

# VALIDAZIONE, STIMA DELL'INCERTEZZA E ASSICURAZIONE DEL DATO ANALITICO ALLA LUCE DEI REGOLAMENTI EUROPEI

**Corso ACCREDIA ISS**

**Le disposizioni in materia di sicurezza alimentare  
applicate ai laboratori accreditati**

**Roma**

**15-16 novembre 2011**



*Dott. Stefano De Martin*

*Responsabile Struttura "Promozione e Controllo Qualità"*

# APPROCCIO AD UN PROBLEMA ANALITICO

- ➡ richieste del cliente, normative o esigenze del laboratorio
- ➡ valutazione del possibile processo analitico (verifica del metodo in funzione delle esigenze del cliente)
- ➡ scelta di un metodo



- ◆ applicazione nel laboratorio
- ◆ conferma del metodo
- ◆ valutazione dell'incertezza di misura
- ◆ rapporto di prova

- ▣ progettazione di un metodo
- ▣ validazione di un metodo interno
- ▣ rapporto di prova

# Validazione dei metodi-incertezza di misura- controllo statistico di processo-riesame

distinzioni

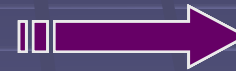
La prima cosa che il laboratorio deve fare è quella di scegliere un metodo che sia conforme alle esigenze del cliente



Dopo aver scelto il metodo il laboratorio verifica se è in grado di eseguirlo



Imposta un controllo di qualità per tenere sotto controllo il metodo



Verifica le prestazioni se sono conformi a quelle riportate su normative, disciplinari ecc...



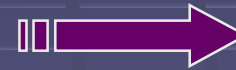
Verifica se i parametri riportati sul metodo sono riproducibili all'interno del laboratorio



Costruisce una carta di controllo del metodo utilizzando i parametri verificati precedentemente

# Validazione dei metodi-incertezza di misura- controllo statistico di processo-riesame distinzioni (II)

Il metodo analitico deve essere riesaminato con regolarità per verificare che tutte i requisiti iniziali siano ancora soddisfatti o sono intervenute modifiche agli stessi



Effettuare una riunione con tutti gli operatori coinvolti nel metodo e riesaminare tutte le caratteristiche: tale attività dev'essere verbalizzata



Quali sono le caratteristiche del metodo da riesaminare???



Numero di analisi/anno, parametri caratteristici del metodo, riesame carte di controllo apparecchiature, requisiti del cliente (modifica normative), materiali di riferimento certificato, abilitazione degli operatori, circuiti interlaboratorio ecc....

# PARAMETRI CARATTERISTICI DI UN METODO ANALITICO

- campo di applicazione (misurando-matrice)
- campo di prova
- selettività-specificità
- ripetibilità
- riproducibilità
- accuratezza
- limite di rilevabilità (LOD)
- limite di quantificazione (LOQ)
- robustezza
- incertezza

# ESIGENZE DEL CLIENTE (Reg. CE 882/2004)

Controlli ufficiali ad opera degli stati membri

Capo III

Campionamento e analisi

Articolo 11

Metodi di campionamento e di analisi.

1. I metodi di campionamento e di analisi utilizzati nel contesto dei controlli ufficiali sono conformi alle pertinenti norme comunitarie oppure:
  - a) se tali norme non esistono, a norme o protocolli riconosciuti internazionalmente, ad esempio quelli accettati dal Comitato europeo di normalizzazione (CEN) o quelli accettati dalla legislazione nazionale; oppure
  - b) in assenza, ad altri metodi utili al raggiungimento degli obiettivi o sviluppati conformemente a protocolli scientifici.
2. Allorquando il paragrafo 1 non è d'applicazione, i metodi di analisi possono essere convalidati in un unico laboratorio conformemente ad un protocollo riconosciuto internazionalmente.
3. I metodi di analisi devono essere caratterizzati, quando possibile, dai criteri

**opportuni elencati nell'allegato III.**

validazione, stima dell'incertezza e assicurazione del dato analitico alla luce dei regolamenti europei

# ESIGENZE DEL CLIENTE (Reg. CE 882/2004)

- Allegato III

- Caratterizzazione dei metodi di analisi

- **1. I metodi di analisi devono essere caratterizzati dai seguenti criteri:**
- a) esattezza;
- b) applicabilità (matrice e gamma di concentrazione);
- c) limite di rilevazione;
- d) limite di determinazione;
- e) precisione;
- f) ripetibilità;
- g) riproducibilità;
- h) recupero;
- i) selettività;
- j) sensibilità;
- k) linearità;
- l) incertezza delle misurazioni;
- m) altri criteri a scelta.

# ESIGENZE DEL CLIENTE (II)

Nel caso il laboratorio adotti un metodo diverso da quello previsto da una disposizione comunitaria (come prima scelta) o da un metodo normalizzato (approvato dal CEN) o da un metodo riportato in una disposizione nazionale (scelta equivalente) deve:

- Giustificare il motivo della scelta;
- Procedere alla verifica dell'equivalenza del metodo scelto con quello normalizzato;
- Effettuare una dichiarazione di idoneità intesa come dichiarazione di equivalenza del metodo al metodo normalizzato in vigore



# VERIFICA DELL'EQUIVALENZA

La verifica dell'equivalenza si esegue mediante l'esecuzione di test statistici tra i parametri di validazione riportati sul metodo normalizzato e quelli ottenuti dal laboratorio

Il laboratorio è tenuto alla verifica di tutti i parametri statistici significativi riportati sul metodo normalizzato (ove applicabile)

I parametri più significativi da prendere in considerazione sono:

- Ripetibilità;
- Recupero o esattezza;
- Limite di rilevabilità, limite di quantificazione

# ESIGENZE DEL CLIENTE (III)

Esempi di esigenze del cliente riportate su disposizioni cogenti

- o Reg. CE 401/2006;
- o Reg. CE 1882/2006
- o Reg. CE 1883/2006;
- o Reg. CE 333/2007;
- o Reg. CE 836/2011

# ESIGENZE DEL CLIENTE

(dal Reg. 836/2011)

- In assenza di metodi specifici stabiliti a livello dell'Unione europea per la determinazione dei contaminanti nei prodotti alimentari, i laboratori sono liberi di applicare qualsiasi metodo di analisi convalidato per la matrice fornita, purché esso rispetti gli specifici criteri di prestazione di cui alle tabelle da 5 a 7.
- Si raccomanda di utilizzare metodi debitamente convalidati (vale a dire metodi convalidati mediante prove interlaboratorio per la relativa matrice) se appropriati e disponibili. È possibile utilizzare anche altre metodi convalidati adeguati (ad esempio metodi convalidati a livello interno per la relativa matrice), purché soddisfino i criteri di prestazione di cui alle tabelle da 5 a 7.
- Se possibile **la convalida dei metodi convalidati a livello interno include materiali di riferimento certificati.**
- a) Criteri di prestazione relativi ai metodi di analisi per il piombo, il cadmio, il mercurio e lo stagno inorganico:
- Tabella 5

Parametro		Criterio	
Applicabilità		Alimenti di cui al <a href="#">regolamento (CE) n. 1881/2006</a>	
Specificità		Nessuna interferenza di matrice o spettro	
Ripetibilità (RSDr)		HORRATr meno di 2	
Riproducibilità (RSDR)		HORRATR meno di 2	
Recupero		Si applicano le disposizioni di cui al punto D.1.2	
Stagno inorganico		Piombo, cadmio, mercurio	
		ML è < 0,100 mg/kg	ML è ≥ 0,100 mg/kg
LOD	≤ 5 mg/kg	≤ un quinto del ML	≤ un decimo del ML
LOQ	≤ 10 mg/kg	≤ due quinti del ML	≤ un quinto del ML

validazione, stima dell'incertezza e assicurazione del dato analitico alla luce dei regolamenti europei

# VALIDAZIONE DI UN METODO ANALITICO.....? (richiami)

## DEFINIZIONI

Con il termine validazione si intende: “la conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi ad una specifica utilizzazione o applicazione prevista sono stati soddisfatti (ISO 9000-2005)

.....La validazione di un metodo è l'intero processo di determinazione dei parametri caratteristici di un metodo analitico (performance analitiche).

In altri termini si può considerare come procedimento di definizione delle caratteristiche analitiche di indispensabile utilizzo quale strumento di conferma e compatibilità con l'applicazione richiesta.

I parametri ricavati dalla validazione si possono ritenere caratteristici del “bene-servizio” che il laboratorio è in grado di fornire.

# QUANDO VALIDARE UN METODO ANALITICO?

...dalla norma UNI CEI EN 17025

*...per i metodi ufficiali o normalizzati, devono essere verificate le capacità operative del laboratorio rispetto a quelle desunte dalla validazione del metodo riportate nella normativa ufficiale; pur non essendoci l'obbligo di riscrivere la metodica analitica nel formato POS adottato dal laboratorio (nota al cap. 5.4.1 della EN 17025).*

# QUANDO VALIDARE UN METODO ANALITICO? (II)

## approccio alla validazione di un metodo

### Quesiti preliminari

Esiste un'adeguata validazione ?

E' necessario un'ulteriore validazione ?

Se esiste un'adeguata validazione, è adatta agli scopi che ci siamo prefissi nella scelta della stessa ?

Se la validazione è adeguata, il laboratorio è in grado di raggiungere le performances indicate dal metodo ?

validazione, stima dell'incertezza e assicurazione del dato analitico alla luce dei regolamenti europei

Individuazione  
di  
un metodo  
analitico

# QUANDO VALIDARE UN METODO ANALITICO? (III)

**Il laboratorio dispone delle caratteristiche richieste dal metodo**

Il laboratorio dovrà verificare che le proprie “performances” operative siano congrue a quelle descritte nel metodo analitico

La verifica deve essere descritta e formalizzata indicando la metodologia ed i criteri scelti per la stessa

Nel caso il laboratorio abbia dimostrato la capacità di raggiungere il livello prestazionale descritto dal metodo, può far propri i parametri di validazione riportati ed utilizzare il metodo analitico scelto all'interno della struttura

# QUANDO VALIDARE UN METODO ANALITICO? (IV)

## METODI INTERNI

...dalla norma UNI CEI EN 17025

*I metodi analitici interni sviluppati dal laboratorio devono essere interamente validati indicando, ove possibile, tutti i parametri che descrivono le performance del metodo analitico (cap. 5.4.3 EN 17025). Tali parametri tornano utili anche nella stesura del rapporto di prova vista la necessità di indicare l'incertezza associata alla misura (cap. 5.4.6 EN 17025).*

*Nel caso vengano apportate alcune modifiche al metodo, il laboratorio dovrà controllare nuovamente i parametri di validazione ed in particolar modo quelli più significativi rispetto alla modifiche apportate.*



# VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITÀ IN HOUSE

SPERIMENTAZIONE INTRALABORATORIO

## *Grandezze caratteristiche della ripetibilità*

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

Scarto tipo di ripetibilità

$$CV\% = \frac{S_r}{\bar{x}} * 100$$

Coefficiente di variazione %

$$r = t * S_r * \sqrt{2}$$

Limite di ripetibilità

**Limite di ripetibilità “r”:** valore al quale o al di sotto del quale, con una probabilità del 95 %, dovrebbe cadere la differenza assoluta tra i due risultati di una prova condotta in doppio

**IL LIMITE DI RIPETIBILITÀ È UNO STRUMENTO EFFICACE PER TENERE SOTTO CONTROLLO IL METODO OVVERO VERIFICARE LA RIPETIBILITÀ NEL TEMPO**

# RIPETIBILITA'

SPERIMENTAZIONE INTRALABORATORIO

*Numero di repliche per determinare la ripetibilità*

**Valutabile mediante algoritmo matematico**

$$\frac{\sigma_{(S\bar{x})}}{\sigma_{(\bar{x})}} = \sqrt{\frac{1}{2(n-1)}} = A$$

n	A	n	A
4	0,41	11	0,22
5	0,35	12	0,21
6	0,32	13	0,20
7	0,29	14	0,20
8	0,27	15	0,19
9	0,25	16	0,18
10	0,24	17	0,17

Indicazioni:

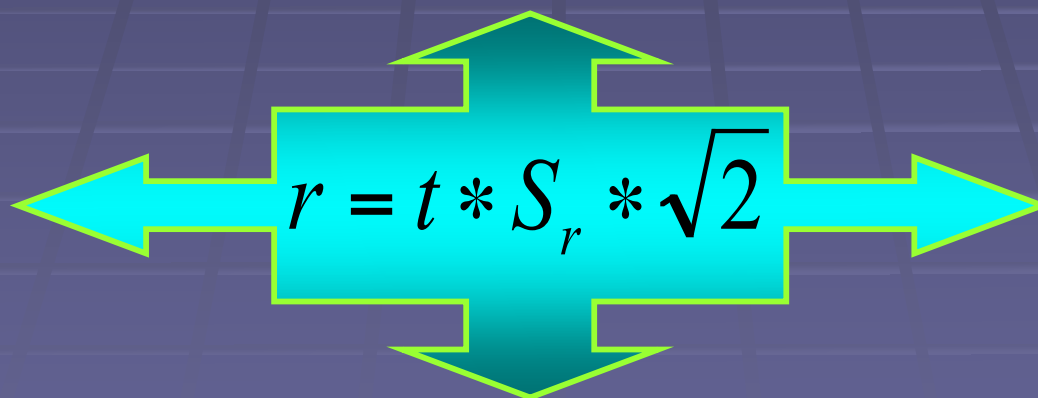
- Effettuare non meno di 4 repliche;
- Il numero di livelli di concentrazione è funzione dell'ampiezza del campo di applicazione del metodo;
- Se l'ampiezza del campo di applicazione è superiore ad un ordine di grandezza, esplorare almeno un livello di concentrazione per ogni ordine di grandezza; in questo caso sono sufficienti 6 repliche per livello;
- Se si esplora un unico livello il numero di repliche consigliato è di 12.

# VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITA'

## *Determinazione del limite di ripetibilità "r"*

Utile agli ispettori per la verifica della ripetibilità del metodo

Può variare in funzione della concentrazione


$$r = t * S_r * \sqrt{2}$$

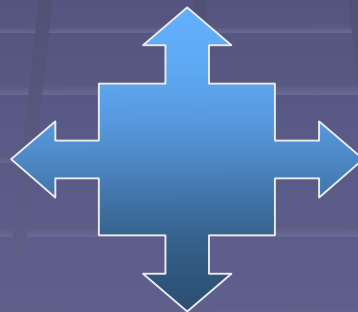
Da valutare almeno per ogni ordine di grandezza

Il suo valore non deve essere superato dalla differenza ottenuta dai risultati di una prova in doppio condotta in condizioni di ripetibilità

# VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITA'

*Valutazione della ripetibilità nel caso di più livelli di concentrazione*

Determinare la ripetibilità ai vari livelli di concentrazione



Scegliere il modello che correli nel miglior modo la ripetibilità alla concentrazione

Utilizzare il modello per calcolare la ripetibilità alla concentrazione desiderata

# UTILIZZAZIONE DELLA RIPETIBILITA'

VERIFICA DELLA RIPETIBILITA'

*Confronto con il  
limite di ripetibilità*

*Determinazione  
prove in doppio*



*Costruzione carta di  
controllo per prove in  
doppio e carta di controllo  
della media*

# CONFRONTI TRA PRECISIONI

## RICHIAMI

Il confronto tra precisioni si effettua tramite un F test che verifica se due precisioni sono compatibili tra di loro indi se è possibile confrontare due medie diverse

- Si replicano n misure con il metodo alternativo proposto dal laboratorio si calcola lo scarto tipo e lo si rapporta allo scarto tipo del metodo normalizzato di riferimento
- Si calcola il rapporto  $F = S^2_{MR} / S^2_{ML}$  con  $S^2_{MR} > S^2_{ML}$
- Si verifica che il valore calcolato sia inferiore al valore tabellato per n-1 gradi di libertà e per una probabilità al 95 %

SE

$$F_{calc} < F_{tab}$$

***LE DUE PRECISIONI SONO  
COMPATIBILI TRA LORO***

# F TEST

F test verifica se due precisioni sono compatibili tra di loro  
indi se è possibili confrontare due medie diverse

- Si replicano n misure e si calcola lo scarto tipo per le due serie di misure ottenute con i due metodi
- Si calcola il rapporto  $F = S_a^2 / S_b^2$  con  $S_a^2 > S_b^2$
- Si verifica che il valore calcolato sia inferiore al valore tabellato per n-1 gradi di libertà e per una probabilità al 95 %

SE

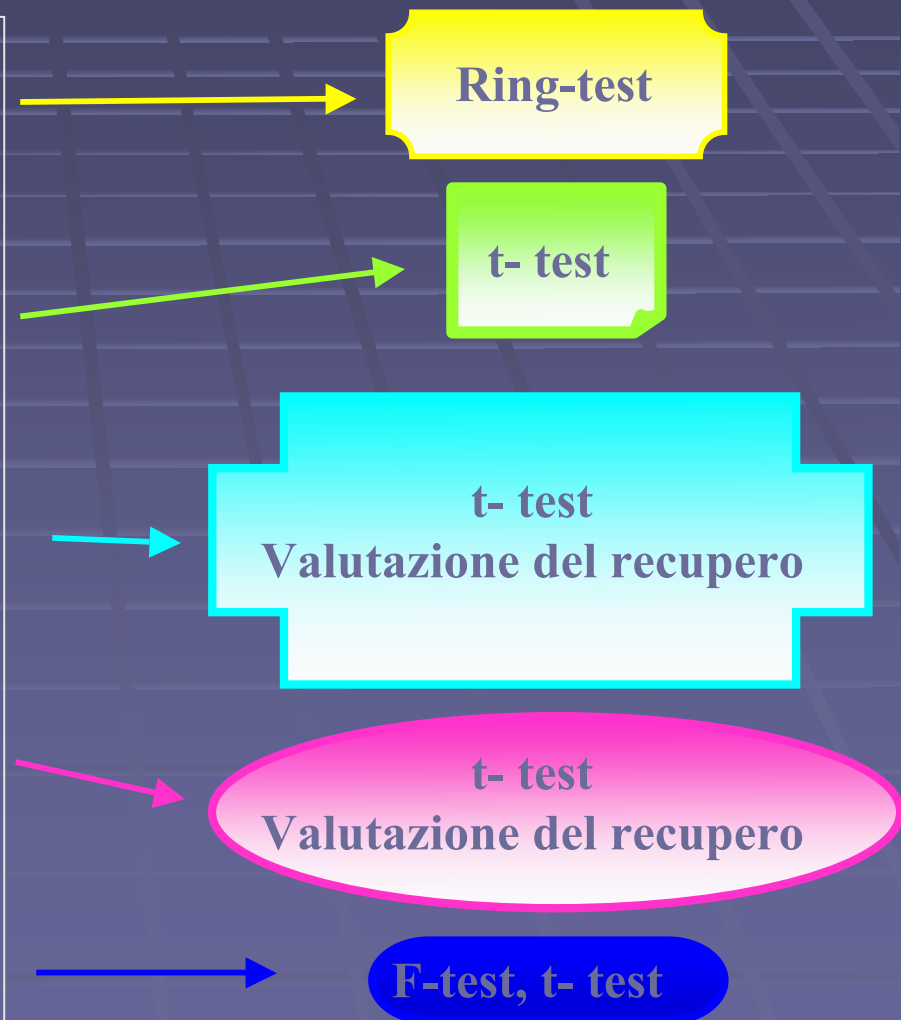
$$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$$

***LE DUE PRECISIONI SONO  
COMPATIBILI TRA LORO***

# ESATTEZZA

(ACCURATEZZA DELLE MEDIA)

- ☐ Partecipazione a circuiti interlaboratorio;
- ☐ Confronto tra la media dei risultati ottenuti con il metodo in validazione e un valore di riferimento accettato  $\mu$ ;
- ☐ Utilizzo di un materiale di riferimento certificato (CMR);
- ☐ Utilizzo di un materiale di riferimento di laboratorio (LMR);
- ☐ Utilizzo di un metodo normato o di riferimento come confronto





# RECUPERO

...Nel caso di matrici solide o liquide-complesse, la media dei risultati ottenuti deve essere confrontata con la quantità di misurando aggiunto (M) ricavandone il recupero percentuale medio (R%):

$$R\% = \frac{\bar{x}}{M} \cdot 100$$

Si confronta il recupero ottenuto con i requisiti previsti da ogni singolo metodo, quando previsti, o da norme o documenti applicabili.

# + TEST

Il t test verifica l'accuratezza della media con un valore certificato  $\mu$  o con un valore preso come valore di riferimento

- Si replicano n misure e si calcola  $\bar{x}_{\text{medio}}$  e dev. Standard
- Si calcola l'intervallo di confidenza della media
- Si verifica che il valore teorico rientra nell'intervallo di confidenza

$\mu$



$$\bar{x} - t \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$\bar{x}_{\text{medio}}$

$$\bar{x} + t \frac{S}{\sqrt{n}}$$

**RISULTATO ESATTO**

# CONFRONTI TRA ESATTEZZE

## RICHIAMI

Il confronto tra esattezze non è altro che effettuare un t-test tra il metodo normalizzato e il metodo equivalente utilizzando un materiale di riferimento certificato. Il confronto dovrebbe essere fatto allo stesso livello di concentrazione

$$t_{calc} = \frac{|\bar{X}_{MR} - \bar{X}_{ML}|}{\sqrt{\frac{S_{MR}^2}{n} + \frac{S_{ML}^2}{m}}} \leq t_{p,v}$$

$$v = \frac{(S_{MR}^2 / n + S_{ML}^2 / m)^2}{\left(\frac{S_{MR}^2 / n}{n} + \frac{S_{ML}^2 / m}{m}\right)^2} * (n - 1)$$

# VERIFICA DEL RECUPERO

## contributo della valutazione del recupero (BIAS o esattezza)

la valutazione del recupero è quella di verificare se risulta pari a 1 (100%) mediante un CRM o un campione spiked, gli algoritmi da utilizzarsi sono:

$$t_{calc} = \frac{|C_{CRM} - \bar{X}|}{\sqrt{\frac{S_{rec}^2}{n} + u_{CRM}^2}} \leq t_{p,v}$$

$$v = \frac{(S_r^2 / n + u_{CRM}^2)^2}{\left(\frac{S_r^2}{n}\right)^2} * (n - 1)$$

Il laboratorio, per dimostrare la completa riferibilità metrologica del metodo è tenuto a verificare l'esattezza del metodo alternativo utilizzando un materiale di riferimento certificato (CRM) ove disponibile

# CONFRONTI TRA ESATTEZZE

Fortunatamente molti metodi normalizzati riportano il recupero del metodo quindi, in questo caso è sufficiente:

- Verificare se il recupero del metodo proposto dal laboratorio rientra nell'intervallo dichiarato del metodo normalizzato
- Verificare se il recupero del metodo proposto dal laboratorio sia uguale o superiore a quello dichiarato del metodo normalizzato

# LIMITE DI RILEVABILITA' (LOD)

‡ Metodo IUPAC-ISTISAN;

‡ Metodo iperbole fiduciale;

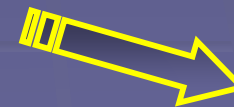
‡ Metodo propagazione dell'errore



Empirico



Statistico più rigoroso



Statistico tiene conto di tutte le possibili variabilità sperimentali

# LIMITE DI QUANTIFICAZIONE (LOQ)

⌚ Metodo IUPAC-ISTISAN;

⌚ Metodo iperbole fiduciale;

⌚ Metodo propagazione dell'errore

**LOQ da adottare deve sempre essere verificato!!!**

Empirico

Statistico più rigoroso

Statistico tiene conto di tutte le possibili variabilità sperimentali

# LIMITE DI RILEVABILITA' (LOD) E LIMITE DI QUANTIFICAZIONE (LOQ)

METODO IUPAC,  
ISTISAN et al.



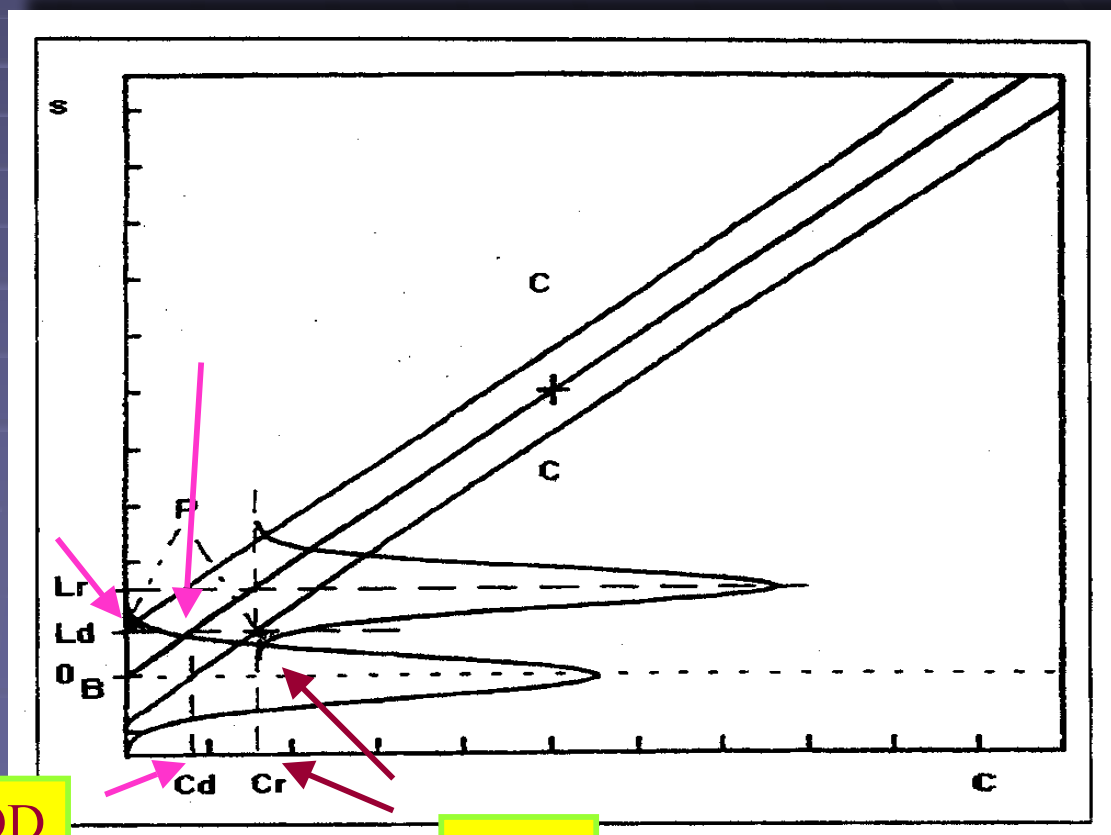
LOD

$$Y_{LOQ} = Y_{BIANCO} + 3 S_{BIANCO}$$

LOQ

$$Y_{LOQ} = Y_{BIANCO} + 10 S_{BIANCO}$$

METODO IPERBOLI FIDUCIALI  
PROPAGAZIONE DELL'ERRORE



LOD

LOQ



# LIMITE DI RILEVABILITA' (LOD) PER PROVE QUALITATIVE esempio

....determinare in modo empirico la concentrazione soglia (cut-off)  
al di sotto della quale la specificità diventa inapplicabile

Eseguire le prove con almeno 10 repliche con concentrazioni decrescenti



POSITIVO



NEGATIVO

10 mg/L



E 90%

5 mg/L



E 50%

1 mg/L



E 30%

0,5 mg/L



E 10%

*Assumendo una possibilità di errore del 10 % il LOD risulta di 0,5 mg/L*

# CONFRONTI DI LOD E LOQ

Il confronto tra limite di rilevabilità e/o limiti di quantificazione possono essere eseguiti con i criteri visti precedentemente

- Spesso i metodi normalizzati riportano semplicemente il limite di rilevabilità e/o quantificazione senza avere dati delle performance con i quali sono stati ottenuti. In questi casi il laboratorio deve determinare sperimentalmente il LOD/LOQ. E' sufficiente che il due limiti siano inferiori a quelli riportati sul metodo normalizzato.

# DOCUMENTAZIONE E REGISTRAZIONI

1. Il laboratorio deve disporre di documenti di sistema che descrivano le attività da eseguirsi per effettuare la dimostrazione di equivalenza (compresi di algoritmi, formule e riferimenti ad eventuali fogli elettronici di calcolo).
2. I calcoli e le dimostrazioni di equivalenza devono essere riportati in documenti di registrazione.
3. Le attività devono essere descritte in piani di validazione
4. Deve essere disponibile in laboratorio un documento che riporti la dichiarazione di idoneità (o equivalenza del metodo) a tal proposito cfr RT 08 Accredia

# INCERTEZZA DI MISURA

# RICHIAMI NORMATIVI

## UNI CEI EN ISO 17025 § 5.10.3 RAPPORTO DI PROVA

*5.10.3.1 in aggiunta a quanto riportato in 5.10.2, i rapporti di prova, quando è necessario per l'interpretazione del risultato, devono includere:*

*C)quando applicabile, una dichiarazione circa l'incertezza di misura stimata; Informazioni, nel rapporto di prova, circa l'incertezza di misura sono necessarie;*

*Quando ciò è importante:*

- Per la validità o l'applicazione dei risultati di prova;*
- Quando le istruzioni del cliente lo richiedono;*
- Quando l'incertezza ha influenza sulla conformità ad un limite di specifica.*

# APPROCCIO AL PROBLEMA

## DEFINIZIONI

### DEFINIZIONE

*parametro che caratterizza la dispersione dei valori che potrebbero essere ragionevolmente attribuiti al misurando*

*"dispersione dei valori"*



PRECISIONE

*"ragionevolmente attribuiti al misurando"*



ESATTEZZA

# APPROCCIO AL PROBLEMA

## DEFINIZIONI

- **Precisione**: grado di accordo fra i risultati indipendenti ottenuti con un procedimento di analisi in condizioni ben specificate (ISO 5725:1994)
- **Esattezza (*trueness*)**: grado di accordo tra il valore medio ottenuto da una larga serie di risultati e il valore di riferimento accettato (ISO 5725:1994)

# APPROCCIO AL PROBLEMA (IV)

riferito alle condizione di precisione

*Considerando che questo modo di procedere è ideale; nella pratica, come può un laboratorio affrontare il problema dell'incertezza dei risultati?*

## I° modo

Partire dalla ripetibilità ristretta ed aggiungere i vari contributi (tarature, tempo operatore ecc.)

## II° modo

Utilizzare un dato di precisione in termini di riproducibilità che è la grandezza che più si avvicina alle condizioni di massima variabilità delle misure



# APPROCCIO AL PROBLEMA (V)

riferito alle condizione di accuratezza

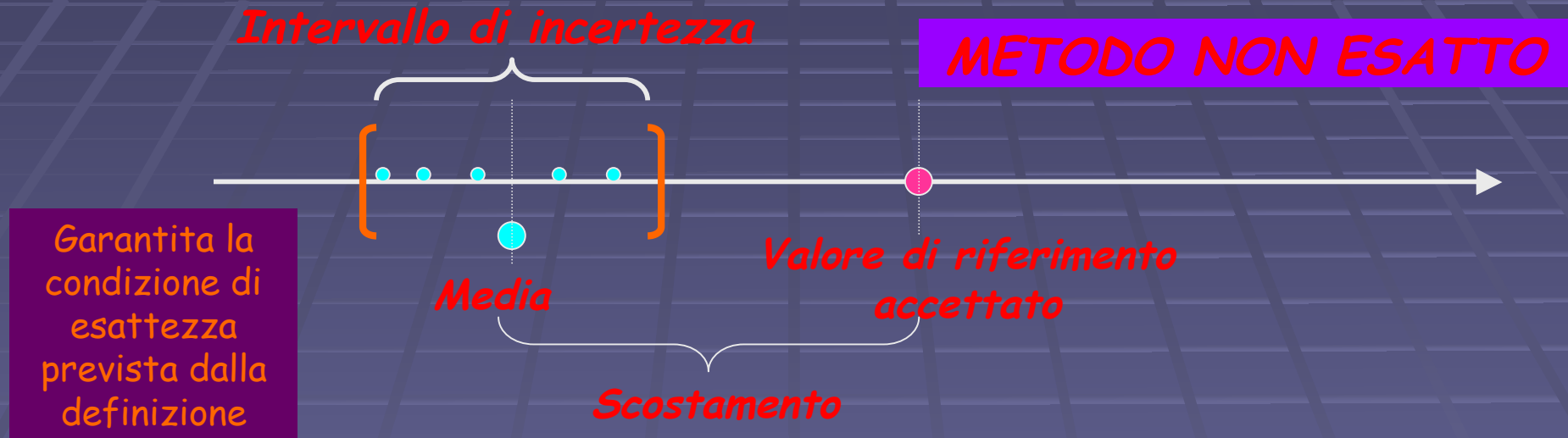
*...la locuzione "ragionevolmente attribuiti al misurando" fa pensare ad una significatività statistica dell'intervallo di incertezza ovvero che al suo interno sia contenuto il valore di riferimento accettato*

*Ciò si traduce che, qualunque sia l'approccio di calcolo utilizzato per la stima dell'incertezza, la condizione necessaria per rispettare la definizione di incertezza, è che il metodo in questione produca risultati esatti cioè che i test statistici (t-test, test sul recupero ecc.) sull' esattezza siano favorevoli*

# APPROCCIO AL PROBLEMA (VI)

riferito alle condizione di accuratezza

Esempio grafico



# ESPRESSIONE DELL'INCERTEZZA

## END POINT

- OMOGENEA PER TUTTI I LABORATORI
- INDICATA COME INTERVALLO CENTRATO ATTORNO AL VALORE DEL MISURANDO
- ESPRESSA CON LE STESSUE UNITA' DI MISURA DEL MISURANDO

# CRITERI ACCETTATI PER LA VALUTAZIONE DELL'INCERTEZZA

- **Approccio classico metrologico**  
(GUM o bottom up) UNI CEI ENV 13005
- **Approccio olistico o decostruttivo** (tradizionale chimico o top-down), sperimentazione secondo ISO 5725
- **Approccio secondo Horwitz**

# APPROCCIO METROLOGICO

# CRITERIO METROLOGICO

## PRINCIPIO DEL METODO

- Definizione delle grandezze d'ingresso e dei rispettivi misurandi
- Identificazione delle sorgenti di incertezza
- Scomposizione dei contributi (di categoria **A** e di categoria **B**)
- Semplificazione delle componenti che ricadono nella ripetibilità
- Quantificazione dei componenti all'incertezza
- Calcolo dell'incertezza composta
- Calcolo dell'incertezza estesa

# CRITERIO METROLOGICO

## SCOMPOSIZIONE DELLE INCERTEZZE

L'incertezza di misura, in generale, comprende più componenti. Talune di queste, indicate come categoria **A**, o del I tipo, possono essere valutate dalla distribuzione statistica dei risultati di serie di misurazioni e possono dunque essere caratterizzate mediante scarti tipo sperimentali (incertezza di ripetibilità)

Le altre componenti, indicate di categoria **B** o del II tipo, anch'esse caratterizzabili mediante scarti tipo, sono valutate da distribuzioni di probabilità ipotizzate sulla base dell'esperienza o di informazioni di altro tipo

# CRITERIO METROLOGICO

## SCOMPOSIZIONE DELLE INCERTEZZE

### Contributi di categoria "A"

▣ Ripetibilità

### Contributi di categoria "B"

- 🔊 incertezza sui materiali utilizzati per la taratura strumentale
- 🔊 esperienza o conoscenza generale del comportamento e delle proprietà dei materiali e strumenti di interesse
- 🔊 specifiche tecniche del costruttore
- 🔊 dati forniti in certificati di taratura (bilancia e vetreria)
- 🔊 dati di misurazioni precedenti
- 🔊 Incertezza della taratura strumentale
- 🔊 **Incetenza nella valutazione del recupero**



# SCOMPOSIZIONE DEI CONTRIBUTI ALL'INCERTEZZA

Criterio metrologico

Fasi	Contributi all'incertezza delle componenti di tipo A e B	Fonte	Gradi di libertà
Pesata	Misura cat. <b>A</b>	$u_r$	n-1
	Taratura cat. <b>B</b>	Cert. taratura	$\infty$
Diluizione	Misura cat. <b>A</b>	$u_r$	n-1
	Tolleranza vetreria o pipette cat. <b>B</b>	Catalogo o scheda taratura	$\infty$
<b>Trattamento</b>	<b>Coefficiente recupero cat. B</b>	<b>Sperimentale</b>	<b>n-1</b>
Misura finale	Misura cat. <b>A</b>	$u_r$	n-1
	Taratura strumento cat. <b>B</b>	Curva taratura	n-1 n-2
	Incertezza nominale std. riferim <b>B</b>	Cert. fornitore	$\infty$
Ripetibilità	Scarto tipo di ripetibilità cat. <b>A</b>	$u_r$	n-1

# CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA (I)

Criterio metrologico

Legge generale di propagazione delle  
incertezze

$$\dot{u}_s = \sqrt{\sum \dot{u}_i^2}$$

$$\dot{u}_s = \sqrt{\dot{u}_{rip}^2 + \dot{u}_{tar}^2 + \dot{u}_{rif}^2 + \dot{u}_{rec}^2}$$

# CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA (III)

Criterio metrologico

## contributo della valutazione del recupero (BIAS o esattezza)

la prima operazione da fare è la valutazione del recupero e verificare se è pari a 1 (100%) mediante un CRM o un campione spiked)

$$t_{calc} = \frac{|C_{CRM} - \bar{X}|}{\sqrt{\frac{S_{rec}^2}{n} + u_{CRM}^2}} \leq t_{p,\nu}$$

$$\nu = \frac{(S_r^2 / n + u_{CRM}^2)^2}{\left(\frac{S_r^2}{n}\right)^2} * (n - 1)$$

# CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA (IV)

Criterio metrologico

- 
- ⊗ Recupero significativamente uguale a 1
  - ⊗ Recupero significativamente diverso da 1 ed applicato per correggere il risultato
  - ⊗ Recupero significativamente diverso da 1 ma non applicato per correggere il risultato analitico


Il contributo del recupero è considerato compreso nel contributo di ripetibilità

# CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA (VI)

Criterio metrologico

⚙️ Recupero significativamente diverso da 1 ed applicato per correggere il risultato

$$\dot{u}_{rec} = \sqrt{\frac{s_{rec}^2}{m} + \dot{u}_{CRM}^2}$$

$$\dot{u}_s = \sqrt{\dot{u}_{rip}^2 + \dot{u}_{tar}^2 + \dot{u}_{rif}^2 + \dot{u}_{rec}^2}$$



# CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA (V)

Criterio metrologico

⊗ **Recupero significativamente diverso da uno ma non applicato per correggere il risultato analitico** (indicazione VAM)

$$u(\bar{R}_m) = \frac{S_{rec}}{m}$$

$$\dot{u}_{rec} = \sqrt{\left(\frac{1 - \bar{R}_m}{K}\right)^2 + u(\bar{R}_m)^2 + \dot{u}_{CRM}^2}$$

$$\dot{u}_s = \sqrt{\dot{u}_{rip}^2 + \dot{u}_{tar}^2 + \dot{u}_{rif}^2 + \dot{u}_{rec}^2}$$


# CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA (VIII)

Criterio metrologico

Algoritmo per il calcolo dei gradi di libertà effettivi per l'estrapolazione del fattore di copertura

$$v_{eff} = \frac{u_c^4}{\sum [u_i^4 / v_i]}$$

Formula di Welch-Satterthwaite

Utilizzare  $v_{eff}$  per ricavare il t di student dalle tabelle

# APPROCCIO OLISTICO

Approccio classico di tipo chimico



# APPROCCIO OLISTICO: FONDAMENTI

LA GRANDEZZA SIGNIFICATIVA  
PRESA IN CONSIDERAZIONE COME  
PARAMETRO FONDAMENTALE PER LA  
VALUTAZIONE DELL'INCERTEZZA È  
LA RIPRODUCIBILITÀ DEL METODO

# APPROCCIO OLISTICO: FONDAMENTI

- ▣ La riproducibilità del metodo è il parametro completo nella valutazione della precisione; tiene conto di tutte le possibili variabilità all'interno e all'esterno dei laboratori
- ▣ Si attribuisce alla riproducibilità il valore dell'incertezza composta e successivamente, tramite opportuno fattore di copertura, si ottiene l'incertezza estesa

# CONDIZIONI PER L'APPLICABILITÀ

## Criterio olistico

- Conoscere lo scarto tipo di riproducibilità, o limite di riproducibilità o coefficiente di variazione della riproducibilità, estratti dal **metodo normalizzato**; (previa verifica delle performances del laboratorio con quelle del metodo pubblicato)
- In assenza di informazioni l'alternativa è la partecipazione a esercizi di interlaboratorio

# CONDIZIONI PER L'APPLICABILITÀ

Criterio olistico

Conoscere il dato di riproducibilità, ad un livello di concentrazione, non ne permette l'utilizzo ad un diverso livello di concentrazione (se ne potrebbe permettere l'utilizzo in un intorno di massimo il 20 %)

# ESPRESSIONE DEL RISULTATO

Criterio olistico

$$(y \pm K S_R) \text{ u.m.}$$

$y$  Valore misurando  
 $K$  Fattore di copertura  
 $S_R$  Scarto tipo di  
riproducibilità  
 $\text{u.m.}$  Unità di misura

=2 al 95% di probabilità

= $t$  di Student per N.g.L.  
effettivi, valutati dalla  
riproducibilità

# CRITERIO HORWITZ

$$CV_R\% = 2^{(1-0,5\log C)}$$

$CV_R\%$  = scarto tipo di riproducibilità relativo percentuale  
 $C$  = concentrazione come frazione di massa

- Valutazione empirica eseguita per prove chimiche con dati obsoleti
- Alcuni Autori indicano di utilizzare la predittività limitandosi all'intervallo 120 ppb-10 ppm
- Alcuni autori indicano di utilizzare sotto i 120 ppb la seguente:  $\sigma_R = 0,22C$

# PERCHE' IMPOSTARE UN PROGRAMMA DI ASSICURAZIONE DELLA QUALITA'?

## RICHIESTO DALLA NORMA DI RIFERIMENTO?

- Indispensabile per garantire che la "correttezza" del dato analitico
- Condizione necessaria è sufficiente per dire che il metodo è sotto controllo statistico
- Metodo sotto controllo statistico significa che le "performances" del metodo, determinate in fase di validazione del metodo (metodo interno) o le performances del metodo (normalizzato) verificate in fase di conferma del metodo sono garantite nel tempo
- Solo nel caso di esito positivo del controllo di qualità il laboratorio è autorizzato a convalidare il risultato della prova e quindi trascrivere il risultato sul rapporto di prova prima della sua emissione

# ASSICURAZIONE DELLA QUALITA' considerazioni generali

- Il laboratorio deve adottare un programma/piano di assicurazione della qualità adeguato e conforme agli scopi che si è prefissato

- Attivare il programma di assicurazione della qualità per tutti i metodi analitici scegliendo una periodicità congrua con il tipo di prova e con le esigenze del laboratorio

- Assicurarsi che il programma di assicurazione della qualità non sia inutile o scarso e verificare la sua efficacia nel tempo



# ASSICURAZIONE DELLA QUALITA' considerazioni generali/2

- Impostare il controllo qualità su tutto il procedimento analitico e non soltanto su alcune fasi della prova

- Indispensabile (quando percorribile) l'impostazione di un controllo qualità sia interno che esterno

- Assicurarsi che il programma venga attuato ed il personale sia consapevole dell'importanza del controllo di qualità del metodo

# ASSICURAZIONE DELLA QUALITA' considerazioni generali/3

- Verificare che gli operatori verifichino l'accettabilità del risultato "del campione di controllo"

- Verificare le registrazioni dei campioni del controllo di qualità

- Assicurarsi che il laboratorio verifichi ed analizzi con regolarità le linee di tendenza dei campioni del controllo di qualità

# ASSICURAZIONE DELLA QUALITA' considerazioni generali/4

- Verificare che gli strumenti del controllo di qualità siano idonei "carte di controllo, limite di ripetibilità,  $K_p$ ,  $\chi_{sp}^2$  (riesame del metodo ...)

- Utilizzare campioni e materiali per il controllo di qualità idonei e significativi per la prova in questione

- Il laboratorio deve registrare i risultati dei circuiti interlaboratorio in un documento di sintesi che deve rendere disponibile all'ente di accreditamento (Rt-24 Accredia)

# POSSIBILI TIPOLOGIE DI CONTROLLO QUALITA'

Programma di assicurazione della qualità  
prove chimiche

## CONTROLLO INTERNO

- Prove in doppio (R-chart)
- Controllo del bianco
- Prove con aggiunta di analita di interesse (spike)
- Campione a titolo noto (X-chart)
- Utilizzo di materiali di riferimento (campioni "civetta")

## CONTROLLO ESTERNO

- Proficiency test-ring test (prove valutative)
- Studi collaborativi
- Certification study

**Registrazioni !!!!!**

validazione, stima dell'incertezza e assicurazione del dato analitico alla luce dei regolamenti europei

# POSSIBILI TIPOLOGIE DI CONTROLLO QUALITA'

Programma di assicurazione della qualità  
in microbiologia



## CONTROLLO INTERNO

- Prove in doppio Verifica Kp
- Prove replicate  $X^2$
- Proporzionalità delle diluizioni  $G^2$
- Campioni bianchi
- Campioni positivi
- Utilizzo di materiali di riferimento (certificati ??)



## CONTROLLO ESTERNO

- Proficiency test-ring test

**Registrazioni !!!!!**

validazione, stima dell'incertezza e assicurazione del dato analitico alla luce dei regolamenti europei

# CONTROLLO DI QUALITA' PIANIFICAZIONE

## CRITERI DA UTILIZZARSI PER LA PIANIFICAZIONE DEL CONTROLLO QUALITA' DEL LABORATORIO

*La frequenza di partecipazione ai confronti interlaboratorio, come per le altre attività relative alla assicurazione della qualità dei risultati, ove non richiesta da requisiti cogenti, deve essere stabilita dal laboratorio in funzione dei rischi connessi alla eventuale espressione di risultati non validi in campioni reali ed in relazione a risultati non conformi di confronti interlaboratorio, valutati statisticamente (ISO 13528). (RT-24 rev. 1 Accredia)*

- Rischio (anche sulla base della tipologia di analita e di matrice e impatto sulla salute)
- Valutare l'eventuale integrazione con i controlli interni disponibili
- Tipologia di matrice utilizzata e controlli esterni

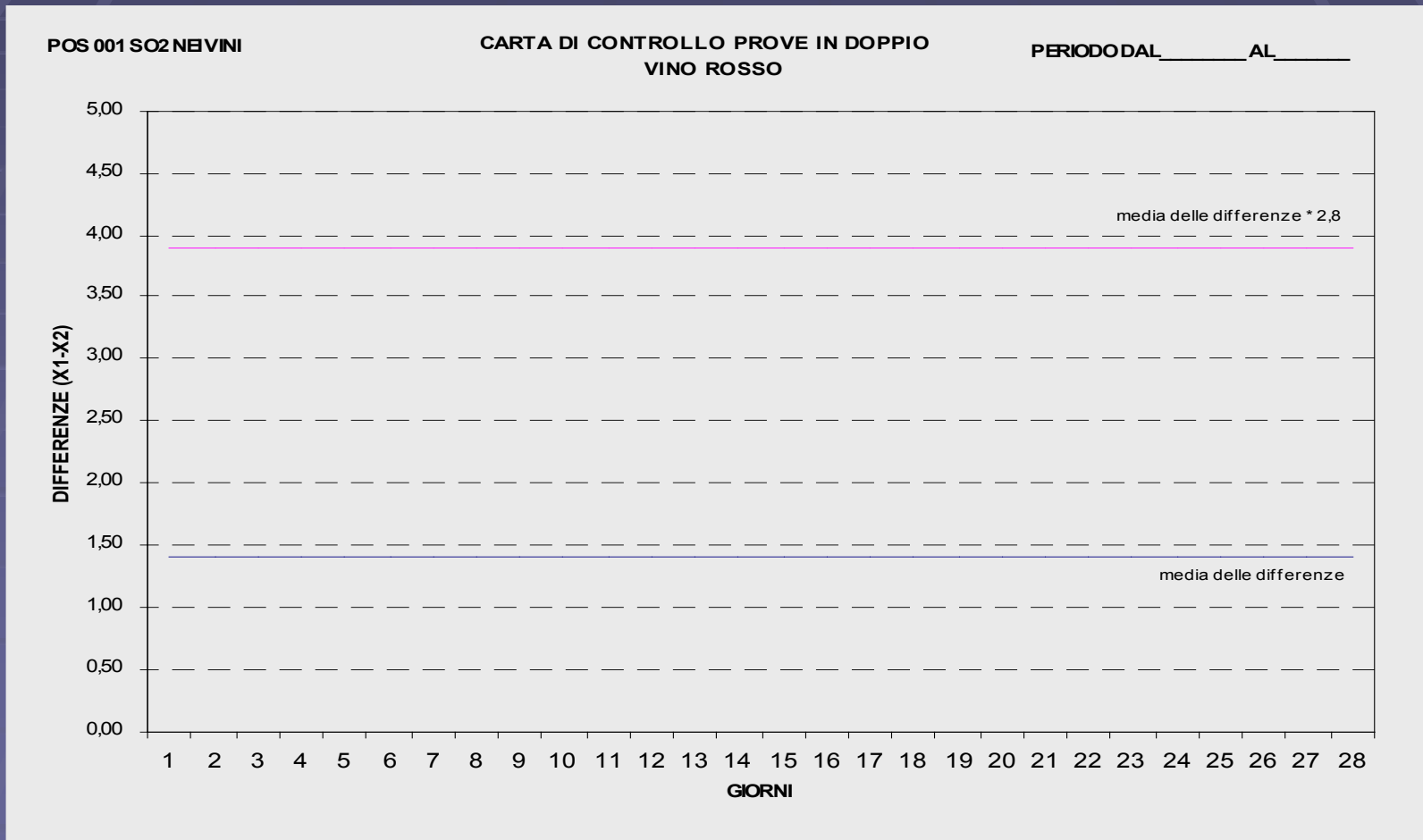
# CONTROLLO INTERNO DI QUALITA'

- E' il controllo più facile da eseguire in laboratorio e la scelta può essere fatta su vari tipi di controlli;
- Preliminarmente fare una attenta valutazione della natura, della stabilità nel tempo, dell'omogeneità della matrice di partenza e del analita di interesse;
- Verificare la disponibilità del laboratorio;
- Scegliere il tipo di controllo sulla base delle disponibilità economiche del laboratorio;
- Riportare su carta di controllo i risultati per poter eseguire le analisi di tendenza

*il controllo dev'essere efficace e significativo*

# VERIFICA DELLA RIPETIBILITA'

CARTA DI CONTROLLO PROVE IN DOPPIO (R chart)





# VERIFICA DELLA RIPETIBILITA' E ESATTEZZA

CARTA DI CONTROLLO DELLA MEDIA (X chart)



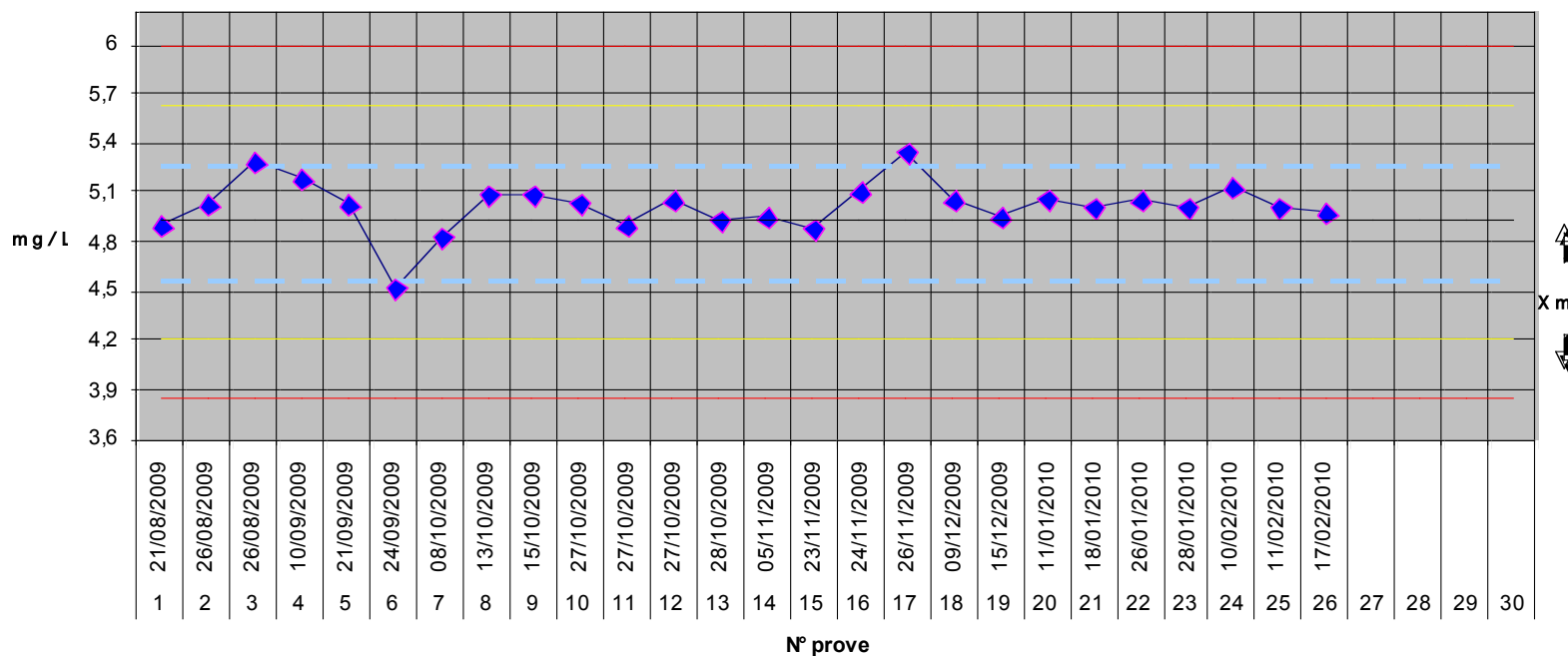
[RTORNA FOGLIO DATI](#)

CARTA CONTROLLO NITRATI NELLE ACQUE  
POS 028 ID264/2009

$\bar{X}_m$   
 +1s (OK)  
 +2s (UWL)  
 +3s (LCL)

ARPA FVG

"Lo scarto tipo utilizzato per la costruzione della carta di controllo è stato calcolato dopo standardizzazione di 20-30"



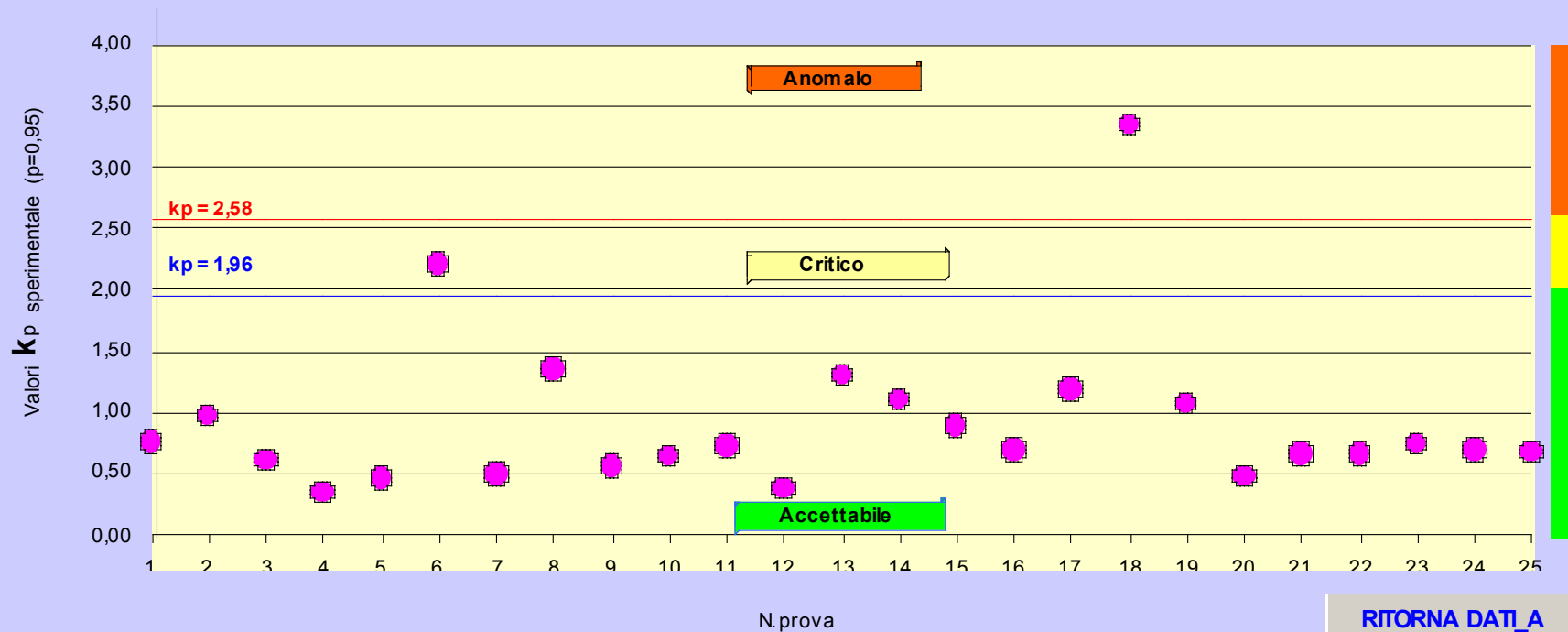
[RTORNA FOGLIO DATI](#)

# VALUTAZIONE DELLA RIPETIBILITA' DEI CONTEGGI applicazione

Operatore **A**

**CARTA CONTROLLO  $K_p$**   
RIPETIBILITA' PROVE MICROBIOLOGICHE  
conta su piastra in duplicato  
( range tra 15 e 300 U.F.C./piastra )

Determinazione: Coliformi totali acque superficiali - Metodo IRSA 7010 B2 MF substrato cromogeno

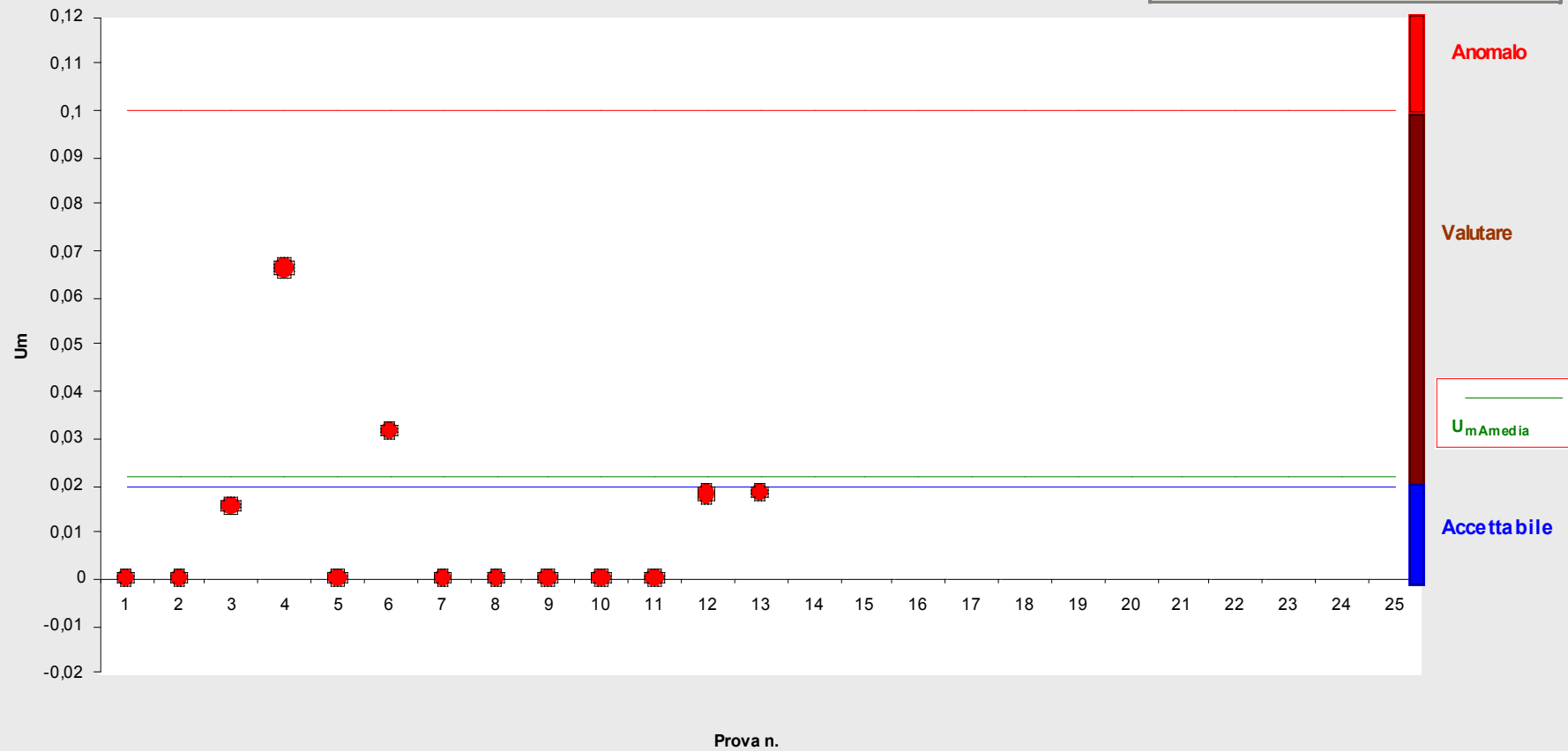


# VERIFICA AFFIDABILITA' DELL'OPERATORE applicazione

RIPETIBILITA' CONTEGGIO OPERATORE A

RITORNA FOGLIO DATI -Operatore A

RITORNA INDICE



# CONTROLLO ESTERNO DI QUALITA' <sub>(I)</sub>

## SCELTA DEL TIPO DI RING-TEST

- Ente accreditato ISO 17043;
- Autorevolezza dell'ente organizzatore;
- Programma temporale di sviluppo del ring-test;
- Trasmissione dei risultati al laboratorio (tempistica, chiarezza, significatività, elaborazione statistica)
- Eventuali segnalazioni di risultati scadenti

criteri da esplicitare su procedure organizzative di controllo della qualità analitica

# CONTROLLO ESTERNO DI QUALITA'

(Pianificazione)

- E' il controllo più difficile da mettere in atto in laboratorio per la scarsa disponibilità di circuiti disponibili sul mercato e per il loro costo;
- Preliminarmente fare una attenta valutazione della natura, della stabilità nel tempo, dell'omogeneità della matrice di partenza e dell'analita di interesse;
- Verificare la disponibilità del laboratorio;
- Scegliere il tipo di controllo sulla base delle disponibilità economiche del laboratorio

# CONTROLLO ESTERNO DI QUALITA' <sup>(II)</sup>

## PIANIFICAZIONE

*La partecipazione ai confronti interlaboratorio, ove applicabile, deve coprire tutte le prove oggetto di accreditamento, in termini di materiale/matrice/prodotto, misurando/proprietà misurata e metodo di prova (RT-24 r.1)*

*Per soddisfare le richieste di questa procedura il laboratorio deve, per prima cosa, classificare ciascuna sua prova accreditata in funzione di materiali/matrici/prodotti e delle discipline e subdiscipline. Questa classificazione porta a selezionare il confronto interlaboratorio che interessa tutte le prove che rientrano in una subdisciplina. Per definire le discipline e le subdiscipline è necessario individuare prodotti/matrici/materiali, misurandi/proprietà misurate e tecnica di prova o misura.*