

5.4. Metodi di prova e validazione

- Scelta dei metodi (preferibilmente normati)
- Metodi interni: definizione dei requisiti (ISO 78/2)
- **Validazione dei metodi**
- **Incertezza di misura - necessaria anche per i laboratori di prova, eventualmente con procedure semplificate.**
- Controllo dei dati e del software

Scelta dei metodi

Il Laboratorio **deve**, ove possibile, utilizzare metodi e procedure di prova definiti da Norme, Regole Tecniche o Metodi ufficiali in vigore.

Sono accettati i progetti di Norma (ISO FDIS, prEN, prENV, ecc.), solo nella forma sottoposta al voto finale.

Il SINAL non riconosce come metodi normati articoli pubblicati su riviste o istruzioni dei fornitori delle apparecchiature: in tali casi il laboratorio richiederà l'accreditamento mediante l'emissione di un metodo interno.

Scelta dei metodi

KIT: certificati (es. validazione AFNOR, AOAC) sono accettabili - deve essere anche accreditato il corrispondente metodo normato (alcuni kit sostituiscono solo parte del metodo, per esempio Salmonella Vidas; inoltre se scade la validazione non si possono più usare).

Norme superate o progetti di norma sono accettati se ad essi fanno riferimento la normativa cogente o le norme per la certificazione di prodotto.

Scelta dei metodi... ...adeguati alle necessità del cliente

E' bene sottolineare come le incertezze analitiche debbano essere **compatibili con lo scopo** per cui il dato è prodotto e non necessariamente le più basse tecnicamente raggiungibili in un'ottica di sostenibilità dei costi.

Manuale UNICHIM 197

CEN/TS 15675:2007 - Emissioni da sorgente stazionaria

- Il laboratorio deve usare procedure scritte come specificato in EN 15259.
- I metodi utilizzati devono fare riferimento a normativa primaria (Direttive) o normativa accettata dalla direttiva IPPC.
- Se è indicato un metodo, non è ammesso modificarlo o usarne uno sostitutivo.

Identificazione delle prove (PT-0002)

- Evitare di indicare *determinazione di...*
- Indicare il materiale/prodotto corretto riportato nel campo di applicazione del metodo.
- Un metodo dovrebbe comparire una sola volta.
- Riportare dettagli delle proprietà determinate (es. non generico *Pesticidi*, ma anche i singoli principi attivi ricercati, lo stesso vale per *Metalli*, ecc.)
- Alcuni “metodi” ufficiali non contengono sufficienti informazioni... E’ necessario indicare anche metodi di prova normati o interni.
- Prestare attenzione all’aggiornamento normativo.

Contenuto dei metodi interni

- identificazione appropriata;
- scopo;
- descrizione del tipo di oggetto da provare o tarare;
- parametri o grandezze e campi di misura da determinare;
- attrezzature e apparecchiature, compresi i requisiti tecnici di prestazione;
- campioni di riferimento e materiali di riferimento richiesti;
- condizioni ambientali e periodo di stabilizzazione richiesto;
- descrizione della procedura, comprendente: apposizione di marchi di identificazione, manipolazione, trasporto, immagazzinamento e preparazione degli oggetti da provare; verifiche da effettuare prima di iniziare le attività: verifiche del buon funzionamento dell'apparecchiatura e, se richiesto, taratura e messa a punto prima dell'utilizzo; metodi di registrazione delle osservazioni e dei risultati; tutte le misure di sicurezza da osservare;
- criteri e/o requisiti per l'approvazione / rifiuto;
- dati da registrare e i metodi di analisi e di presentazione;
- incertezza o le procedure di stima dell'incertezza.

5.4.5 Validazione

- Quando è necessario impiegare metodi di prova o procedure non normalizzate, esse devono essere **completamente documentate**. (*UNI CEI EN 45001, §5.4.1*)
- I Metodi di prova interni devono riportare i riferimenti bibliografici dei documenti utilizzati per la loro elaborazione. I risultati di eventuali prove comparative eseguite con metodi analoghi nell'ambito del Laboratorio, o di circuiti interlaboratorio, nonché **tutta la documentazione ritenuta utile per dimostrare la validità** del metodo deve essere disponibile e regolarmente archiviata. Il Laboratorio deve determinare la ripetibilità dei Metodi di prova interni, conservandone adeguata documentazione. (*SINAL DG-0007 rev.2, § 10.6.*).

5.4.5. Validazione

- Conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi ad una specifica utilizzazione o applicazione prevista sono stati soddisfatti. (UNI EN ISO 9000:2000).
 - uso di materiali di riferimento certificati
 - confronto con altri metodi
 - confronti interlaboratorio
 - verifica dei contributi all'incertezza di misura, etc.
- È richiesto il **riesame periodico** della validazione dei metodi.
- Il Responsabile deve firmare la **dichiarazione circa l'idoneità del metodo** per lo scopo previsto.

5.4.5 Validazione

Il laboratorio deve validare i metodi non normati, i metodi sviluppati/progettati dal laboratorio, i metodi normati utilizzati al di fuori del proprio campo di applicazione prefissato, come pure estensioni e modifiche di metodi normati per confermare che i metodi siano adatti all'impiego previsto. La validazione deve essere estesa in modo da soddisfare le esigenze di una data applicazione o di un campo di applicazione.

Il laboratorio deve registrare i risultati ottenuti, le procedure utilizzate per la validazione, così pure una dichiarazione circa l'idoneità del metodo per l'utilizzo previsto. (*ISO/IEC 17025, §5.4.5*)

Validazione

Dovranno essere definiti:

- i criteri di accettabilità della validazione (es. compatibilità dei risultati ottenuti con quelli riportati nel certificato di un materiale di riferimento, o con i criteri di accettabilità dell'organizzatore di un circuito interlaboratorio, o con i risultati di un metodo di riferimento).
- I parametri del metodo da determinare, e su quanti livelli.
- Alcuni criteri sono suggeriti o richiesti dalla normativa elencata nelle prossime pagine.

- ✓ Federal Register: March 1, 1995, page 11259-11262. (<http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/index.html>). Contiene termini e definizioni relativi alla validazione (US FDA)
- ✓ Federal Register: March 7, 1996, page 9315-9319. International Conference on Harmonisation; Draft Guidelines on the Validation of Analytical Procedures.
- ✓ ISO 78-2 (1999) Chemistry – Layout for standards – Part 2: Methods of chemical analysis.
- ✓ EURACHEM The fitness for Purpose of Analytical Methods, 1998 .
- ✓ NF V03-110:1998. Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.
- ✓ NORDVAL Protocol for the validation of alternative microbiological methods
- ✓ NATA, Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods.
- ✓ Documenti guida e corsi LGC e VAM.
- ✓ Linee Guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura - ARPA Emilia Romagna.
- ✓ UNI EN ISO 16140:2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Protocollo per la validazione di metodi alternativi.

GLP - grado di validazione

Type of analytical procedure; characteristics	Identification	Impurities Quantitation	Impurities Limit	Assay; dissolution, content/potency
Accuracy	–	+	–	+
Precision				
Repeatability	–	+	–	+
Intermediate Precision	–	+	–	+
Specificity	+	+	+	+
Detection Limit	–	–	+	–
Quantitation Limit	–	+	–	–
Linearity	–	+	–	+
Range	–	+	–	+

Manca la robustezza, che deve comunque essere tenuta in considerazione

Robustezza

- La robustezza di una procedura analitica è la sua capacità di non essere influenzata da piccole, ma deliberate, variazioni nei parametri del metodo, e fornisce una indicazione della sua affidabilità durante l'impiego normale.
- *La valutazione della robustezza dovrebbe essere considerata in fase di sviluppo e dipende dal tipo di metodo in studio. Dovrebbe dimostrare l'affidabilità dei risultati rispetto a deliberate variazioni dei parametri del metodo. Se i risultati sono suscettibili a variazioni delle condizioni analitiche, queste dovranno essere controllate in modo idoneo, oppure deve essere inclusa una dichiarazione precauzionale nella procedura.*
- Utilizzo del DOE

COM(2003) 52 definitivo - proposta di regolamento 5-02-2003

- a) esattezza;
- b) applicabilità (matrice e gamma di concentrazione);
- c) limite di rilevazione;
- d) limite di determinazione;
- e) precisione; ripetibilità intralaboratorio (nell'ambito di un laboratorio),
riproducibilità intralaboratorio (in un laboratorio e tra laboratori)
risultante da dati provenienti da prove condotte in collaborazione e,
laddove siano stati stabiliti criteri di **rendimento** per i metodi
analitici, prove di **conformità** ai criteri piuttosto che considerazioni
sull'incertezza delle misurazioni;
- f) recupero;
- g) selettività;
- h) sensibilità;
- i) linearità;
- j) altri criteri a scelta.

Nel caso in cui i metodi di analisi possono essere convalidati soltanto nell'ambito di un singolo laboratorio, essi devono essere convalidati conformemente alle Harmonised Guidelines dell'IUPAC ovvero, se siano stati fissati criteri di rendimento per i metodi analitici, sulla base di prove di conformità a criteri.

I metodi di analisi adottati ai sensi del presente regolamento vanno enunciati secondo la presentazione standard raccomandata dall'Organizzazione internazionale di normalizzazione (sarebbe la ISO 78-2).

93/256/CEE: Decisione della Commissione, del 14 aprile 1993, che stabilisce i metodi da impiegare per la ricerca di residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica.

- Bianco del campione, bianco dei reattivi
- Specificità
- Accuratezza
- Ripetibilità, riproducibilità.
- Limite di rivelazione, limite di determinazione
- Sensibilità (pendenza della retta di taratura)
- **Praticabilità (velocità, costi), applicabilità**
- Interpretazione dei risultati
- Sensibilità alle interferenze
- Tecniche di conferma (co-cromatografia, GC-MS, ecc.)

ABROGATA

Decisione della Commissione 12
agosto 2002 (2002/657) che attua la
direttiva 96/23/CE del Consiglio
relativa al rendimento dei metodi
analitici e all'interpretazione dei
risultati.

G.U. CEE L221 pag. 8
leggere il testo in inglese

Gli Stati membri garantiscono che i campioni ufficiali prelevati a norma della direttiva 96/23/CE siano analizzati con l'impiego di metodi che:

- a) sono documentati nelle istruzioni dell'analisi, preferibilmente in ottemperanza alla ISO 78-2;
- b) rispettano la parte 2 dell'allegato alla presente decisione;
- c) sono stati convalidati in ossequio alla procedure descritte nella parte 3 dell'allegato;
- d) rispettano i pertinenti limiti minimi di rendimento richiesti (LMRR) da stabilire in ossequio all'articolo 4.

- **Recupero**
 - Il recupero deve essere determinato per ciascun lotto di campioni.
- **Specificità**
 - Un metodo deve distinguere tra l'analita e le altre sostanze presenti, e deve essere fornita una stima di come sia possibile attuarlo, investigando omologhi, analoghi, metaboliti. E' importante investigare le eventuali interferenze che possono derivare dalla matrice.

Metodi di conferma

I metodi di conferma per i residui o i contaminanti organici forniscono informazioni sulla struttura chimica dell'analita. Di conseguenza, i metodi basati esclusivamente sull'analisi cromatografica senza l'uso della rilevazione spettrometrica non sono adeguati all'impiego come metodi di conferma senza il ricorso ad altri metodi. Tuttavia, se una singola tecnica non dispone di sufficiente specificità, la specificità desiderata deve essere ottenuta per mezzo di procedure analitiche consistenti in combinazioni adeguate di raffinazione, separazione cromatografica e rilevazione spettrometrica.

Minima accuratezza espressa come recupero

Le massime deviazioni ammesse nell'analisi di materiali di riferimento, dopo correzione per il recupero medio, sono le seguenti:

< 1 $\mu\text{g/kg}$	- 50% fino a + 20%
1 $\mu\text{g/kg}$ a 10 $\mu\text{g/kg}$	- 30% fino a + 10%
> 10 $\mu\text{g/kg}$	- 20% fino a + 10%

E' ammesso, in mancanza di materiali di riferimento certificati, la determinazione del recupero da matrici fortificate.

EURACHEM: estensione della validazione

Il livello di validazione o rivalidazione necessario dipende dalla natura delle modifiche necessarie per applicare un metodo a differenti laboratori, apparecchi, operatori...

E' sempre opportuno qualche grado di validazione, persino quando si utilizzano metodi normati o pubblicati *apparentemente* ben caratterizzati.

[ISO/IEC 17205 §4.4 b) il laboratorio abbia la capacità e le risorse per soddisfare i requisiti]

Limiti richiesti

concentrazione

- 1 $\mu\text{g/kg}$
- 10 $\mu\text{g/kg}$
- 100 $\mu\text{g/kg}$
- 1 mg/kg

scarto tipo

- 45 %
- 32 %
- 23 %
- 16 %

concentrazione

- >0,5 mg/kg
- 1-500 $\mu\text{g/kg}$
- < 1 $\mu\text{g/kg}$

recupero

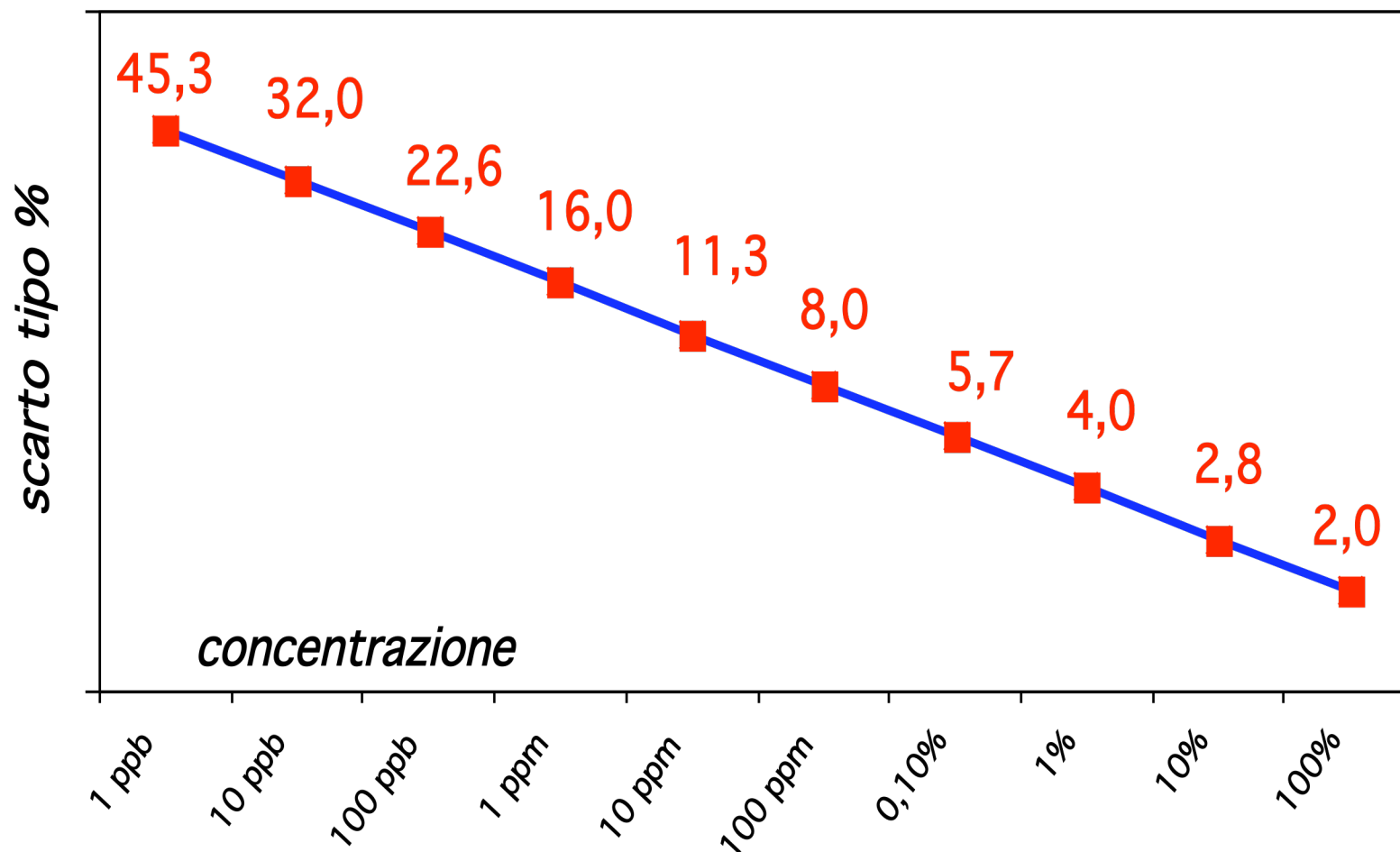
- 80-110 %
- 60-115 %
- 50 %

La legge di Horwitz

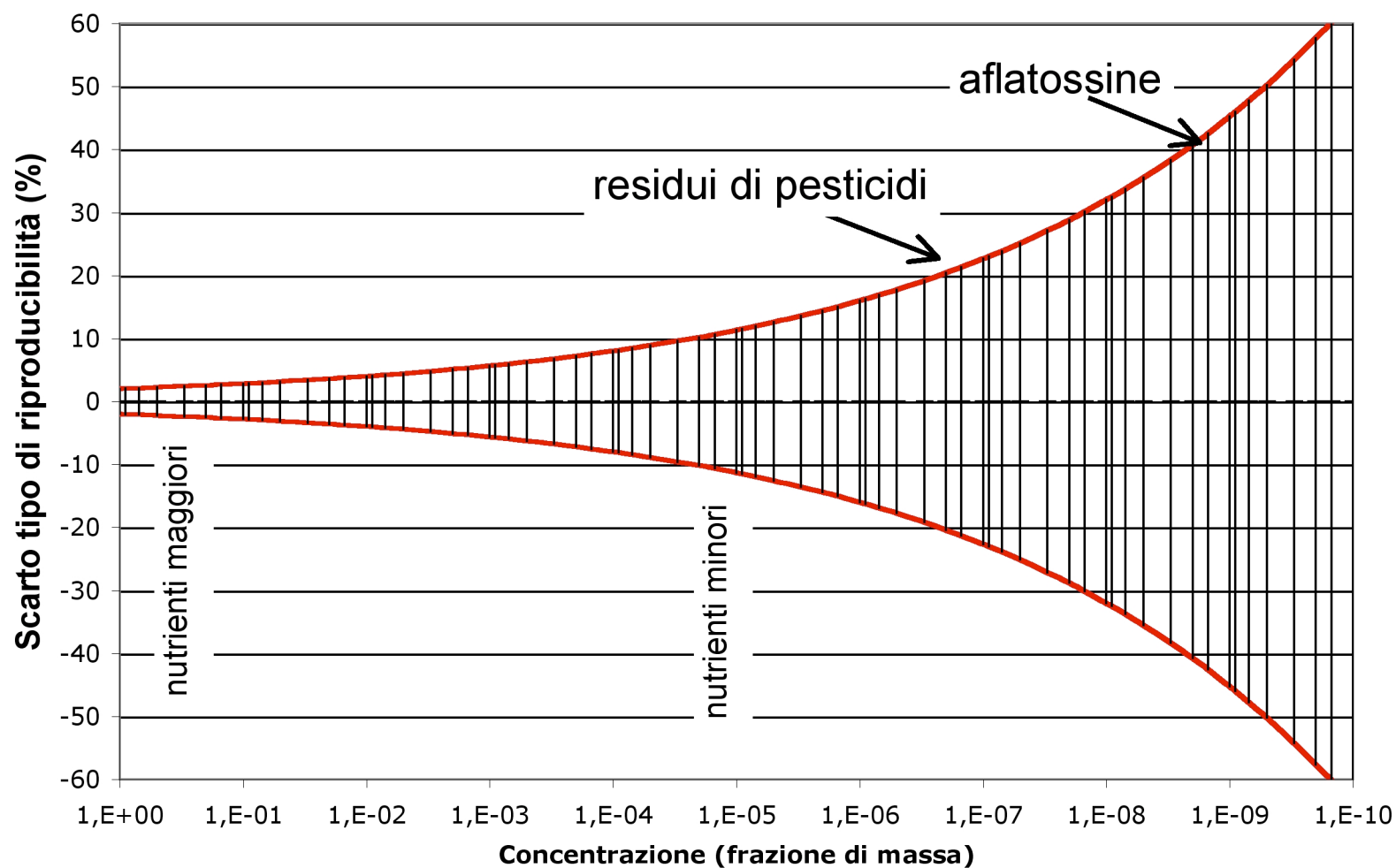
$$RSD_R = 2^{(1-0,5*\log C)}$$

- RSD_R = scarto tipo relativo di riproducibilità
- C = concentrazione come frazione di massa
- Direttiva 98/53/CE (D.M. 23 dicembre 2000, contiene anche criteri per i recuperi).

Legge di Horwitz



Equazione di Horwitz



Direttiva 2001/22/CE: Pb, Cd, Hg e 3-MCPD (monocloro propandiolo) negli alimenti

Non è prescritto alcun metodo. I laboratori devono usare un metodo **validato** che rispetti i criteri indicati:

- Limite di rilevazione non superiore ad un decimo del valore fissato dal regolamento 466/2001.
- Limite di quantificazione non superiore ad un quinto del valore fissato dal regolamento 466/2001.
- Precisione: $HORRAT_r$ e $HORRAT_R < 1,5$
- Recupero: 80 - 120 %
- Specificità: senza interferenze di matrice o spettrali.
- $HORRAT_R = RSD_R$ sperimentale diviso RSD_R dall'equazione di Horwitz
- $HORRAT_r = RSD_r$ sperimentale diviso RSD_r dall'equazione di Horwitz assumendo $r=0,66 R$

Direttiva 2005/4/CE che modifica la Direttiva 2001/22/CE

Per valutare l'adeguatezza del metodo è tuttavia possibile ricorrere ad un'impostazione basata sull'incertezza.

L'incertezza tipo massima può essere calcolata dalla seguente formula:

$$U_f = \sqrt{(LOD)^2 + (\alpha C)^2}$$

U_f è la massima incertezza tipo

LOD è il limite di rivelazione

C è la concentrazione di interesse

α dipende dal valore di C :

C ($\mu\text{g/kg}$)	α
≤ 50	0,2
51 - 500	0,18
501 - 1000	0,15
1001 - 10000	0,12
≥ 10000	0,1

Direttiva 2005/4/CE che modifica la Direttiva 2001/22/CE

Se un metodo di analisi fornisce risultati di incertezza inferiori all'incertezza tipo massima esso sarà valido quanto un altro metodo che soddisfi le caratteristiche precedentemente riportate.

Se possibile, l'accuratezza dell'analisi è stimata includendo nella stessa adeguati materiali di riferimento certificati.

Il risultato analitico viene registrato in forma corretta o meno per il recupero. Devono essere indicati il modo di registrazione e il livello di recupero.

L'analista deve tener conto della "Relazione della Commissione europea sul rapporto tra i risultati d'analisi, la misurazione dell'incertezza, i fattori di recupero e le disposizioni della legislazione UE sui prodotti alimentari", 2004 (1).

Il risultato dell'analisi viene registrato secondo la formula $x \pm U$, in cui x è il risultato dell'analisi e U è l'incertezza estesa di misurazione.

(1)http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/sampling_en.htm)

QUALITY CONTROL PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS Document N° SANCO/10476/2003 5/February/2004

Vengono riportati i criteri relativi a:

- Campionamento, trasporto, trattamento and conservazione dei campioni
- Materiali di riferimento, soluzioni di taratura, etc.
- Estrazione e concentrazione
- Contaminazioni e interferenze
- Taratura analitica, analiti rappresentativi, effetti matrice e integrazione cromatografica
- Metodi Analitici e loro prestazioni
- Proficiency testing e analisi di materiali di riferimento
- Conferma dei risultati
- Rapporti di prova

CEN/TS 15675:2007 - Emissioni da sorgente stazionaria

Se è necessario modificare un metodo od usarne uno diverso da quello indicato, deve essere validato:

- Definizione del metodo, indicando range e tipo di matrice
- Determinazione dell'incertezza complessiva, con verifica della sua adeguatezza, e della selettività, limite di rivelazione, ecc.
- Verifica della ripetibilità e dell'assenza di errori sistematici.

CEN/TS 14793 riporta un esempio di validazione

Validazione dei metodi di taratura

- Quando **si**: metodi sviluppati dal laboratorio.
- Quando **no**: metodi forniti dal costruttore, da un centro di taratura, da guide o pubblicazioni.
- E' sempre **necessaria** la stima dell'**incertezza** di misura