als één geheel "bepalingsinstrument" functioneert. Het is dan ook de precisie op niveau van het laboratorium als geheel, dat van invloed is op

de onzekerheid die verbonden is aan een analyseresultaat. Dit wordt dan ook als uitgangspunt genomen in de ISO-norm 19036.

3.3.4.1 Herhaalbaarheid

De bepaling van de precisie in omstandigheden van herhaalbaarheid is voor een microbiologisch laboratorium van weinig belang met betrekking tot de algemene accuraatheid van een analyseresultaat.

De dagdagelijkse onzekerheid van analyseresultaten wordt immers door omstandigheden van reproduceerbaarheid bepaald.

Zoals we verder zullen zien in hoofdstuk 5 (Onderzoeksplan), zal de bepaling van herhaalbaarheid voor microbiologische analyses slechts een rol spelen bij de opsporing van eventuele oorzaken die een (abnormaal) verhoogde spreiding onder omstandigheden van reproduceerbaarheid tot gevolg hebben. Deze herhaalbaarheid zal dan niet op niveau van het laboratorium, maar op een lager niveau (groep van laboranten, of individuele laboranten) bepaald worden, en – waar mogelijk – voor een welbepaalde invloedsfactor, zoals beschreven in hoofdstuk 5. Gradaties zijn hierin o.a. (niet limitatieve lijst!):

- duplobepalingen door het laboratorium als geheel
- duplobepalingen door éénzelfde laborant (of groep van laboranten)
- duplobepalingen op hetzelfde laboratoriummonster (twee submonsters voor analyse)
- duplobepalingen op eenzelfde initiële verdunning (hetzelfde submonster)
- seriebepalingen (6 à 10) onder de hierboven genoemde omstandigheden
- enz...

3.3.4.2 Reproduceerbaarheid

Het is belangrijk te noteren dat de variatie voornamelijk deze factoren betreft die niet (steeds) rechtstreeks meetbaar zijn door het laboratorium, of alleen steekproefsgewijs kunnen gecontroleerd worden vb. de kwaliteit van cultuurmedia.

Parameters die vastgelegd zijn in de algemene instructie voor microbiologische analyses (16), of in de specifieke normen, moeten steeds rigoureuus gevolgd en toegepast worden (tijden, t°, mengingstechnieken, afkoelingstechnieken, enz...)

3.3.4.2.1 Intralaboratorium reproduceerbaarheid

Zoals hierboven gesteld, weerspiegelen de omstandigheden van reproduceerbaarheid de reële precisie van de analyseresultaten van een microbiologisch laboratorium. Hierbij wordt rekening gehouden met alle (of toch zoveel mogelijke) variabele factoren die de meetonzekerheid beïnvloeden.

3.3.4.2.2 Interlaboratorium reproduceerbaarheid

Het betreft hier de meetonzekerheid die verbonden is aan analyseresultaten die in ringonderzoeken of validatiestudies worden verkregen, waaraan meerdere laboratoria deelnemen. Deze vorm van reproduceerbaarheid kan niet zonder meer vergeleken worden met de intralaboratoriumonzekerheid. Het niveau van invloed van meerdere variabele factoren is immers significant verschillend. vb.

- de matrix is meestal een geïdealiseerde matrix (zo homogeen mogelijk, zo weinig mogelijk storende invloeden)
- de flora is dikwijls vereenvoudigd (alleen gespikete bacteriestammen, geen natuurlijke stoorflora)
- het besmettingsniveau is dikwijls beperkt tot één of enkele discrete waarden, en dikwijls zeer laag in concentratie, waardoor een extra grote onzekerheid ontstaat.
- verschillende laboratoria kunnen ook verschillende analysemethodieken toepassen, die een extra factor aan de meetonzekerheid toevoegen.

Het is dus belangrijk dat, indien de resultaten van dergelijke ringonderzoeken worden gebruikt om de meetonzekerheid uit te drukken, de gebruikte referentiemonsters zoveel als mogelijk de status van

“natuurlijk” gecontamineerde matrices benadert. Soms is dit de enige weg dat een laboratorium kan gebruiken omdat natuurlijk besmette matrices niet direct ter beschikking staan.

Het is het onderdeel precisie, en bepaald op intralaboratorium niveau, onder omstandigheden van reproduceerbaarheid, dat in de praktijk als onzekerheid wordt weerhouden. De bias wordt hiertoe niet weerhouden. (ISO 19036, hoofdstuk 5.2.1, 5^e alinea)

3.3.5 Standaard onzekerheid (u)

Dit is de onzekerheid, uitgedrukt als standaardafwijking (s).

3.3.6 Geëxpandeerde onzekerheid (U)

Dit is de onzekerheid, uitgedrukt als s, maar vermenigvuldigd met een bepaalde expansiefactor (k).

$$U = u \cdot k$$

3.3.7 Expansiefactor (k)

Dit is een factor die de mate van waarschijnlijkheid vastlegt, waartussen de ware waarde van een meting zich bevindt. Standaard (en ook voorgesteld in ISO 19036) wordt voor k de factor 2 toegepast. Dit komt overeen met een overschrijdingskans (tweezijdig) van 95,4% (zie tabel 1). Benaderend en vereenvoudigend, wordt dit gelijkgesteld met **95%** (tweezijdig).

3.3.8 Gecombineerde standaardonzekerheid (u_c)

Dit is de samengevoegde onzekerheid, berekend uit de (gekende) onzekerheden, verbonden aan bepaalde factoren. Deze komen verderop in hoofdstuk 4 meer gedetailleerd aan bod.

Zoals we verderop zullen bespreken in hoofdstuk 5 (Onderzoeksplan), en ook wel hogerop vermeld in 3.3.4.1 (herhaalbaarheid) wordt dit in de praktijk **weinig of niet toegepast**, behalve indien de globaal bepaalde reproduceerbaarheid abnormaal hoge waarden aanneemt.

Desondanks is het belangrijk om de statistische principes te begrijpen die bijdragen tot de uiteindelijke algemene meetonzekerheid.

3.3.8.1 Hoofdregels voor bepaling van gecombineerde onzekerheid

3.3.8.1.1 Somregel

Dit is de regel die veelal van toepassing is in de microbiologie. De samengestelde variantie van een variabele c is gelijk aan de som van de varianties van de samenstellende onderdelen (vb. een weging en een verdunning)

$$\text{variantie: } u_c^2 = u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + \dots, \text{ of,} \tag{5}$$

uit de berekende varianties:

$$s_c^2 = s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + \dots \tag{6}$$

De vierkantswortel uit u^2 geeft de gecombineerde onzekerheid.

3.3.8.1.2 Productregel

De gecombineerde onzekerheid uit een product. Minder frequent van toepassing in de microbiologie.

Een typisch voorbeeld is de samengestelde onzekerheid bij de verdunning, waarbij de productregel moet toegepast worden. Zie formule (9) verderop in deze syllabus, en het Excel werkdocument, tabblad "Verdunningen".

Meer informatie kan teruggevonden worden in *referentie 4* van de literatuurlijst.

3.3.9 Onzekerheid bij QL-microbiologische testen

Er bestaat op dit ogenblik geen onderbouwde statistische benadering voor de bepaling van de meetonzekerheid voor QL-methoden. De enige parameters die hier als significant kan beschouwd worden, is de **detectielimiet** (aantoonbaarheidslimiet, "*detection capability*").

3.3.10 Poissonverdeling

We hebben in hoofdstuk 2.2.2 al vermeld dat de normaalverdeling kan berekend worden, en hebben daar het voorbeeld genoemd van vier worpen met dobbelstenen. In feite is dit voorbeeld een binomiaalverdeling, die bij een groot aantal waarnemingen nadert tot de normaalverdeling.

3.3.10.1 Binomiaalverdeling

Een **binomiaalverdeling** wordt gekenmerkt door drie parameters:

- de kans op succes: p
- de kans op falen: q
- het aantal proefnemingen: n

en waarbij $p+q = 1$

De algebraïsche ontwikkeling van de macht $(p+q)^n$ in zijn factoren geeft de binomiaalverdeling met n proefnemingen. Enkele voorbeelden:

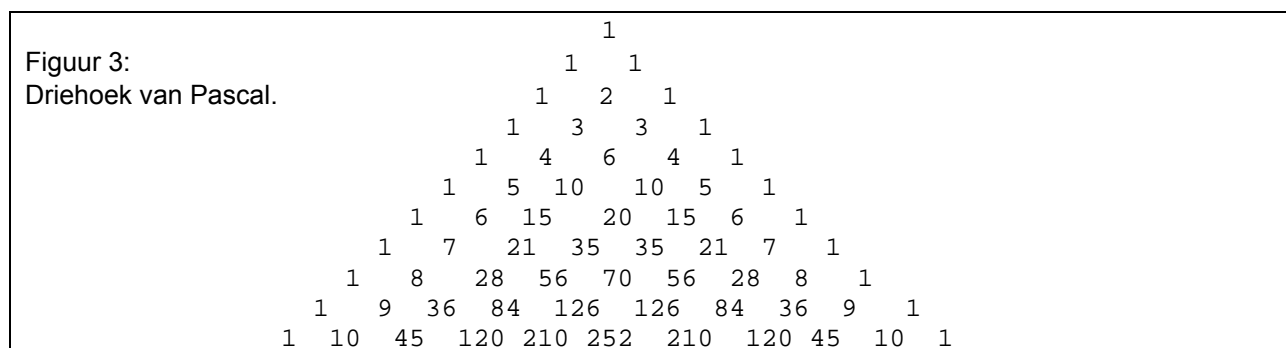
$$(p + q)^0 = 1$$

$$(p + q)^1 = 1p + 1q$$

$$(p + q)^2 = 1p^2 + 2pq + 1q^2$$

$$(p + q)^3 = 1p^3 + 3p^2q + 3pq^2 + 1q^3$$

Deze componenten kunnen ook in de "driehoek van Pascal" worden ontwikkeld, zoals weergegeven in Figuur 3. In dit specifieke geval is $p = q = 0,5$ (vb. let of munt gooien)



Deze driehoek heeft als speciale eigenschap dat elke cijfer de som is van de twee bovenstaande. De kansen op voorkomen ontwikkelen zich volgens het "binomium van Newton", en geeft een functie die vanaf $n.p > 6$ kan benaderd worden als een normaalverdeling.

NB. Let wel: deze verdelingen zijn discreet. Er dient hiervoor eigenlijk een correctie doorgevoerd te worden met een halve eenheid naar boven toe indien men ze als een normaalverdeling wil voorstellen.

Het gemiddelde μ van een binomiaalverdeling is gelijk aan $n.p$ (ook wel λ genoemd)

De variantie is gelijk aan $n.p.(1-p) = n.p.q$. De standaardafwijking is hiervan de vierkantswortel.

3.3.10.2 Poissonverdeling

De **Poissonverdeling** is een speciale binomiaalverdeling, waarbij p nadert tot 0, en q tot 1.

Dit doet zich voor bij natuurlijke fenomenen waar de **kans op succes veel kleiner is dan de kans op falen**.

Deze functie is van toepassing op vb. het aantal verkeersdoden in bepaalde omstandigheden, maar ook de kans op voorkomen van een **aantal "kve's"** in opeenvolgende verdunningen, en uiteindelijk ook in de Petripla(a)t(en) met de finale verdunning, waarop de tellingen worden verricht.

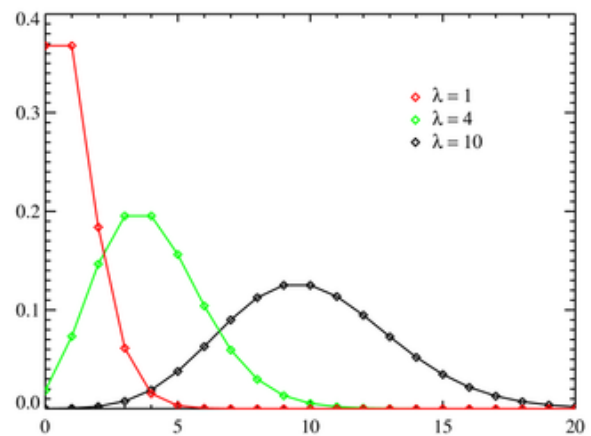
Dus wordt de variantie $n.p.q \approx n.p.1 = n.p = \mu$ (ook λ genoemd)

De standaardafwijking wordt de vierkantwortel uit λ .

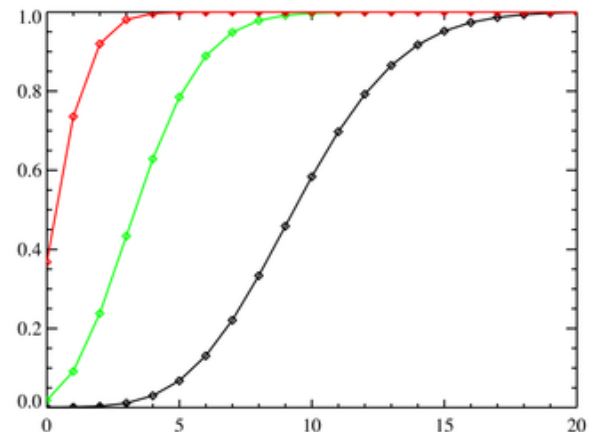
Hieruit volgt dat hoe lager de ware kve-hoeveelheid is in een oplossing of petriplaat, des te groter de standaardafwijking is op de individuele resultaten. Dit speelt vooral een rol in de finale verdunning in de petriplaat! Immers in de voorafgaande verdunningen zijn er veel meer kve's aanwezig.

Figuren 4 en 5 geven enkele voorbeelden van uitgewerkte Poissonverdelingen voor verschillende waarden van λ , waarbij deze discrete waarden aanneemt (alleen "hele waarnemingen" zijn mogelijk).

Figuur 4: uitgewerkte Poissonverdeling voor $n.p (= \lambda)$ gelijk aan 1, 4 en 10



Figuur 5: cumulatieve Poissonverdeling voor $n.p (= \lambda)$ gelijk aan 1, 4 en 10



3.3.11 Poissonverdeling – relatie met microbiologie

Zoals reeds vermeld, is de concentratie van kve's in oplossingen (verdunningsreeksen) en Petriplaten bepaald door de Poissonverdeling ("*Poisson scatter*"). Deze onzekerheid doet zich steeds voor, en is onafhankelijk van de nauwkeurigheid van alle andere factoren die de bijkomende onzekerheid bepalen.

Hoe lager de concentratie van kve's is, des te groter is het effect. Dit is ook de reden dat lage aantallen niet als ware waarden mogen gerapporteerd worden, maar eerder als "benaderende" waarde.

Tabel 2 is overgenomen uit ISO 7218:1996, en geeft de 95% waarschijnlijkheidsgrenzen van de ware waarde weer van lage aantallen kve's, berekend via de Poisson-distributie.

Number of microorganisms ¹⁾	Confidence limit at 95 % level		Percent error for the limit ²⁾	
	Lower	Upper	Lower	Upper
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

1) Equal to the number of colonies.
2) Compared to the microorganism count (1st column).

Tabel 2: 95% waarschijnlijkheidsgrenzen voor de ware waarde van lage tellingen.

Let op: de berekende waarschijnlijkheidslimieten in tabel 2 komen niet exact overeen met de in fig. 4 gestelde waarschijnlijkheden. Dit komt omdat er hier een afronding is gebeurd naar het dichtst bijzijnde discreet getal op de (tweezijdig) vastgelegde 95 % waarschijnlijkheidsgrenzen.

Of men nu telt in één of twee Petriplaten, maakt in wezen niets uit in relatie tot de Poisson-onzekerheid: de resultaten mogen gewoon samengeteld worden.

3.3.12 Waarom zijn microbiologische tellingen logaritmisch normaal verdeeld?

De reden waarom de **logaritmische** uitdrukking van microbiologische resultaten (eerder) een normaalverdeling volgt (tenminste met betrekking tot symmetrievorm van de verdeling), en niet de rekenkundige resultaten, is in feite hoofdzakelijk terug te voeren op het Poissoneffect.

Stel: een telresultaat in een Petriplaat is 100, van de verdunning -2. Het berekende resultaat is 10.000. De logaritmische uitdrukking is 4,00. Stel dat de standaardafwijking (berekend volgens de formule 8) gelijk is aan 0,15 log. De onderste waarschijnlijkheidsgrens is dan log 3,85. Numeriek is dit 7079. De bovenste waarschijnlijkheidsgrens is log 4,15 of numeriek 14125. Volgens de Poissonverdeling is de standaardafwijking de vierkantswortel van het gemiddelde. Als men deze berekent op de beide waarschijnlijkheidsgrenzen, en deze terug logaritmisch uitdrukt, ziet men dat ze evenredig verdeeld is rond die vierkantswortel, met een even grote spreiding. Onderstaande Tabel 3 geeft dit aan.

	μ	$\log_{10}(\mu)$		<i>logbasis</i>	σ	
	10.000	4	10.000	10	0,15	
		3,85	7.079	84	1,925	
		4,15	14.125	119	2,075	
					0,15	

Tabel 3: Excel rekentabel als bewijs dat de logaritmische verdeling van microbiologische resultaten een normaalverdeling volgt.

3.3.13 Kritisch relatief verschil – geometrische relatieve standaardafwijking

Het kritisch relatief verschil is het verschil in duplowaarden van hetzelfde monster (onder reproduceerbaarheidomstandigheden) met een 95% waarschijnlijkheidsgrens. Bij een bepaalde s van 0,15 log (algemeen voorkomende spreiding in de microbiologie voor homogene matrices: zie verder bij hoofdstuk 6 Realistische criteria), en gebaseerd op de normaalverdeling (zie Figuur 1), bekomt men waarschijnlijkheidsgrenzen van $2s = 0,3$ log. Rekenkundig uitgedrukt zijn deze grenzen (ongeveer) de helft en het dubbele van het bekomen resultaat. De duplobepaling van 100 kve's mag dus niet lager zijn dan 50 of hoger dan 200.

Dit kritisch relatief verschil is ook ingebouwd in de kwaliteitscontrole van nieuwe (batchen van) cultuurmedia, waarbij de opbrengst ("*performance ratio*", "*PR*") van een nieuwe batch van een niet selectief medium niet lager mag zijn dan 50 % (*PR*-ratio van 0,50) van een referentiemedium. Zie hiervoor verder bij ISO 11133-2:2003.

NB: in principe zou ze ook niet hoger mogen zijn dan 200%! Men gaat er echter geredelijk van uit dat dit geval zich niet voordoet.

3.3.14 Uitbijters

3.3.14.1 meenemen of niet in de berekeningen?

In principe is hierop **geen éénduidig antwoord** te geven.

Enkele overwegingen:

- "uitbijters" worden best verwijderd indien door kwaliteitscontroles aantoonbaar is dat ze geen "representatief" (juist, waar) resultaat vertegenwoordigen.
- indien de herhaalde analyses bedoeld zijn om zo nauwkeurig mogelijk de ware waarde van een microbiologische besmetting te bepalen in een monster (zoals vb. de ware waarde van een CRM, of van monsters in ringonderzoeken), dienen uitbijters uitgesloten te worden.
- indien de bekomen analyseresultaten bedoeld zijn om de reproduceerbaarheid van het laboratorium te berekenen, en er is geen aanwijsbare oorzaak of objectief bewijs via kwaliteitscontrole van het "afwijkend" gedrag van bepaalde resultaten, is het eerder aangewezen de uitbijters mee te nemen in de berekening van de meetonzekerheid, vermits deze resultaten ook zouden gebruikt worden als rapportering van routineresultaten.
- geen iteratieve bepaling van uitbijters (na verwijderen van andere uitbijters)

3.3.14.2 bepalingwijzen

3.3.14.2.1 Dixon's toets

Deze toets wordt gebruikt om na te gaan of er in een serie van onafhankelijke metingen (dus geen duplo's) zich uitbijters bevinden. Men gaat als volgt te werk:

- voorwaarde: de verdeling wordt verondersteld normaal te zijn!
- bepaal de waarden x die het verste (het minimum en het maximum van de meetwaarden) liggen van het gemiddelde
- bepaal het gemiddelde μ en de standaarddeviatie s van de overige meetwaarden
- controleer of het een uitbijter is:

1. als x groter is dan $(\mu + 3s)$ of kleiner is dan $(\mu - 3s)$ dan is de waarde een uitbijter en wordt deze verwijderd uit de oorspronkelijke set gegevens. Kijk ook na of het minimum of maximum van de resterende gegevens uitbijters zijn.
2. indien x kleiner is dan $(\mu + 3s)$ en groter is dan $(\mu - 3s)$ dan is de waarde geen uitbijter en worden geen gegevens verwijderd uit de oorspronkelijke set gegevens

3.3.14.2.2 Grubb's toets

Deze toets vertrekt van alle gegevens, en wordt uitgevoerd door Z-waarde (zie hogerop bij de genormaliseerde normaalverdeling) te berekenen van de vermoedelijke uitbijter. Indien voor een bepaald aantal metingen (N) de berekende Z-waarde van een verdacht resultaat groter is dan de in Tabel 4 aangegeven waarde, dan is het meer dan 95% waarschijnlijk (éénzijdige toets) dat het inderdaad een uitbijter is

N	Critical Z	N	Critical Z
3	1.15	27	2.86
4	1.48	28	2.88
5	1.71	29	2.89
6	1.89	30	2.91
7	2.02	31	2.92
8	2.13	32	2.94
9	2.21	33	2.95
10	2.29	34	2.97
11	2.34	35	2.98
12	2.41	36	2.99
13	2.46	37	3.00
14	2.51	38	3.01
15	2.55	39	3.03
16	2.59	40	3.04

17	2.62	50	3.13
18	2.65	60	3.20
19	2.68	70	3.26
20	2.71	80	3.31
21	2.73	90	3.35
22	2.76	100	3.38
23	2.78	110	3.42
24	2.80	120	3.44
25	2.82	130	3.47
26	2.84	140	3.49

Tabel 4: grenswaarden van Z voor 95-waarschijnlijkheid (éénzijdig) van uitbijter in N metingen (17).

3.3.15 Toepassing van statistische toetsen:

3.3.15.1 X^2 -toets

De X^2 -toets wordt gebruikt om na te gaan of een steekproefsgewijze bekomen verzameling wel overeenkomt met de theoretisch te verwachten waarden. Deze theoretische verzameling kan verschillende vormen aannemen (binomiaal, normaalverdeling, ...)

Het principe van de X^2 -test berust op de berekening van waarschijnlijkheid dat bekomen frequenties van resultaten (ingedeeld in een relevant aantal klassen) afwijken van de theoretisch te verwachten

$$X^2 = \sum_{i=1}^6 \frac{(N_i - e_i)^2}{e_i}$$

frequenties (ongeacht het type verdeling verwacht wordt):

(7)

In principe zijn microbiologische analyseresultaten normaal verdeeld. Deze test wordt dus in principe niet eerst toegepast om de onzekerheid van bepaalde microbiologische analysetechnieken te beoordelen, maar kan hiervoor toch gebruikt worden indien de resultaten een afwijking van deze verdelingsvorm laten vermoeden. Het is ook niet mogelijk deze test toe te passen op gepaarde duplomonsters (zoals voorgesteld in de ISO-norm 19036).

De X^2 -verdeling, afhankelijk van het aantal vrijheidsgraden (dit is het aantal onafhankelijke parameters) is zelf niet normaal verdeeld. Er wordt éénzijdig getoetst (aan de hoge kant van de curve). Voor tabellen wordt verwezen naar statistische naslagwerken (zoals de cursus Waarschijnlijkheidsberekening en statistiek van de VUB (12). Formule kan toegepast worden in Excel (CHITEST).

3.3.15.2 F-toets (Fisher's toets)

Wanneer we er van uitgaan dat de resultaten van een bepaalde microbiologische analysetechniek zich als een normaalverdeling gedragen, kan het nuttig zijn om verifiëren of de standaardafwijkingen van vb. twee groepen van analyseresultaten, verkregen via twee verschillende analysetechnieken, significant van elkaar verschillen. Er kunnen hiervoor geen gepaarde analyses worden uitgevoerd (we bespreken dit later in de "global approach", in hoofdstuk 4).

Wél kan men deze techniek toepassen op herhaalde analyses op hetzelfde monster, via twee verschillende testmethoden (liefst onder omstandigheden van reproduceerbaarheid in het laboratorium).

De **F-verdeling** wordt bekomen door de verhouding van de varianties van de beide verzamelingen (met n_1 en n_2 resultaten) te berekenen. De verdeling is zelf niet normaal verdeeld, en bepaald door de twee vrijheidsgraden van beide verzamelingen (n_1-1 en n_2-1). Tabellen zijn terug te vinden in de literatuur, en ook als standaardfunctie in Excel (FTEST). Meestal wordt éénzijdig getoetst op het 95% niveau (grote F-waarden). Een voorbeeld is uitgewerkt in het Excel werkdocument, tabblad Ongepaarde testen.

3.3.15.3 T-toets (Student's T-toets)

Als De F-toets heeft aangetoond dat er geen significant verschil is tussen de varianties van twee verzamelingen resultaten, dan kan de **T-toets** worden toegepast om te kijken of de gemiddelden van deze twee verzamelingen niet significant verschillen.

De **T-verdeling** is een "afgeplatte" normaalverdeling, waar men de echte waarden van gemiddelden en spreiding van de verdeling niet kent, maar deze benaderend moet berekenen uit de gevonden resultaten. Dit brengt een extra onzekerheid met zich mee (de afplatting)

De T-toets kan op drie verschillende wijzen worden toegepast:

- toetsen van één meting t.o.v. een serie andere metingen (is eigenlijk volledig analoog aan de Z-toets van de normaalverdeling, en zal eigenlijk in de praktijk veel meer toegepast worden, vermits de echte waarden van μ en σ niet gekend zijn)
- toetsen van twee series niet gepaarde testen (vb. vergelijking van 10 metingen van één dezelfde CRM met twee verschillende methoden) (zie voorbeeld in Excel werkdocument, tabblad Ongepaarde testen),
- toetsen van twee series gepaarde metingen. Als voorbeeld geldt hierbij de bekomen resultaten zoals beschreven in de tabel 1 in ISO 19036, en weergegeven in de hieronder staande tabel 5. De T-toets toont hierbij aan dat de resultaten tot dezelfde algemene verzameling behoren. Zie ook voorbeeld in Excel werkdocument, tabblad Gepaarde testen. Een vergelijking van de afzonderlijke varianties is hier niet mogelijk.

De in tabel 5 uitgewerkte formule voor berekening van de standaardafwijking is:

$$s_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

(8)

xiA	xiB	xiA-xiB	(xiA-xiB)kwadr./2		
4,83	4,94	-0,11	0,00605	T-toets: gepaarde testen, tweezijdig getoetst	
6,85	6,79	0,06	0,0018		
5,54	5,64	-0,1	0,005		43,76%
7	6,63	0,37	0,06845		
7,28	7,23	0,05	0,00125		
5,36	5,18	0,18	0,0162		
8,72	8,61	0,11	0,00605		
4	4,08	-0,08	0,0032		
4,48	4,11	0,37	0,06845		
8,04	8,34	-0,3	0,045		
			sum((xiA-xiB)kwadr./2)		
			0,22145		
			sum((xiA-xiB)kwadr./2)/10		
			0,022145		
			sqrt(sum((xiA-xiB)kwadr./2)/10)		
			0,15		

Tabel 5: uitgewerkt voorbeeld van bepaling van meetonzekerheid met gepaarde metingen op dezelfde monsters onder reproduceerbaarheidomstandigheden, en de T-toets om te bepalen of de waarden tot dezelfde verzameling behoren.

Ook hier kan voor tabellen met T-waarden verwezen worden naar de literatuur (12), en staan de formules ter beschikking in Excel (TTEST).

3.3.15.4 overige statistische testen

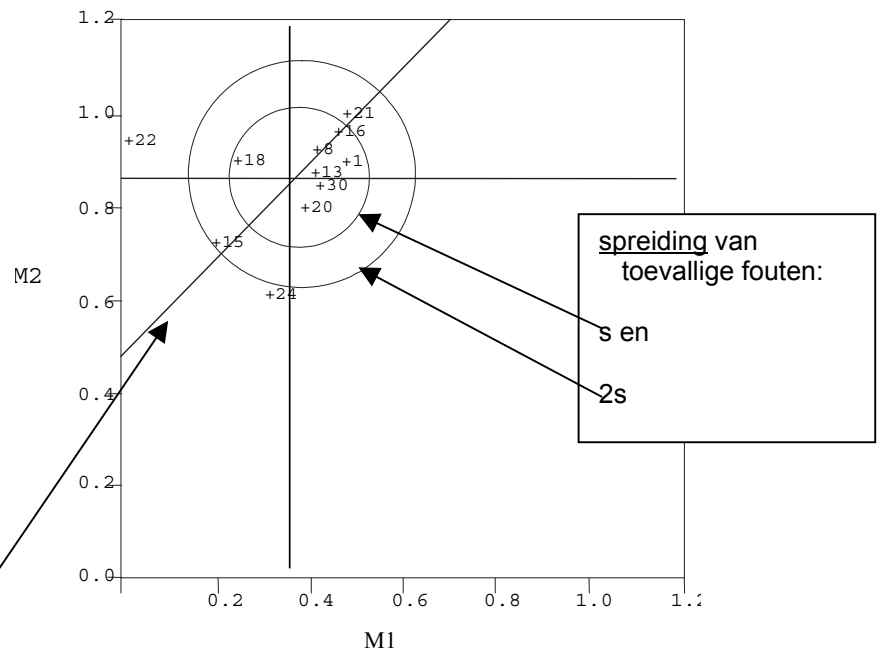
3.3.15.4.1 Youden-plot

Figuur 6: Voorbeeld van een Youden-plot

De Youden-plot geeft typisch resultaten weer van de resultaten van **twee onafhankelijke monsters** die in ringonderzoeken door meerdere laboratoria worden onderzocht.

Als er alleen toevallige fouten een rol spelen, zal de dispersie van het verschil tussen beide resultaten ook ad random zijn, en zullen de resultaten gelijkelijk verdeeld zijn rond het middelpunt (kruising van de beide gemiddelde waarden).

Indien een labo een bias vertoont, zal zijn gecombineerd resultaat langs de bissectrice liggen



Meer informatie kan o.a. geraadpleegd worden in de literatuur, en o.a. ook in een verklarend document van KIWA (15).

4 Statistische factoren die een rol spelen bij microbiologische analyses

De indeling van factoren die in dit hoofdstuk wordt weerhouden, is voornamelijk gebaseerd op de factoren die beschreven zijn in de referenties 2 en 4. Het inschatten van belangrijkheid van de afzonderlijke factoren komt ook overeen met de inschatting zoals beschreven in ISO 19036. Ze zijn onderverdeeld in vier grotere groepen:

- omgevingsgebonden (zie hoofdstuk 4.2),
- monster (matrix)gebonden (zie 4.3),
- manipulatiegebonden (zie 4.4), en
- overige (zie 4.5)

Deze groepen zijn eveneens weergegeven in figuren 7 en 8 (op einde van de syllabus), om visueel aan te duiden op welke niveau deze factoren een significante rol spelen.

4.1 Algemene en voorafgaande overwegingen

De meeste factoren die de onzekerheid mede bepalen, hebben meestal een verlaging van telling, of verhoging van detectielimiet, tot gevolg. Bepaalde parameters kunnen echter een omgekeerd effect hebben (slechte opslag van de monsters, onvoldoende selectiviteit door slecht toegepaste bebroedingsomstandigheden zoals vb. een te lage temperatuur, foutieve bevestigingstechnieken, enz...). Algemeen kan gesteld worden dat het risico op te lage telling of vals negatieve bepaling groter is dan een te hoge telling, of vals positieve aantoning.

Van vele parameters die de onzekerheid mee bepalen, kan (op eenvoudige wijze) geen correcte of zelfs maar benaderende inschatting gemaakt worden wat hun bijdrage is in het kader van de bepaling van de meetonzekerheid.

Gezien de zeer complexe invloeden op de meetonzekerheid (zie verder in dit hoofdstuk 4) wordt er in het algemeen gekozen (zoals beschreven in ISO 19036) voor een **globale benadering** ("*global approach*"). Dat wil zeggen dat er geen praktische breakdown van de mogelijke componenten gebeurt om de afzonderlijke invloed hiervan op de onzekerheid te bepalen. De bepaling gebeurt in één keer, door de globale meetonzekerheid te berekenen. Niet alle auteurs/onderzoekers zijn het hier mee eens. In referentie 4 van de literatuurlijst (gepubliceerd door het Centrum voor Metrologie en Accreditatie, Finland) verkiest men de afzonderlijke elementen van onzekerheid te onderzoeken, en dan door combinatie (zie verder bij 4.6) de algemene onzekerheid te bepalen. Let wel: dit is alleen maar mogelijk voor bepaalde invloedfactoren waarvan de onzekerheid gemakkelijk (afzonderlijk) meetbaar of berekenbaar is, en niet voor de totaliteit van alle factoren samen. We verwijzen hierbij ook naar de hierna volgende bespreking van de verschillende afzonderlijke factoren.

In de hierna volgende bespreking van de afzonderlijke factoren die meetonzekerheid veroorzaken, wordt er stelselmatig vermeld of (en in welke mate) ze meetbaar zijn, en of ze een belangrijke bijdrage leveren in de totale meetonzekerheid. De figuren 8 en 9 geven een algemeen voorbeeld van het traject voor QN en QL microbiologische analyses. Er is ook in aangeduid op welk niveau er een significante invloed is (kan zijn) van de hieronder beschreven groepen van factoren die de onzekerheid veroorzaken.

Overigens moeten **algemene richtlijnen** (ISO 7218) of **specifieke richtlijnen** (in de betreffende analysenormen, waaronder de serie ISO 6887) voor de toepassing van microbiologische analysetechnieken rigoureuus gevolgd worden, om de invloed van **alle** factoren die de onzekerheid beïnvloeden (zowel de meetbare als de andere) zoveel als mogelijk uit te schakelen.

De voornaamste bedoeling van de bepaling van meetonzekerheid is aan te tonen binnen welke waarschijnlijkheidsgrenzen het ware resultaat van een laboratoriumanalyse zich bevindt. Een laboratorium moet er voortdurend naar streven - met de hem ter beschikking staande infrastructuur,

apparatuur, materialen, reagentia, cultuurmedia, personeel, en testtechnieken – deze grenzen zo nauw mogelijk te houden.

Er moet op gewezen worden dat de invloedsfactoren die zich situeren vóór de monsterneming van het submonster in het laboratorium (maar met uitzondering van de intrinsieke eigenschappen van de te onderzoeken matrix) niet stelselmatig worden meegenomen in proefopzetten om de meetonzekerheid te bepalen (2, zie *aldaar* figuur 3). De heterogeniteit van de bacteriologische kwaliteit vb. doorheen een batch, en de invloed van de statistische bemonsteringstechniek van deze batch, spelen hier dus geen rol.

Zoals reeds eerder was aangehaald, en zoals verder uit dit hoofdstuk zal blijken, kan er dus al gesteld worden dat het - voor wat betreft de bepaling van de meetonzekerheid van kwantitatieve microbiologische analyses – praktisch onmogelijk is om alle invloedsfactoren afzonderlijk te gaan meten en een berekende gezamenlijke meetonzekerheid te bepalen. De benadering, zoals in ISO 19036 voorgesteld (“*global approach*”) is duidelijk te verkiezen.

De hierna volgende analyse van invloedsfactoren is (voornamelijk) gebaseerd op QN-analysen.

In hoofdstuk 4.4.2 worden nog enkele factoren besproken die van belang zijn bij QL-methoden, maar dit valt buiten de scope van deze syllabus.

4.2 Omgevingsgebonden factoren

4.2.1 Opslagomstandigheden (deels voorafgaande aan de laboratoriumactiviteiten)

Verkeerde opslagomstandigheden kunnen zowel een verlaagde als verhoogde telling veroorzaken. Algemeen is wel geweten dat invriezen, opslag in diepvries omstandigheden, en ontdooien in zekere mate, en met wisselend effect, verschillende kiemsoorten afdoodt.

Effect op onzekerheid: zeer moeilijk afzonderlijk in te schatten → global approach.

4.2.2 Cultuurmedia en reagentia

Samenstelling en kwaliteit spelen een cruciale rol in de performantie, selectiviteit, electiviteit, specificiteit, en robuustheid in het algemeen, van de verschillende soorten cultuurmedia en reagentia. We verwijzen voor meer gedetailleerde definities naar ISO 11133-2 (9).

Robuustheid (*robustness, ruggedness*) (18) van een analysetechniek is de mate waarin (de accuraatheid van het resultaat van) de betreffende testmethode wordt beïnvloed door “kleinere” variaties van de techniek. Enkele voorbeelden: kwaliteit van de reagentia, pH-stelling van reagentia, matrixeffecten op cultuurmedia, enz. Het is dus een algemene definitie die niet eenvoudig valt te testen, en ook niet in duidelijke grootheden kan uitgedrukt worden. Nochtans is het ten zeerste aangewezen dat de robuustheid van een analysetechniek zo groot mogelijk is.

Effect op onzekerheid: zeer moeilijk afzonderlijk in te schatten → global approach.

Kwaliteitscontrole speelt hier een grote rol (zie o.a. hogerop bij 3.3.13, en verschillende kwaliteitscontroletechnieken zoals o.a. ecometrie, bepaling van relatieve groei-index, en andere toepassingen zoals o.a. beschreven in ISO 11133-2) (9)

4.2.3 Apparatuur en materiaal

Enkele belangrijke algemene regels.

- Gebruik zoveel mogelijk apparatuur en materiaal waarbij de range van gebruik zo dicht mogelijk tegen de max. grenzen liggen. Zo klein mogelijke pipetten, dispensers, maatkolven, enz... Zo gevoelig mogelijke balansen, enz...

-
- Kalibreer zo veel als mogelijk
 - Volg steeds de voorschriften voor gebruik (vooral t° , tijd, enz...) (ISO 7218!)

Effect op onzekerheid: zeer moeilijk afzonderlijk in te schatten → global approach.

4.2.4 Analysegebonden

4.2.4.1 Analysemethode

Het betreft hier het geheel van alle parameters (t° tijd, samenstelling cultuurmedia, enz...). In feite spelen dezelfde criteria als bij de cultuurmedia afzonderlijk (performantie, selectiviteit, electiviteit, specificiteit, en robuustheid in het algemeen) hier ook een rol.

Er kan een interactie bestaan tussen enerzijds de analysemethode, en andere onzekerheidsparameters, vb.

- besmettingsniveau
- matrixeffecten (interactie met de cultuurmedia en reagentia)
- interfererende bacteriële flora

Verder heeft de analysemethode ook een invloed op de keuze en uitvoering van tal van andere testonderdelen, die op hun beurt de meetonzekerheid beïnvloeden:

- verdunningen (aantal)
- telniveau (voor QN microbiologische analyses), op zijn beurt weer afhankelijk van de aard van het telmedium
- aflezen (tellen)
- interpreteren: robuustheid van de interpretatieve kenmerken voor electiviteit en specificiteit
- bevestigen: van grote invloed op de nauwkeurigheid, wegens:
 - lage aantallen (Poisson invloed!)
 - stabiliteit en reproduceerbaarheid van de reactietesten.

Dergelijke interacties beïnvloeden sterk de robuustheid en dus ook de meetonzekerheid van de testmethode.

De beïnvloedingsfactoren, verbonden aan de aard van de analysemethodiek (niet aan de keuze!) valt eigenlijk buiten de bevoegdheid van het laboratorium.

Van bepaalde (zelfs officiële) methoden is het tenslotte gekend dat hun performantie t.o.v. andere methoden niet evenwaardig zijn.

Effect op onzekerheid: zeer moeilijk afzonderlijk in te schatten door het laboratorium zelf → global approach.

Laboratoria kunnen wél een vergelijking maken tussen verschillende soorten QL en QN technieken. We verwijzen hogerop naar het in 3.3.15.3 (T-toets) aangehaald voorbeeld in de tabel 5. Hierbij kunnen dan twee verschillende analysemethoden gebruikt worden. Ook QL testmethoden kunnen onderling vergeleken worden. Hierbij wordt voor meer details verderop verwezen naar 5.4..

4.3 Monster (matrix) gebonden factoren

4.3.1 Voorafgaande aan de laboratoriumactiviteiten

Zoals hogerop gesteld, vallen deze factoren buiten het kader van deze syllabus.

Meerdere factoren hebben hierbij nochtans een significante invloed op de representativiteit van de (analyseresultaten van een) monster in verhouding tot de gecontroleerde batch of productieproces:

-
- productiewijze
 - partij – batchsamenstelling
 - batchbemonstering
 - monsterbehandeling
 - transport naar het laboratorium

Effect op onzekerheid van de analyse: zeer moeilijk tot onmogelijk afzonderlijk in te schatten door het laboratorium zelf.

4.3.2 Matrix

Volgende (gekende) facetten bepalen mede het matrixeffect op de onzekerheid van microbiologische analysemethoden:

- intrinsieke matrixeffecten (inhibitie, beïnvloeding van het cultuurmedium, ...)
- homogeniteit
- representativiteit van de onderdelen (belangrijk bij nemen van analysemonster)
- begeleidende / storende flora (kwalitatief en kwantitatief)

Effect op onzekerheid: zeer moeilijk afzonderlijk in te schatten door het laboratorium zelf → global approach. De effecten van verschillende matrices zijn echter binnen deze global approach wel te bepalen via een geschikte proefopzet (zie verderop bij hoofdstuk 5.1).

4.4 Manipulatiegebonden factoren (laborant)

4.4.1 Bemonsteren (representativiteit)

Zeer wisselende invloed. Meestal niet zo belangrijk. Van zeer grote invloed op de meetonzekerheid voor bepaalde matrixtypes. Soms zeer complex. Invloed soms sterk gecorreleerd met de analyte (bacteriesoort of groep) die men wil bepalen (vb. totaal kiemgetal in gefermenteerde waren, ...).

De specifieke monstervoorbereiding kan ook een zeer significante rol spelen (chocolade, boter, enz...)

Laboranten moeten hierbij strikte regels volgen (ISO 7218 en ISO 6887).

Effect op onzekerheid: moeilijk afzonderlijk in te schatten door het laboratorium zelf → global approach. Het eventueel effect zal wel een rol spelen in die matrixgroepen waarbij deze kenmerken aanwezig zijn (zie verderop bij hoofdstuk 5.1).

4.4.2 Afwegen

Onder normale omstandigheden van zeer weinig invloed.

*Effect op onzekerheid: **gemakkelijk** afzonderlijk in te schatten door het laboratorium zelf → kan dus afzonderlijk onderzocht worden (repeteerbaarheid omstandigheden, desnoods voor individuele laboranten) indien de globale onzekerheid “abnormaal” hoog is.*

4.4.3 Verdunnen (QN)

Het belang hiervan wordt groter naargelang er meerdere verdunningen moeten aangelegd worden om tot telbare uitplatingen te komen.

“Normale” cijfers van standaardafwijking bij verdunningen (zonder bias) (*eigen bevindingen*):

- wegwerppipetten 1 ml – gebruikt pipetvolume 1 ml: 3%
- wegwerppipetten 1 ml – gebruikt pipetvolume 0,1 ml: 8%
- verdunningsbuizen 9 ml vóór het autoklaveren: 1%

- verdunningsbuizen 9 ml ná het autoklaveren: 3 %

NB. Onzekerheid van verdunningen wordt statistisch berekend als de relatieve variantie (RSD^2 , w^2):

$$w_f^2 = \frac{1}{(a+b)^2} \left[\frac{a^2 u_b^2 + b^2 u_a^2}{a^2} \right] = \frac{b^2}{(a+b)^2} (w_b^2 + w_a^2) \quad (4) \quad (9)$$

Waarbij:

- a = volume transfer
- b = verdunning blanco
- w_a = relatieve standaard onzekerheid van a
- w_b = relatieve standaard onzekerheid van b
- u_a = standaard onzekerheid van a
- u_b = standaard onzekerheid van b

In Tabel 6 is hiervoor een voorbeeld uitgewerkt:

a	1	ml	b2	81		Voor X verdunningen:		
b	9	ml	(a+b)2	100				
w a	3,0%		wb2	0,0009		X		4
w b	3,0%		wa2	0,0009		w2		0,005832
u a	0,03	ml	(wb2+wa2)	0,0018		w		0,0764
u b	0,27	ml				w (%)		7,6 %
			w2	0,001458				
			w	0,0382				
			s	0,38 ml				
			w (%)	3,8 %				

Tabel 6: relatieve meetonzekerheid in verband met verdunningen.

w_a en w_b zijn gemakkelijk experimenteel te bepalen. Best niet-microbiologische methoden gebruiken (vb. weging): veel nauwkeurigere kwantificering. w_b is eigenlijk op zichzelf ook een samengestelde onzekerheidsfactor (doseerpipet, en invloed van de bereiding in de autoclaaf).

De samengestelde meetonzekerheid moet berekend worden door toepassing van de **productregel** (zie 3.3.8.1.2)

De relatieve spreiding voor vier verdunningen in het voorbeeld van tabel 6 komt ongeveer overeen met de Poisson standaardafwijking van een gemiddelde concentratie kve's in een Petriplaat: 165 kolonies (= (300+30)/2), standaardafwijking 12,84 kve en relatieve standaardafwijking (RSD) 7,78 %.

*Effect op onzekerheid: **gemakkelijk** afzonderlijk in te schatten door het laboratorium zelf → kan afzonderlijk onderzocht worden (repeteerbaarheid omstandigheden, desnoods voor individuele laboranten) indien de globale onzekerheid "abnormaal" hoog is.*

4.4.4 Uitplaten

Zoals reeds vermeld in 3.3.11 is er een sterke relatie tussen enerzijds het aantal kve's dat zich in een Petriplaat bevindt, en de daaraan verbonden onzekerheid ten gevolge van de Poissonverdeling.

De bijkomende onzekerheidsfout van de finale verdunning bij het uitplaten (eventueel in meerdere Petriplaten) kan gemakkelijk berekend worden uit deze berekend voor de pipetteerfout, zoals beschreven in 4.4.3. De somregel voor gecombineerde onzekerheid is van toepassing voor uitplating in meerdere Petriplaten.

De productregel is van toepassing op de gecumuleerde onzekerheid van verdunnen en uitplaten (buiten het Poissoneffect).

Wanneer we de vergelijking maken tussen:

- enerzijds een "normale" onzekerheidsfactor die optreedt door vier verdunningen (zie Tabel 6), waarvan de derde en vierde gebruikt wordt voor uitplating (zie figuur 8 achteraan syllabus), en
- anderzijds de onzekerheidsfactor door Poisson scatter,

zien we dat vanaf een telling van kve's beneden de 175 de invloed van de scatter al groter wordt dan deze te wijten aan de verdunningen. Immers uit de regel dat de spreiding van het kve bij $\mu = 175$, gelijk is aan de vierkantswortel (13,23), volgt een relatieve standaardafwijking (w) van 7,6%

Zoals reeds gezegd in 3.3.11, heeft uitplating in duplo het effect dat de Poisson scatter daalt (met een factor 1,41, zijnde de vierkantswortel van 2), maar dat de uitplatingsfout vergroot (volgens de somregel).

4.4.5 Aflezen

De algemene formule voor berekening van het aantal kve's bij aflezing voor QN technieken, (zoals voorgesteld in ISO 7218) is:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \quad (10)$$

- Waarbij:
- er twee verdunningen worden meegenomen in de berekening ($n_1 = n_2 = 2$)
 - c de afzonderlijke tellingen zijn in alle Petriplaten
 - v het volume dat is gepipetteerd in elke Petriplaat (hetzelfde volume is verondersteld voor elke plaat)
 - n_1 het aantal platen dat in de eerste verdunning wordt meegeteld
 - n_2 het aantal platen dat in de tweede verdunning wordt meegeteld
 - d de rekenkundige verdunningsfactor is (tot aan de eerste verdunning die wordt meegeteld)

Een illustratie hiervan en de invloed van het al dan niet in duplo uitplaten en/of twee opeenvolgende verdunningen meenemen in de telling, is terug te vinden in Tabel 7.

Verdunning	Uitplating		som	d	n1	n2	v	N
	1	2						
3	156	174	371	3	2	2	0,1	1,7E+06
4	18	23						
w (Poisson)								
5,2%								

Tabel 7: effect van enkele en dubbele uitplating, en één of twee opeenvolgende verdunningen, op het telresultaat, en de Poisson scatter die deze beïnvloedt.

Effect op onzekerheid: **gemakkelijk** afzonderlijk in te schatten: dit is een theoretische berekening.

4.4.6 Tellen en interpreteren (telonzekerheid)

Telonzekerheid is normaal gezien klein, maar kan in uitzonderlijke gevallen toch een invloed hebben, o.a. door:

- hoge aantallen kiemen, waardoor eventueel determinatieve kenmerken voor interpretatie minder duidelijk worden, en/of dat er overlapping (en dus ondertelling) gebeurt
- het niet respecteren van voorgeschreven tijden
- matrixeffecten (controle uitplating zonder bebroeding ?)

*Effect op onzekerheid: **vrij gemakkelijk** afzonderlijk in te schatten voor het gedeelte verantwoordelijkheid bij de laborant(en), maar niet voor de intrinsieke storings (vb. overlapping). Zowel op laboratoriumvlak als voor de individuele laboranten. Te bepalen onder reproduceerbaarheidomstandigheden (geen "memory"-effect). Cijfers kunnen ingevuld en berekend worden in Tabel 5, hoofdstuk 3.3.15.3.*

4.4.7 Bevestigen

Bevestigen (in een één- dan wel een multiplaattelling) voegt enkele factoren van onzekerheid toe aan de reeds bestaande:

- fouten van classificeren door onvoldoende duidelijke kenmerken (selectiviteit, specificiteit) die moeten afgelezen worden, en door biologische variatie van de kiemen. Dikwijls beïnvloed door andere onzekerheidsfactoren (matrix, concentratie, ...)
- een tweede zeer belangrijke factor is het effect dat meespeelt door de binomiaalverdeling van de steekproef (zie 3.3.10.1 en 3.3.10.2: Poisson-effect). Zo zal – bij bevestigingstesten op vijf kolonies - bij een ware waarde van 10 % positieve kiemen een relatieve onnauwkeurigheid van 13 % zijn, met 59 % kans dat er geen enkele verdachte kolonie wordt bevestigd. Bij 50% positieven bedragen deze waarden respectievelijk 22 % en 3 %.

Tabel 8 illustreert dit.

Aantal bevestigingen	% ware positieven	Kans op "afwezigheid"	Relatieve spreiding
5	10	59%	13%

Tabel 8: voorbeeld van onzekerheid bij bevestigingstesten.

4.4.8 berekenen

Hier zouden normaal geen vergissingen mogen gebeuren. De onzekerheid is hier bij default 0.

4.5 Residuele factoren:

Enkele belangrijke factoren (al dan niet gedeeltelijk verbonden aan andere, hogerop reeds vermelde factoren)

- bereiding van cultuurmedia, reagentia, ...
- toevallig aanwezige factoren in het monster (vb. inhiberende substanties)
- alle overige factoren (zoals vb. juiste wijze van autoklaveren, van opslag reagentia, van gebruik van vervallen reagentia, enz...)

Effect op onzekerheid: zeer moeilijk afzonderlijk in te schatten door het laboratorium zelf → global approach.

4.6 Samenvattend

De **meerderheid** van beïnvloedingsfactoren zijn **niet, of onvoldoende meetbaar**:

- te complex,
- te variabel,
- geen geschikte proefopzetten,
- enz...

Sommige factoren zijn **per definitie** geldig:

- de Poisson invloed

Factoren die **wél meetbaar** zijn (op laboratoriumvlak, dan wel voor individuele laboranten, en onder reproduceerbaarheid-, dan repeteerbaarheidomstandigheden), zijn de volgende:

- afwegen (4.4.2) (verwaarloosbare invloed)
- verdunningonzekerheid (4.4.3) **($W_{dilution}$)**
- uitplaatonzekerheid (4.4.4) **($W_{pipetting}$)**
- de afleesonzekerheid (inclusief Poisson scatter) (4.4.5) **($W_{reading}$)**
- de telonzekerheid (4.4.6) **(W_{count})**
- bevestigingsonzekerheid (4.4.7) **($W_{confirmation}$)**

Sommige van deze parameters kunnen vergeleken worden met gekende gegevens uit de literatuur (4).

De totale meetonzekerheid zal dan een gecombineerde onzekerheid zijn van vele onbekende factoren, en de hierboven aangehaalde meetbare factoren. De **somregel** is van kracht. Een voorbeeld is gegeven in Tabel 9.

		Telling op vier platen, vierde verdunning	
		Totale telling (kolonies)	370
	Berekend volgens		
W (dilution)	4.4.3	7,60%	0,005776
W (pipetting)	4.4.4	5,00%	0,0025
W (reading)	4.4.5	5,20%	0,002702703
W (count)	4.4.6	2,00%	0,0004
W (confirmation)	4.4.7	22,00%	0,0484
			0,059778703
			24,45%
		Spreiding (log)	
		(bij benadering)	0,12

Tabel 9: Voorbeeld van uitwerking van de samengestelde onzekerheid, uitsluitend gebaseerd op berekenbare onzekerheidsfactoren.

4.7 Nog even over bias

Hoewel bias moeilijk te bepalen is binnen het laboratorium (zie 2.3.3), is het toch mogelijk om (theoretisch) een bias benaderend te bepalen. Het resultaat van een telling kan dan met bepaalde **correctiefactoren** ("k") worden vermenigvuldigd, om een meer juiste waarde te geven.

Het is echter zeer de vraag of deze correctiefactoren steeds gekend zijn, laat staan dat zij correct kunnen en zullen toegepast worden. Voorbeelden hiervan (reeds hoger vernoemd) zijn:

- matrix

-
- "rijkdom" van de verschillende cultuurmedia
 - onvoldoende kennis voor aflezen (zou niet mogen)
 - slechte techniek met Drigalski-spatel

Van volgende correctiefactoren heeft men een algemeen idee:

- overlapping: hiervoor zou men eventueel een correctiefactor kunnen toepassen (zie Tabel 10) (4)

Coverage %	K_L
5	1.02
10	1.04
15	1.06
20	1.08
25	1.11
30	1.14
35	1.18
40	1.24

Tabel 10: onderschatting in relatie tot bezettingsgraad van de Petriplaat na bebroeding

Meestal wordt deze correctiefactor niet toegepast in de microbiologie.

5 Aandachtspunten en voorbeelden bij de opstelling van een onderzoeksplan voor de bepaling van de meetonzekerheid

Voorafgaande opmerking: de werkwijze, zoals beschreven in de ISO 19036 (gepaarde duplo bepalingen op routinemonsters) dient de eerste keuze te zijn om gegevens te verzamelen voor berekening van de onzekerheid. Dit geldt dan vooral voor de laboratoriumvalidatie van nieuwe testmethoden.

Waar dit door omstandigheden (vb. geen monsters beschikbaar) moeilijk realiseerbaar is, kunnen andere condities, zoals in de hierna volgende hoofdstukken worden besproken, een valabel alternatief bieden.

Waar er vroegere realistische waarden voor de meetonzekerheid zijn bekomen, kunnen deze ook behouden worden.

Tot slot kan er ook op gewezen worden dat verschillende (QN) analysetechnieken met hetzelfde onderzoeksplan voor duplo routinemonsters ook kunnen vergeleken worden.

5.1 matrix en matrixgroepen

Uit vele studies betreffende meetonzekerheid van microbiologische analyses blijkt duidelijk dat het type van matrix waarin de bepalingen worden uitgevoerd, hierbij een grote rol speelt.

ISO 16140 (validatieprotocol voor alternatieve analysemethoden) schrijft voor dat minstens **vijf** verschillende matrices worden gebruikt voor de validatie van een horizontale methode. Omgevingsmonsters mogen als een zesde matrixgroep beschouwd worden.

Het interlaboratoriumonderzoek, beschreven in bijlage A van ISO 19036, leidt tot de conclusie (voor kwantitatieve testmethoden, en bij extrapolatie dus ook naar kwalitatieve) dat matrices kunnen onderverdeeld worden in vier groepen, dit in relatie tot de invloed op de bekomen meetonzekerheid. Het is vooral de **fysische toestand** (homogeniteit) van de matrix, en niet zozeer de oorsprong of samenstellende ingrediënten, die hierbij een doorslaggevende rol spelen. Deze invloed op de meetonzekerheid speelt vooral een rol bij de bemonstering en bij de initiële verdunning (zie 4.4.1).

Tabel 11 beschrijft de onderscheiden categorieën.

Categorieklasse	Omschrijving	Voorbeelden
I	vloeistoffen en poeders	melk, cocosmelk, melkpoeder, ...
II	goed gemengde vaste stoffen	gehakt, MDM, slagroom, ijsroom, enz...
III	kleinkorrelige vaste stoffen	gedroogde champignonstukjes, geraspte wortelen, sla, garnalen, ontbijtgranen, kleinkorrelige diervoeding, gehakte noten, enz...
IV	overige vaste stoffen	niet gemalen vlees, kaas, gebak, enz...

Tabel 11: matrixgroepen welke moeten onderzocht worden voor bepaling van meetonzekerheid (volgens ISO 19036).

Uit ISO 19036 blijkt dat de bijdrage tot de meetonzekerheid (intralaboratorium reproduceerbaarheid, s_R) van het matrixeffect voor de eerste twee categorieën op ongeveer 0,1 log kan gesteld worden. Voor de derde en vierde categorie is deze bijdrage beduidend groter, maar ook meer wisselend, zodat hier geen gemiddelde waarde kan worden vooropgesteld.

Noot: in principe kunnen monsters uit categorie III en IV fijn gemixt worden, en behoren ze daarna bijgevolg tot categorie I of II. Dit is echter geen courante praktijk in de microbiologische laboratoria. Ook specifieke monstervoorbereiding (zoals vb. het opsmelten van chocolade) kan een shift van categorie bewerkstelligen.

Het niveau van besmetting wordt verderop besproken bij 5.2.2. Er kan echter nu reeds gesteld worden dat het type matrix geen rol speelt in het kader van het te onderzoeken besmettingsniveau in relatie tot de bepaling van de proefondervindelijke onzekerheid, vermits de laboratoria hierbij natuurlijk besmette monsters met variabel besmettingsniveau analyseren, en dit dus in de proefopzet wordt meegenomen. Met andere woorden: er moet geen rekening gehouden worden met de matrixkeuze in relatie tot het besmettingsniveau.

Uit bovenstaande tabel 11 en de daaraan verbonden overwegingen kan ook afgeleid worden dat alle soorten van drinkwater als één matrix kan beschouwd worden, en alle vormen van omgevingswater als één andere. Het staat de laboratoria uiteraard vrij om hun matrices in kleinere, meer strikt omschreven, groepen onder te delen om de meetonzekerheid te gaan bepalen.

5.2 Besmetting

5.2.1 welke stammen

Dit speelt uiteraard alleen een rol bij kunstmatige besmetting (zie verder bij 5.2.3).

Afhankelijk van het target-organisme (groep, familie, genus, species, serotype, faagtype, ...), moet hierbij een verantwoorde keuze gemaakt worden. De voorkeur gaat steeds naar (bevestigde) stammen die uit natuurlijk besmette monsters zijn geïsoleerd.

Het aantal verschillende organismen dat hierbij best gebruikt wordt, is niet echt goed gedefinieerd. In interlaboratorium validaties (zie ISO 16140) ligt dit behoorlijk hoog. Er wordt aangeraden hiervoor toch twee (à drie) verschillende organismen (vb. drie verschillende *E. coli* isolaties, gepoold) te gebruiken.

Voor de keuze van begeleidende flora (indien deze ook kunstmatig moet toegevoegd worden) zijn er ook geen vaste regels. Ook hier best meerdere organismen toevoegen. Voor het maken van een keuze kan onder andere gekeken worden naar de controle-organismen die in ISO 11133-2 worden beschreven voor de controle van de selectiviteit van cultuurmedia.

Meer uitleg en richtlijnen kunnen nog gevonden worden in ISO 16140, bijlage G.

5.2.2 welk niveau

Bij kunstmatige besmetting moet voor QN testmethoden het besmettingsniveau zodanig gekozen worden dat zij een weerspiegeling zijn van de natuurlijk voorkomende niveaus. Het besmettingsniveau speelt uiteraard een rol op de meetonzekerheid (o.a. meer manipulatie voor verdunningen). Er zouden hierbij minimaal twee besmettingsniveaus moeten aangemaakt worden, die de lagere en hogere range van natuurlijke besmettingen weerspiegelen. Deze twee niveaus moeten dan (evenredig) vertegenwoordigd zijn in het onderzoeksplan (voor de opstelling hiervan, zie 5.4).

Noot: met "laagbesmet" en "hoogbesmet" wordt bedoeld de besmetting van het analysemonster – met invloed op het aantal verdunningen - en niet een lage of hoge telling in de uiteindelijke verdunning.

Het besmettingsniveau voor kwalitatieve testen wordt verderop in 5.2.4 besproken.

5.2.3 natuurlijke vs. kunstmatige besmetting

Voor de (initiële) bepaling van de meetonzekerheid zijn natuurlijk besmette monsters steeds te verkiezen boven kunstmatig besmette, of (gecertificeerde) referentiemonsters. Hierdoor wordt de range van natuurlijk voorkomende besmettingsniveaus in rekening gebracht. De bepaling van de meetonzekerheid via de "*global approach*", en via analyses in duplo, laat dit ook toe. De variatie in stressniveau van de te onderzoeken kiemen wordt hiermee ook in rekening gebracht.

Alleen waar er onvoldoende natuurlijk besmette monsters ter beschikking zijn (binnen de range die nodig is om de meetonzekerheid op relevante statistische wijze te bepalen), is een kunstmatige besmetting (*spiken*) wenselijk. Hierbij zijn allerlei verschillende gradaties mogelijk:

-
- natuurlijke monsters waarbij het te bepalen target micro-organisme (zie 5.2.1) niet aanwezig is, en die hiermee worden besmet op verschillende niveaus
 - analysemonsters die volledig worden besmet (met targetorganisme, en “natuurlijke” begeleidende flora)

Het moment van spiken is ook belangrijk, omdat hierdoor zo weinig mogelijk bijkomende variatie mag veroorzaakt worden. Het meest ideale moment is spiken in de eerste verdunning. *Spiking* die in een vroeger stadium wordt uitgevoerd (op monsters die tussentijds – eventueel langdurig - worden bewaard) zal steeds een grotere variatie tot gevolg hebben.

(Gecertificeerde) referentiemonsters hebben slechts één besmettingsniveau, zijn “arm” aan diversiteit van begeleidende flora, en hebben slechts één “stressniveau”. Daarom zijn ze minder geschikt om in een “*global approach*” testopzet gebruikt te worden. Ze kunnen echter wél goed gebruikt worden om bepaalde specifieke facetten van de meetonzekerheid te bepalen.

5.3 Enkele bijzondere analysetechnieken

5.3.1 MPN methoden

MPN-methoden zijn zodanig afhankelijk van de inherente invloed van de Poisson scatter dat validatie van deze testen uitsluitend kan beoordeeld worden door vergelijking van proefopzetten met gekende lage concentratie (op zich al een grote foutenmarge !) met de gepubliceerde tabellen dienaangaande in de betreffende officiële normen waar deze techniek wordt toegepast.

Tabel 12 geeft, voor de 95% waarschijnlijkheidsintervallen, de grenzen weer waartussen de “ware waarde” van een MPN-resultaat ligt. Deze tabel is gebaseerd op de uitvoering van de MPN-test met drie culturen (tubes) per (tiendelige) verdunningsstap en is een toepassing voor de matrix water.

Tabel 13 is een analoge tabel voor analyse van andere matrices met de MPN methode.

Interpretatietabellen voor meer uitgebreide testopzetten (met 5 en zelfs 10 culturen per verdunningsstap) worden beschreven in o.a. de Bacteriological Analytical Manual (<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>) (19).

MPN DETERMINATION FROM MULTIPLE TUBE TEST					
NUMBER OF TUBES GIVING POSITIVE REACTION OUT OF			MPN INDEX per 100 ml	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3 of 10 ml each	3 of 1 ml each	3 of 0.1 ml each		LOWER	UPPER
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

FROM: STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, TWELFTH EDITION. (NEW YORK: THE AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, INC., p. 608)

Tabel 12. MPN methode voor bepaling van het "meest waarschijnlijke aantal" met gebruik van drie testtubes per verdunning (matrix water).

Table 1. For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.											
Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94

1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

Tabel 13. Algemene MPN tabel voor de 3-tube methode voor voedingsmiddelen. Uit de BAM (19)

5.3.2 Overige

Tot slot kan er nog herhaald worden dat door gebruik van alternatieve en/geautomatiseerde technieken (vb. spiraalplaatenting, Tempo® van BioMérieux) het relatieve belang van de afzonderlijke onzekerheidsfactoren wel kan variëren. Het principe van de “global approach” blijft hier echter evengoed van kracht.

5.4 kwalitatieve testen (QL): detectielimiet

Dit valt buiten de scope van deze syllabus.

Enkele vrijblijvende overwegingen van de auteur.

Ook hier geldt de “global approach”.

*De detectielimiet is moeilijk nauwkeurig bepaalbaar met tiendelige verdunningen. Hiervoor gebruikt men vb. beter een serie van **tweeledige verdunningen**, waarbij men vertrekt van een verdunning waarvan het aantal kve's laag en gekend is*

Men kan dit vb. bereiden uit een (C)RM, of uit een eigen bereide cultuur, (vb. vertrekken van een 10^7 verdunning van een opgekweekte BHI bouillon voor Salmonella, geeft meestal tussen de 10 en de 100 kve/ml). Verdunningsreeksen kunnen tegelijkertijd (gevaar voor mislukken!) met de QL analyses, of vooraf (met voorafgaande telling, en bewaring in de DV onder geschikte omstandigheden) worden gemaakt.

Na (ontdooiing en) enting van de van de geschikte matrix (ook indien nodig met natuurlijke begeleidende flora), kan hier dan een experiment opgezet worden, waarbij tot op onderscheidend niveau van 2 kve's de detectielimiet kan bepaald worden. Met 11 tweeledige verdunningen kan men reeds een range van 3 log ($1 \rightarrow 2 \rightarrow \dots \rightarrow 1.024$) bestrijken. Analyses worden parallel QN uitgevoerd, (op selectief milieu), en worden in enkelvoud of in duplo QL ingezet. Ze kunnen tevens vergeleken met een gevalideerde / geaccrediteerde / officiële QL-

methode. Voor 11 verdunningen en twee duplo's komt dit dus neer op 44 isolaties, en 11 tellingen.

Een veel gemaakte fout is dat men voor QL-testmethoden te hoge concentraties gebruikt. Dit zegt dan eigenlijk niets over de detectieperformantie van de methode.

5.5 keuze van statistische technieken (QN)

We gaan hierbij uit van de “*global approach*” benadering, zoals beschreven in de ISO 19036.

Naargelang in een onderzoeksplan (zie bij 5.5) wordt gewerkt met series van monsters met hetzelfde microbiologisch profiel, of met duplobepalingen op verschillende monsters, is de statistische benadering verschillend.

5.5.1 onafhankelijke analyses

Deze kan voorbeeld gebruikt worden indien de reproduceerbaarheid uit de analyse van een serie deelmonsters onder omstandigheden van reproduceerbaarheid wordt uitgevoerd.

De nadelen van deze methoden zijn reeds besproken (geen verschillende besmettingsniveaus, geen variatie in de matrix, de begeleidende flora, stabiliteit van de monsters, enz..). Wanneer deze methode toch wordt toegepast, is de reproduceerbaarheid zeer eenvoudig te berekenen via de formule voor de standaardafwijking in Excel (STDEV).

Een voorbeeld wordt getoond in het Excel werkdocument, tabblad “ongepaarde testen”

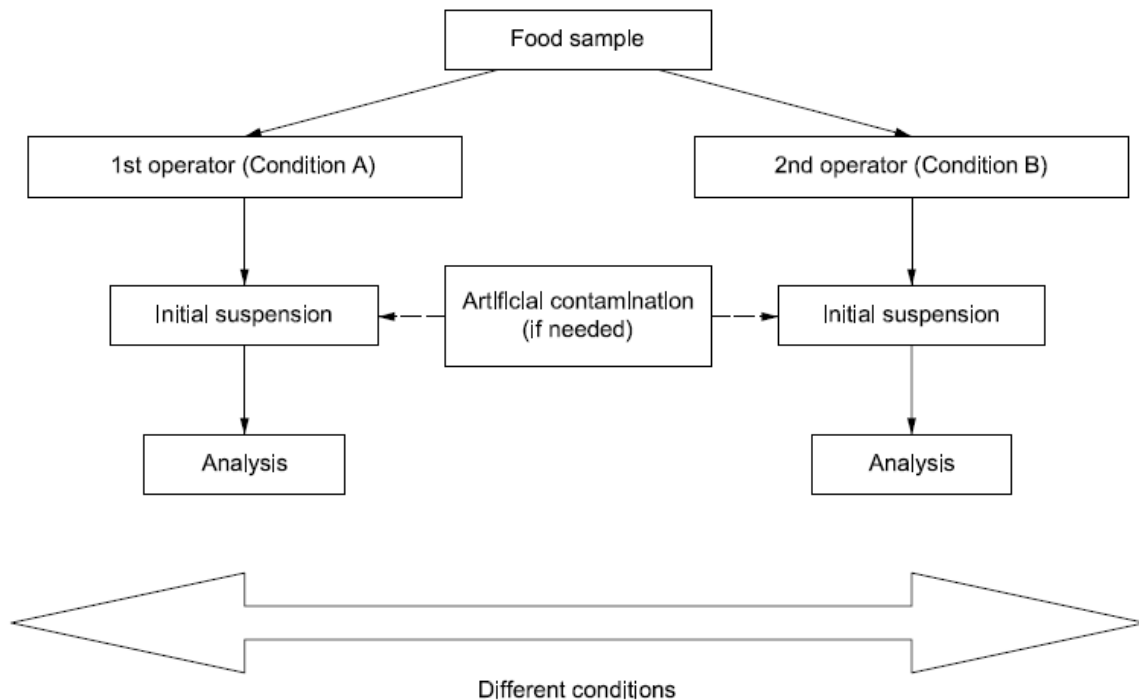
5.5.2 gepaarde duplomonsters

De techniek van de gepaarde duplomonsters wordt toegepast in de ISO norm 19036, en is dus te verkiezen.

Figuur 7 is overgenomen uit deze norm, en beschrijft de proefopzet voor de bepaling van de intra laboratorium reproduceerbaarheid.

Hierbij wordt de variatie in de omstandigheden van reproduceerbaarheid tussen de twee verschillende groepen laboranten zo groot mogelijk gehouden door alle criteria die van invloed zijn (besproken in hoofdstuk 4) maximaal te laten variëren.

Berekenen van de reproduceerbaarheid gebeurt dan volgens de Excel werkdocument, tabblad “gepaarde testen”. De formules dienen wat aangepast te worden indien het aantal gepaarde monsters verschillend is van tien.



Figuur 7: Proefopzet voor de bepaling van de intra laboratorium reproduceerbaarheid voor kwantitatieve analysemethoden. Met “1st operator” en “2nd operator” worden eigenlijk twee groepen van laboranten bedoeld (uit ISO 19036).

5.6 onderzoeksplannen

Gebaseerd op wat reeds werd besproken in deze syllabus, geven we hier een bondige samenvatting van de relevante onderdelen van een onderzoeksplan voor de intralaboratorium bepaling van meetonzekerheid.

5.6.1 Kwantitatieve testen (QN)

1. Beslis over de toe te passen analysemethode. Dit is uiteraard afhankelijk van de bedoeling, de wens of eis van de klant, enz..
2. Leg de statistische benaderingswijze vast van de proefopzet. Liefst met gepaarde monsters (zie 5.5.2)
3. Indien de monsters zelf gespiked worden, leg dan zo nauwkeurig mogelijk de condities hiervan vast (zie de verschillende onderdelen van 5.2)
4. Definieer zo nauwkeurig mogelijk de omstandigheden van reproduceerbaarheid die moeten toegepast worden (zie 5.5.2)
5. Verwerk de resultaten volgens de gekozen statistische benaderingswijze (Excel werkdocument, tabblad ongepaarde of gepaarde testen).

5.6.2 Kwalitatieve testen (QL)

Valt buiten de scope van deze syllabus.

5.7 continue toetsing

Er dienen door de laboratoria voldoende (tweede lijns) kwaliteitscontroles ingebouwd en statistisch geëvalueerd te worden om een continue toetsing van hun performantie betreffende meetonzekerheid

aan te tonen. Uiteraard dient dit niet voor alle testmethoden even frequent uitgevoerd te worden. Leidraden hiervoor kunnen o.a. zijn:

- duplo-analyse van bepaalde routinemonsters (per serie, per dag, per week, ...). Opletten dat omstandigheden van reproduceerbaarheid (geen herhaalbaarheid) worden toegepast
- zelfbereide controlemonsters (of referentiemonsters) regelmatig analyseren op bepaalde parameters (verwerking volgens 5.5.1).
Voor QL testmethoden moet hierbij een voldoende hoge positieve score behaald worden (80 à 90 % voortschrijdend gemiddelde) voor controlemonsters met besmettingsniveau dat lichtjes boven de detectielimiet ligt, vb. Salmonella 5 kve's per afgewogen analysemonster

5.8 enkele handige software tools voor berekening en toetsing (NMKL, andere)

Bijgevoegde 2^e Excel werkdocument (NMKL) geeft nog enkele andere statistische toepassingen voor microbiologische analyses.

6 Haalbare en realistische criteria van meetonzekerheid

6.1 studies, literatuur, overige beschouwingen

Resultaten aangaande interlaboratorium meetonzekerheid kunnen o.a. teruggevonden in de publicaties van ringonderzoeken. Ook sommige literatuurgegevens kunnen hierover teruggevonden worden (zie de publicaties van o.a. Diane Roberts, en Jarvis e.a.) (7, 11). In sommige officiële ISO analysenormen zijn ook dergelijke resultaten terug te vinden (ISO 6888, 7932, 7937, 11290, en 6579).

Gegevens betreffende intralaboratorium onzekerheid zijn eerder zelden gepubliceerd. Een goede bron is [Annex A in de ISO 19036](#).

Tabel 12 geeft enkele typische spreiding van s_R (dit is de intra laboratorium standaardafwijking onder omstandigheden van reproduceerbaarheid) weer.

Matrixklasse	Totaal kiemgetal	Coliformen	<i>E. coli</i>	Coag. + Staph.	Overige flora
I	0,05 – 0,14	0,18			0,14 – 0,23
II	0,07 – 0,24	0,15 – 0,20	0,11 – 0,44		0,04 – 0,25
III	0,14 – 0,45	0,78	0,31	0,13	0,25 – 0,36
IV	0,12 – 0,78	0,19 – 0,35	0,12 – 0,47	0,14 – 0,48	0,24 – 0,75

Tabel 14: spreiding van de standaardafwijkingen, zoals gepubliceerd in Annex A van ISO 19036.

Voor kwantitatieve testmethoden is er zeer weinig statistisch cijfermateriaal beschikbaar. De begrippen accordantie en concordantie werden in het kader van QL testen door Langton in 2002 voorgesteld als respectievelijk de tegenhanger van intra- en interlaboratorium reproduceerbaarheid bij de QN testmethoden. De AOAC (in samenwerking met het CFSAN) stelt echter dat hieraan geen echte statistische meerwaarde is gekoppeld in vergelijking met de ruwe data die in ringonderzoeken worden verkregen, en zoals o.a. gepubliceerd zijn in de ISO 6579:2002 voor detectie van Salmonella.

Voor de courante QL testmethoden kan gesteld worden dat de detectielimiet meestal nadert tot aantonen van 1-2 kve's in het afgewogen analysemonster.

7 Relatie met beoordeling van laboranten

Vooraleer een nieuwe laborant kan ingeschakeld worden in de activiteiten van een microbiologisch laboratorium, dient er via een praktische proef aangetoond te worden dat hij in staat is alle analyseonderdelen waarvoor hij wordt bevoegd verklaard, ook voldoende beheerst.

In de praktijk kan ook hiervoor – juist zoals voor de validatie van testmethoden – een “global approach” toegepast worden.

Daarenboven kan er gesteld worden dat het niet noodzakelijk is dat deze validatie volledig dient uitgevoerd te worden voor alle testmethoden waarvoor hij wordt bevoegd verklaard. Indien hij voor enkele QN (selectieve en niet selectieve) en QL testen aantoont dat hij voldoende accuraatheid bezit, en voor QL testen een aanvaardbare detectielimiet, is voldoende bewezen dat hij in het laboratoriumteam kan opgenomen worden. Uiteraard kunnen bijkomende deelevaluaties gebeuren voor specifieke deelactiviteiten, zoals kennis van determinatietechnieken, omgaan met bepaalde apparatuur, enz...

Bij evaluatie voor bevoegdheidsverklaring dient steeds gestreefd te worden naar minimaliseren van uitvoering van extra analyses voor evaluatie, en maximaliseren van de mogelijkheid tot besluitrekking uit deze analyses.

In het kader van de evaluatie van de nieuwe laborant kan gekozen worden tussen verschillende benaderingswijzen, vb. (niet limitatief!):

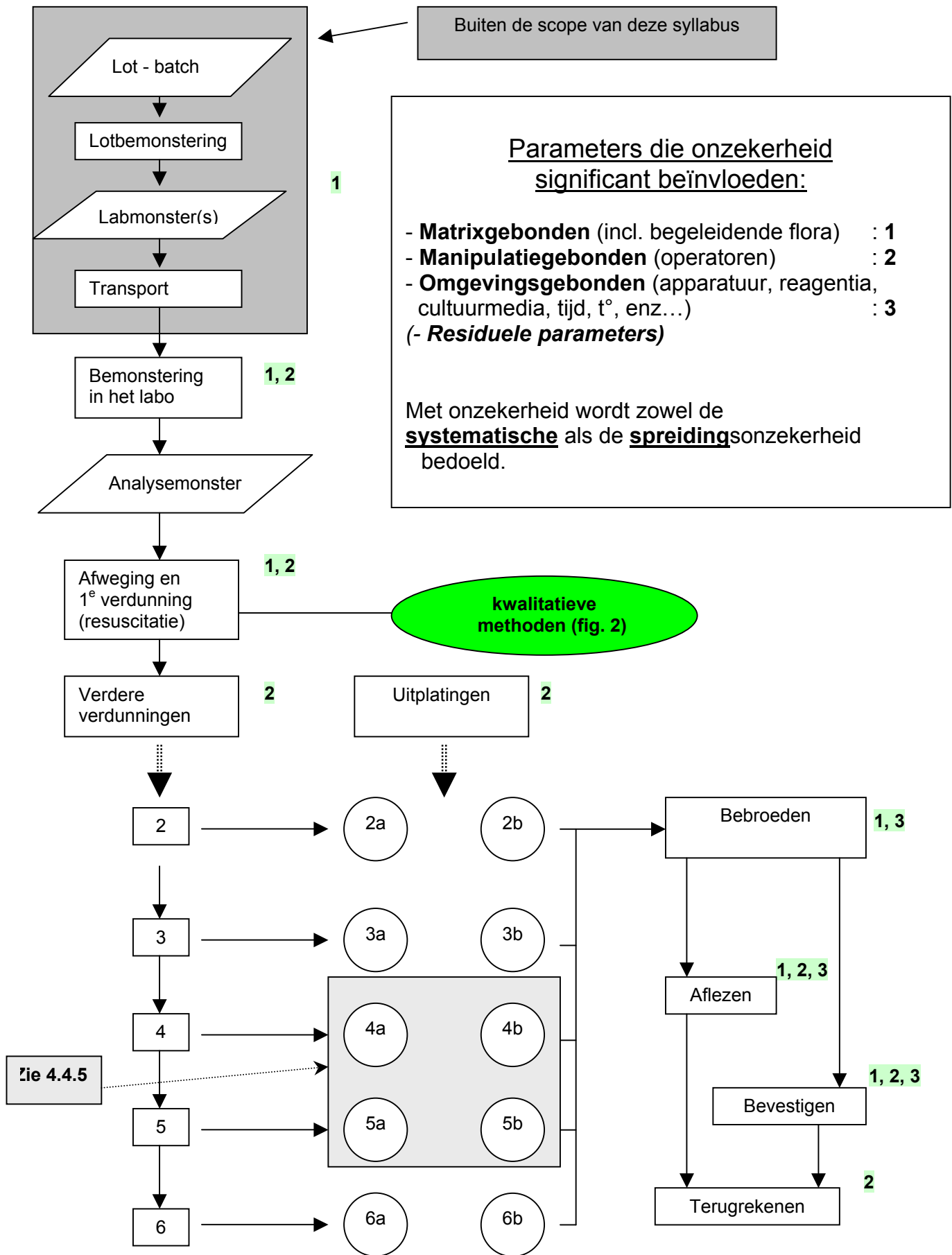
1. de volledige individuele uitvoering van de gekozen testmethoden (zoals beschreven in 5.5.1),
2. de inschakeling in de continue validatie (zoals beschreven in 5.7)
3. De individuele uitvoering van specifieke deelstukken (zoals beschreven in de verschillende onderdelen van 4.4, en samengevat in 4.6)

Het derde punt is meestal alleen maar noodzakelijk indien uit de tussentijdse statistische evaluatie blijkt dat er significante afwijkingen worden vastgesteld. De rekenbladen in beide bijgevoegde Excel werkdocumenten kunnen hiervoor toegepast worden.

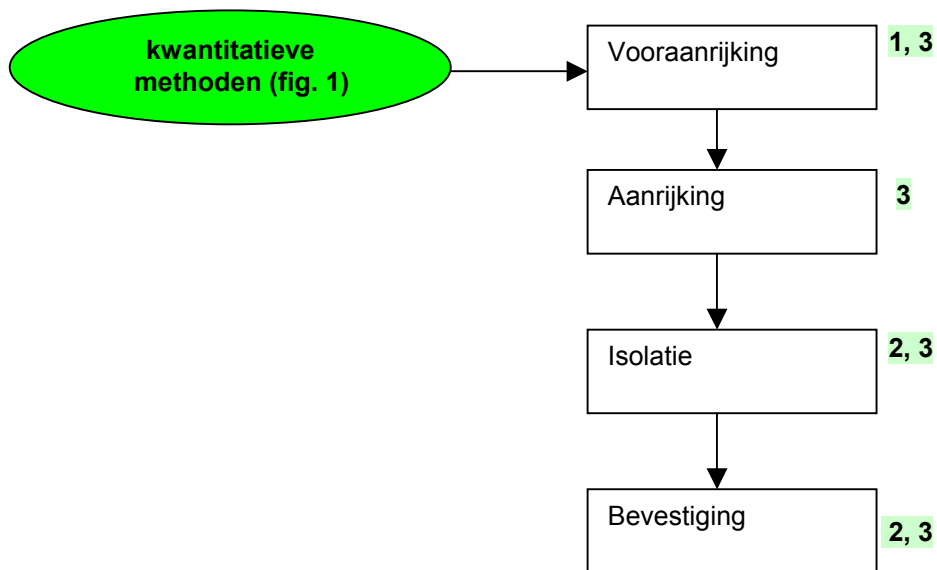
Er dient steeds goed op gelet dat statistische verwerking in omstandigheden van reproduceerbaarheid, en er geen omstandigheden van herhaalbaarheid worden gebruikt, of dat – in voorkomend geval – hier toch rekening mee gehouden wordt. Empirisch kan gesteld worden dat resultaten onder omstandigheden van herhaalbaarheid met een factor **1,6** moeten vermenigvuldigd worden om te vergelijken met reproduceerbaarheid (18, hoofdstuk 2.2.4, punt b). De daadwerkelijke bepaling van meetonzekerheid onder reproduceerbaarheid omstandigheden is echter duidelijk te verkiezen boven deze empirische benadering.

8 Publicaties – naslagwerken

1. ISO 16140 (2003): Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.
2. ISO 19036 (2006): Microbiology for food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
3. ISO (1995): Gids voor uitdrukking van onzekerheid bij metingen
4. Onzekerheid bij kwantitatieve bepalingen van micro-organismen (Centrum voor Metrologie en Accreditatie, Finland, 2002)
5. Mathematisch model voor statistische evaluatie van precisieparameters van microbiologische methoden (AOAC, 1991)
6. NPHS Wales – NHS – HPA (2005): onzekerheid van metingen in testmethoden
7. Diane Roberts (1998): Proficiency testing in the food microbiology laboratory
8. ISO 11133-1:2000: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
9. ISO 11133-2:2003: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media
10. AOAC: paper aangaande meetonzekerheid in de microbiologie (Appendix J – STWG Part 3 – Uncertainty 7-8-06)
11. Jarvis e.a. (J.A.M. - 2007 - ISSN 1364-5072): Estimates of measurement uncertainty from proficiency testing schemes, internal laboratory quality monitoring and during routine enforcement examination of foods
12. Cursus Waarschijnlijkheidsberekening & Statistiek, VUB, 2003
13. Praktische statistiek voor het laboratorium. J.W.A. Klaessens en J.A. van Leeuwen. Ten Hagen & Stam, 1996. ISBN 90-71694-52-6
14. Verklarende statistiek. M.L. Wijvekate. Het Spectrum, 1983. ISBN 90 274 4824 8
15. Verklarend document KIWA betreffende de opzet van rapportage van ringonderzoeken (van het internet)
16. ISO 7218:1996 (en amendement 1:2001) Microbiologie van voeding en veevoeding – algemene voorschriften voor microbiologisch onderzoek.
17. Wikipedia (Engelse versie): alles in relatie met de normaalverdeling:
http://en.wikipedia.org/wiki/Normal_distribution
18. De Ware(n)-chemicus, themanummer, februari 1996, Validatie van methoden.
19. Bacteriological Analytical Manual On-line, februari 2006, FDA/CFSAN.



Figuur 8. Algemeen stroomdiagram van kwantitatieve microbiologische bepalingmethoden



Figuur 9. Algemeen subdiagram van kwalitatieve microbiologische bepalingmethoden.