13° Meeting di Aggiornamento per Responsabili e Tecnici di Laboratorio del Settore Lattiero Caseario

Roma 4 dicembre 2013

Incertezza di misura nelle prove microbiologiche: le novità introdotte dall'Amendment 1:2013 della ISO 7218:2007

Dino Spolaor

ISO 7218:2007 /Amd 1:2013

MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS – GENERAL REQUIREMENTS AND GUIDANCE FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION

Scopo e Campo di applicazione - Guida per i laboratori di microbiologia - Applicabile ad alimenti e mangimi, all'ambiente di produzione e manipolazione degli alimenti.

ISO 7218:2007 / Amd 1:2013

CONTEGGIO

Concentrazione batterica BASSA (<10 ufc/ml)

Uso di terreni liquidi

a. Numero più probabile (MPN)
b. Concentrazione per filtrazione, immunoseparazione o centrifugazione

Concentrazione batterica "ALTA" (>10 ufc/g-ml)

Terreni solidi

Enumerazione su / in terreno solido agarizzato

ISO 7218:2007 /Amd 1:2013

CAMPO DI MISURA

- Dimensione della Piastra di Petri
- Dimensione della membrana (tecnica MF)
- Morfologia della colonia
- Caratteristiche da osservare (es. aloni)

Piastra Petri diam 55 mm → 110 ufc/piastra

Piastra Petri diam 90 mm → 300 ufc/piastra

Piastra Petri diam 140 mm → 730 ufc/piastra

N° di piastre per diluizione
ISO 7218:2007 par. 10.2.2

Una piastra per almeno due diluizioni

1. per laboratori che operano "*under quality assurance*" in accordo con i principi della ISO 17025

Due piastre

1. Laboratori "non ISO 17025"
2. Se richiesta una sola diluizione

ISO 7218:2007 / Amd 1:2013

Metodo di calcolo - caso generale

- Formula generale $$N = \frac{\sum C}{V \times 1{,}1 \times d}$$

$\sum C$ = SOMMA delle colonie di 2 piastre consecutive in cui ALMENO UNA con 10 colonie

V = Volume di inoculo

d = diluizione (se non eseguite diluizioni d=1)

Relazione ISO 7218 e metodi normati

- ISO 7218:2007 *Par. 1 Scope*

… The requirements of this International Standard supersede the corresponding ones of existing specific standards.

ISO 7218:2007 / Amd 1:2013

DA NON DIMENTICARE

Al paragrafo 10.3.1 si afferma:

"Nei differenti metodi di calcolo (definiti in 10.3.2, Annex B e D) si deve tener conto delle **piastre non contenenti colonie**, se queste piastre sono state prese in considerazione in quanto risultano significative nel calcolo della media ponderata."

ESEMPI APPLICATIVI

ESEMPI	I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
1°	230	20	Applica la formula generale utilizzando i dati di conta di entrambe le piastre
2°	20	3	
3°	10	2	
4°	**10**	**0**	

CASI PARTICOLARI

I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
9	1	La Tab. B.3 della ISO 7218:2007/Amd.1:2013 dichiara NA (non applicabile) la media ponderata delle conte delle due diluizioni, pertanto è possibile esprimere il risultato sulla base della conta della sola prima diluizione.
4	0	
3	0	
2	0	
1	0	

CASI PARTICOLARI

I diluizione	II diluizione	CHE FARE? Considera solo la prima diluizione
9	✖ 1	9 **UFC stimate/g-ml**
4	✖ 0	4 **UFC stimate/g-ml**
3	✖ 0	m.o. presenti ma inferiori a 4/*Vd*
2	✖ 0	m.o. presenti ma inferiori a 4/*Vd*
1	✖ 0	m.o. presenti ma inferiori a 4/*Vd*

CASI PARTICOLARI

I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
0	0	Esprimi il risultato come "**inferiore a 1/*Vd* UFC/g-ml**"

! Attenzione ! *d* = diluizione Es. 0,1 o 0,01

Metodo di calcolo – caso generale

Conta delle colonie totali o colonie tipiche

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

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1{,}1 \times d}$$

ISO 7218:2007/Amd.1:2013
Annex D

n piastre per diluizione
2 successive diluizioni
Almeno 1 piastra contenga 10 colonie

ISO 7218:2007/Amd.1:2013
§ 10.3.2.3
1 piastra per diluizione
2 successive diluizioni
Almeno 1 piastra contenga 10 colonie (§ 10.3.2.2)

ISO 7218:2007/Amd 1:2013

Metodo di calcolo con identificazione

Formula generale $N = \frac{\sum a}{V \times 1{,}1 \times d}$

$\sum$a = SOMMA delle colonie confermate $a = \frac{b}{A} \times C$

b = n° colonie in accordo con i criteri di identificazione, confermate

A = n° colonie sottoposte a conferma / per piastra (generalmente 5)

C = n° totale di colonie presunte / contate in piastra

V = Volume di inoculo

d = diluizione (se non eseguite diluizioni *d*=1)

ISO 7218:2007

Numero di microorganismi dopo identificazione

a = numero colonie dopo identificazione

$$a = \frac{b}{A} \cdot C$$

b = numero colonie confermate
A = numero colonie sottoposte a conferma
C = numero colonie presuntive contate

A = generalmente 5 colonie da ciascuna piastra sottoposta a conteggio

Metodo di calcolo

Dopo identificazione

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

$$N = \frac{\sum a}{V \ x \ 1{,}1 \ x \ d}$$

ISO 7218:2007/Amd.1:2013
Annex D

n piastre per diluizione
2 successive diluizioni
Almeno 1 piastra contenga 10 colonie

ISO 7218:2007/Amd.1:2013
§ 10.3.2.3
1 piastra per diluizione
2 successive diluizioni
Almeno 1 piastra contenga 10 colonie (§ 10.3.2.2)

§10.3.2.4.3.2 ISO 7218:2007

Indicazioni errate che si ritrovano ancora nell'Amd.1:2013

10.3.2.4.3.2 Case 1

ISO 7218:2007

If the number of typical and atypical colonies for the dish containing a first dilution d_1 is greater than 300 (or any other number stated in the specific standard), with visible typical colonies or identified colonies, and if, the dish containing the subsequent dilution d_2 contains less than 300 colonies (or any other number stated in the specific standard), and no typical or identified colony is present, report the result as follows:

"less than $1/d_2$ and more than $1/d_1$ microorganisms per millilitre" (liquid products) or "less than $1/d_2$ and more than $1/d_1$ microorganisms per gram" (other products)

where d_1 and d_2 are the dilution factors corresponding to the dilution d_1 and d_2.

EXAMPLE Counting has produced the following results:

— at the first dilution retained (10^{-2}): more than 300 colonies on the dish, with typical or identified colonies present;

— at the second dilution retained (10^{-3}): 33 colonies, with no typical or identified colonies present.

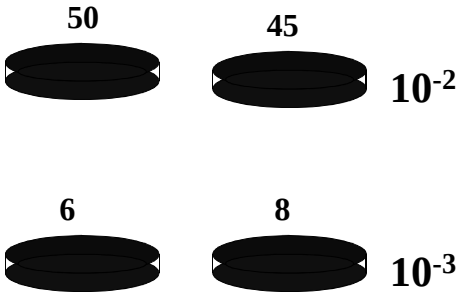
The result, expressed in microorganisms, is less than 1 000 and more than 100 per millilitre or per gram of product.

ISO 7218:2007 / Amd 1:2013 § 10.3.2.2 ISO 14461-2

il rapporto 1:10 di una diluizione non viene sempre rispettato nella conta delle colonie

La ISO 14461-2 stabilisce con quale tolleranza la conta delle colonie può "allontanarsi" dal rapporto 1:10

VALUTARE L'OMOGENEITÀ GENERALE TRA LE DILUIZIONI E TRA LE PIASTRE RIPETUTE



Valutare se le variazioni, rispetto ai dati attesi, sono più elevate di quelle dovute al caso

ISO 14461-2:2005 IDF 169-2:2005

VALUTAZIONE DATI

Confronto delle conte di **piastre parallele** con i dati riportati in Tabella 1 per valutare la

Conformità (*Probabilità (P) 99%)*

Tab. 1 - Piastre parallele

ISO 14461-2:2005(E)
IDF 169-2:2005(E)

Colony count		
Upper	Lower	Sum
142	102	244
143	103	246
144	104	248
145	105	250
146	106	252
147	107	254
148	107	255
149	108	257

Colony count		
Upper	Lower	Sum
188	142	330
189	143	332
190	144	334
191	144	335
192	145	337
193	146	339
194	147	341
195	148	343

Colony count		
Upper	Lower	Sum
234	182	416
235	183	418
236	184	420
237	185	422
238	186	424
239	186	425
240	187	427
241	188	429

- Esempio. Conte: 193 e 142
- Si cerca in Tab. 1 il valore più alto dei due e si controlla che il valore della 2ª piastra sia all'interno dell'intervallo della tabella.
- In questo caso 142 non è conforme

ISO 14461-2:2005 IDF 169-2:2005

VALUTAZIONE DATI

Confronto delle **conte di 2 diluizioni** con i dati riportati in Tabella 2 per valutare

Conformità (*Probabilità (P) 99%)*

Tab. 2 – diluizioni in successione

ISO 14461-2:2005(E)
IDF 169-2:2005(E)

Prima dil Diluizione successiva

Conte su diluizioni successive:
151 e 31.

Si cerca nella tab. 2 il valore della prima diluizione considerata (151).
Si verifica se il secondo valore è compreso nell'intervallo 6 e 26 riportato nella stessa riga.
In questo caso il valore 31 è al di fuori dell'intervallo (non conforme).

10^{-x}	$10^{-(x+1)}$		
106	4	10,6	20
107	4	10,7	20
108	4	10,8	20

10^{-x}	$10^{-(x+1)}$		
Observed	Expected		
Sum/ Count	Lower limit	Sum/ Count	Upper limit
136	6	13,6	24
137	6	13,7	24
138	6	13,8	25
139	6	13,9	25
140	6	14,0	25
141	6	14,1	25
142	6	14,2	25
143	6	14,3	25
144	6	14,4	25
145	6	14,5	26
146	6	14,6	26
147	6	14,7	26
148	6	14,8	26
149	6	14,9	26
150	6	15,0	26
151	6	15,1	26
152	7	15,2	27

ISO 7218:2007 / Amd 1:2013

ARROTONDAMENTI: 2 cifre significative

ESPRESSIONE DEL RISULTATO:

- numero (*N*) compreso tra 1,0 e 9,9 (moltiplicato per l'appropriato fattore 10, relativo alla prima diluizione considerata) o come numero intero

UNITA'di MISURA: microorganismi (UFC) /g o ml

Risultato e intervallo di fiducia

Valori non arrotondati		
210.970	**210.000**	**Limite superiore**
191.818	**190.000**	**UFC/g**
174.370	**170.000**	**Limite inferiore**

ISO 7218:2007 / Amd 1:2013

BASSE CONTE

PRECISIONE massima DEL CONTEGGIO

Da 10 colonie al LIMITE SUPERIORE

(specifico per ogni metodo)

Precisione decrementa considerevolmente se conteggio <10 colonie /piastra

UNI ENV ISO 13843:2003 p. 6.1.2

L'incertezza casuale aumenta rapidamente con la riduzione della conta delle colonie.

Nell'intervallo di conteggio sotto a dieci circa, che è di considerevole interesse per la salute pubblica, le singole misurazioni sono così imprecise che possono essere a malapena caratterizzate come migliori che semi-quantitative.

§10.3.2.4.1 ISO 7218:2007/Amd.1:2013 Basse conte (<10 colonie in una piastra)

Nel caso della distribuzione di Poisson, la minor concentrazione di particelle *x*, quantificabile, è data da

$$x = \frac{1}{(C_V)^2}$$

§10.3.2.4.1 ISO 7218:2007/Amd.1:2013 Basse conte (<10 colonie in una piastra)

Se il limite dello scarto tipo relativo C_V scelto = 50%, il limite minimo di quantificazione è dato da

$$x = \frac{1}{(0{,}50)^2} = 4 \qquad x = \frac{1}{0{,}25} = 4$$

C_V = 50% - ragionevole in microbiologia
(cfr limiti fiduciali in % su Tab B.2 Annex B - ISO 7218: 2007/Amd.1:2013)

§10.3.2.4.1 ISO 7218:2007/Amd.1:2013 Basse conte (<10 colonie in una piastra)

I risultati basati sulle conte inferiori a 4
devono essere trattati come
" mera presenza di microorganismi"

Conta delle colonie tra 1 e 3

"Microorganismi presenti, ma meno di 4 x 1/*Vd* per *g* o *ml*"

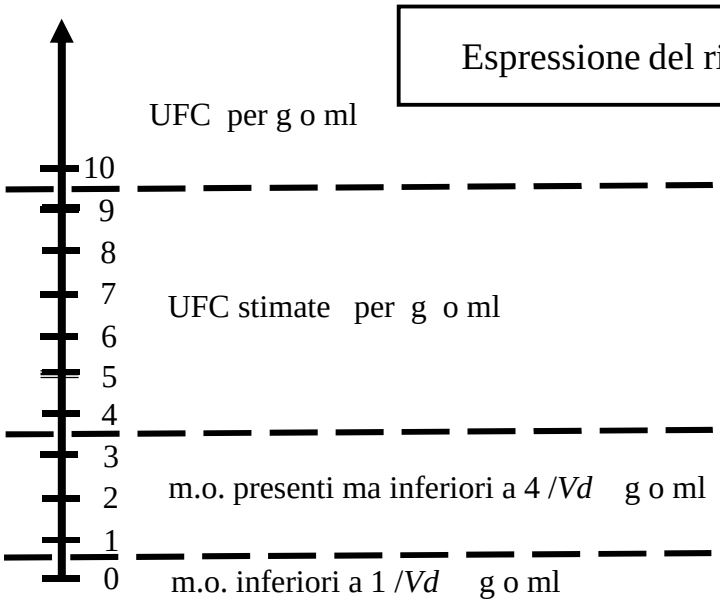
Attenzione alla simbologia della ISO 7218:2007

Conta delle colonie tra 4 e 10

"Numero stimato di microorganismi"

(applicazione formula generale)

Espressione del risultato



Annex D

D.5.1 Case of two dishes (...) containing less than 10 colonies

D.5.1 Caso di 2 piastre (…) contenenti meno di 10 colonie

- *If each of the two dishes from the test sample (liquid products), or from the initial suspension (other products), or from the first dilution inoculated or retained, contains less than 10 colonies (...) and the set of the two dishes contains at least 4 colonies, calculate the estimated number N_E of microorganisms present in the test sample as an arithmetical mean of the colonies counted on the two dishes using formula D.3.*

- ***Se ciascuna delle 2 piastre … contiene meno di 10 colonie e le due piastre assieme contengono almeno 4 colonie, calcolare il numero stimato di microrganismi presenti … come media delle colonie contate sulle due piastre usando la formula***

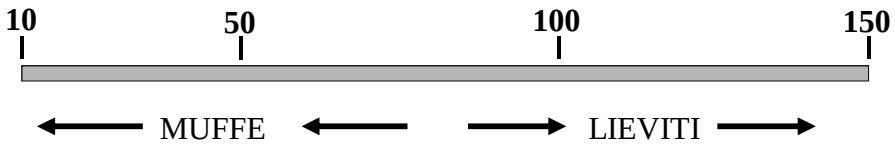
$$N_E = \frac{\sum C}{Vnd}$$

CASI PARTICOLARI

CONTEGGIO DI LIEVITI E MUFFE

Criteri di scelta delle piastre
Conteggio prioritario LIEVITI:
scegliere le piastre con n. di colonie più vicino al limite massimo di 150 colonie/piastra.

Conteggio prioritario MUFFE:
scegliere le piastre con n. di colonie più vicino al limite minimo di 10 colonie/piastra.



UNA O DUE PIASTRE PER DILUIZIONE NON E' INDIFFERENTE

PIASTRE PER DILUIZIONE	MASSIMO NUMERO COLONIE PER PIASTRA	LIMITE SUPERIORE INTERVALLO DI FIDUCIA
UNA	150	174
	300	334
DUE	150	167
	300	324

CASI PARTICOLARI
Confronto Prima e Dopo Amd.1:2013

I diluizione	II diluizione		CHE FARE?
>334	**9**	**ISO 7218:2007**	Considera solo la conta della II diluizione esprimendo il risultato come "**UFC stimate/g-ml**"
>334	**9**	**ISO 7218:2007 Amd.1:2013**	Risultato inaccettabile

CASI PARTICOLARI
ISO 7218:2007 Amd.1:2013

I diluizione	II diluizione	Limite II dil	CHE FARE?
>334	**9**	**20**	Risultato inaccettabile
310	**8**	**18**	Risultato inaccettabile*

* La ISO 7218:2007 considerava accettabile il risultato

Intervallo 10-300, tolleranza fino a 334 UFC

CASI PARTICOLARI
ISO 7218:2007 Amd.1:2013

I diluizione	II diluizione	Limite II dil	CHE FARE?
>174	**9**	**8**	UFC stimati sulla base della II diluizione
160	**8**	**7**	Risultato calcolato usando le due piastre (accettabile)

Intervallo 10-150, tolleranza fino a 174 UFC

CASI PARTICOLARI

I Diluizione 10^{-2}	II Diluizione 10^{-3}	CHE FARE?
>300	>300	Esprimi il risultato come "superiore a 300.000 UFC/g-ml"
>150	>150	Esprimi il risultato come "superiore a 150.000 UFC/g-ml"

CASI PARTICOLARI

COLONIE TIPICHE E CONFERMATE

I Diluizione 10^{-2}	II Diluizione 10^{-3}	CHE FARE?
> 300 (**presenza** di colonie tipiche o confermate)	33 (**assenza** di colonie tipiche o confermate)	**Esprimi il risultato come** m.o presenti < 1 /V_2d_2 e > 1/V_1d_1 /g o ml **"inferiore a 10^3 e superiore a 10^2 UFC/g-ml" (tra 100 e 1.000 UFC/g-ml)**
> 300 (**assenza** di colonie tipiche o confermate)	33 (**assenza** di colonie tipiche o confermate)	**Esprimi il risultato come** "< 1 /V_2d_2 microorganismi presenti" /g o ml **"inferiore a 10^3 UFC/g-ml"**

ISO 7218:2007 / Amd 1:2013

Intervallo di fiducia, un'alternativa

Per valutare la validità di un risultato ed evitare interpretazione del dato in modo eccessivamente restrittivo, è necessario stimare l'incertezza di misura e **quando non possibile**, stimare l'intervallo di fiducia che caratterizza in modo statistico la distribuzione dei microorganismi nel campione

ISO 7218:2007/Amd1:2013
ANNEX B
Intervallo di fiducia- Conteggio

$$\delta = \left[\frac{\sum C}{B} \pm \frac{1{,}96\sqrt{\sum C}}{B}\right]\frac{1}{d}$$

dove $B = V(n_1 + 0{,}1n_2)$

ISO 7218:2007/Amd1:2013_ANNEX B

Table B.1 — Weighted means and confidence intervals δ for relevant numbers of colonies

Weighted mean of number of colonies counted on two successive dilutions	System "1 plate per dilution" Confidence interval δ	System "2 plates per dilution" Confidence interval δ
300	268 to 332	277 to 323
150	127 to 173	134 to 166
100	**81 to 119**	**87 to 113**
30	**20 to 40**	**23 to 37**
15	7 to 22	10 to 20
10	4 to 16	6 to 14
7	Not applicable	3 to 10

ISO 7218:2007 / Amd1:2013
ANNEX B

Intervallo di fiducia
CASI SPECIALI con basse conte
Tabelle da B2 a B5

ISO 7218:2007 / Amd1:2013_ANNEX B

Table B.2 — Confidence intervals for enumeration with the system "one plate per dilution", case of low numbers counted on a single plate

Number of colonies[a]	Confidence limits at approximate 95 % confidence level[b]		Percentage confidence limit
	Lower limit	Upper limit	
1	<1	3	±196
2	<1	5	±139
3	<1	6	±113
4	<1	8	±98
5	<1	9	±88
6	1	11	±80
7	2	12	±74
8	2	14	±69
9	3	15	±65
10	4	16	±62
11	4	18	±59
12	5	19	±57
13	6	20	±54
14	7	21	±52
15	7	23	±51

[a] The number of colonies counted on one plate at one dilution.

[b] Compared to the number of microorganisms calculated and assuming that count is made on one plate at one dilution.

Table B.4 — Confidence intervals for enumeration with the system "two plates per dilution", case of low numbers counted on two plates at one dilution

Number of colonies[a]	Number of microorganisms[b]	Confidence limits at approximate 95 % confidence level[c]		Percentage confidence limits
		Lower	Upper	
1	1	<1	1	±196
2	1	<1	2	±139
3	2	<1	3	±113
4	2	<1	4	±98
5	3	<1	5	±88
6	3	<1	5	±80
7	4	<1	6	±74
8	4	1	7	±69
9	5	2	7	±65
10	5	2	8	±62
11	6	2	9	±59
12	6	3	9	±57
13	7	3	10	±54
14	7	3	11	±52
15	8	4	11	±51
16	8	4	12	±49
17	9	4	13	±48
18	9	5	13	±46
19	10	5	14	±45
20	10	6	14	±44
21	11	6	15	±43
22	11	6	16	±42
23	12	7	16	±41
24	12	7	17	±40
25	13	8	17	±39
26	13	8	18	±38
27	14	8	19	±38
28	14	9	19	±37
29	15	9	20	±36
30	15	10	20	±36

[a] The number of colonies counted. on two Petri dishes at one dilution.

[b] Arithmetical mean from two Petri dishes.

[c] Compared to the number of microorganisms calculated and assuming that count is made on two plates at a single dilution.

Table B.5 — Confidence intervals for enumeration with the system "two plates per dilution", case of low numbers counted on two plates at two dilutions

Number of colonies[a]	Number of microorganisms[b]	Confidence limits at approximate 95% confidence level[c]		Percentage confidence limits
		Lower	Upper	
1	NA[d]	NA	NA	NA
2	NA	NA	NA	NA
3	NA	NA	NA	NA
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	NA	NA	NA	NA
7	NA	NA	NA	NA
8	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA
10	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA
12	5	2	9	±57
13	6	3	9	±54
14	6	3	10	±52
15	7	3	10	±51
16	7	4	11	±49
17	8	4	11	±48
18	8	4	12	±46
19	9	5	13	±45
20	9	5	13	±44
21	10	5	14	±43
22	10	6	14	±42
23	10	6	15	±41
24	11	7	15	±40
25	11	7	16	±39
26	12	7	16	±38
27	12	8	17	±38
28	13	8	17	±37
29	13	8	18	±36
30	14	9	19	±36

[a] The number of colonies counted on two Petri dishes at two successive dilutions.

[b] Weighted mean from four Petri dishes.

[c] Compared to the number of microorganisms calculated and assuming that count is made on two plates at two dilutions.

[d] Not available; weighted mean cannot be calculated.

ISO 7218:2007 / Amd1:2013

Determinazione del
Most Probable Number (MPN)

Valutazione visiva es.
torbidità, produzione gas, viraggio colore
→ isolamento di m.o. su terreni selettivi

ISO 7218:2007 / Amd1:2013

3 possibilità di determinare il valore di MPN,

- Formule matematiche
- Tabelle MPN _ (Annex C)
- Specifici programmi liberamente scaricabili
  http://standards.iso.org/iso/7218/

Table C.5 — MPN values per gram of sample and 95 % confidence limits

(when three test portions of 1 g, three of 0,1 g and three of 0,01 g are used) Reference [56]

Number positive results for inoculum volume, ml or g			MPN /ml or /g	$\log_{10}M$	Standard deviation of $\log_{10}M$	95 % Confidence limits		Rarity index	Rarity category
1,00	0,10	0,01				Lower	Upper		
0	0	0	0	NA[a]	NA[a]	0	1,1	1,00	1
0	1	0	0,31	−0,51	0,43	0,04	2,3	0,09	1
1	0	0	0,36	−0,44	0,44	0,05	2,7	1,00	1
1	0	1	0,72	−0,14	0,31	0,17	3,0	0,02	2
1	1	0	0,74	−0,13	0,31	0,18	3,1	0,21	1
1	2	0	1,1	0,04	0,26	0,35	3,7	0,02	2
2	0	0	0,92	−0,04	0,32	0,21	4,0	1,00	1
2	0	1	1,4	0,15	0,27	0,42	4,9	0,04	2
2	1	0	1,5	0,18	0,27	0,43	5,0	0,43	1
2	1	1	2,0	0,30	0,24	0,70	6,0	0,02	2
2	2	0	2,1	0,32	0,24	0,71	6,2	0,07	1
3	0	0	2,3	0,36	0,31	0,55	9,7	1,00	1
3	0	1	3,9	0,59	0,31	0,93	16	0,08	1
3	1	0	4,3	0,63	0,33	0,95	19	1,00	1
3	1	1	7,5	0,88	0,30	1,9	30	0,21	1
3	1	2	12	1,1	0,26	3,6	37	0,02	2
3	2	0	9,3	0,97	0,32	2,2	40	1,00	1
3	2	1	15	1,2	0,27	4,4	51	0,42	1
3	2	2	22	1,3	0,24	7,2	64	0,07	1
3	3	0	24	1,4	0,32	5,6	100	1,00	1
3	3	1	46	1,7	0,34	9,6	220	1,00	1
3	3	2	110	2,0	0,32	25	490	1,00	1
3	3	3	∞	NA[a]	NA[a]	36	∞	1,00	1

[a] Not available.

ISO 7218:2007 / Amd1:2013

Il programma computerizzato, come le tabelle, permettono di definire,
oltre al valore di MPN,
2 parametri che danno la misura della qualità della prova

"RARITY INDEX"
"CATEGORIA"

“RARITY INDEX”
“CATEGORIA”

CATEGORIA	RARITY INDEX	PROBABILITA’ %
1	Da 0,05 a 1,00	95
2	Da 0,01 a < 0,05	5
3	Da 0,00 a < 0,01	1

Scelta della combinazione di tubi?

- In ISO 7218:2007

Criteri di scelta della combinazione di provette positive (categorie di probabilità, tre diluizioni e numero di tubi positivi)

- In ISO 7218:2007 / Amd1:2013

Non corretto scientificamente scegliere la combinazione di tubi. Usare anche più di 3 diluizioni con “*MPN calculator*”

Grazie per l'attenzione

Dino Spolaor
dino.spolaor@venetoagricoltura.org