



RAPPORTI ISTISAN 16|39

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Guida Eurachem

Idoneità per lo scopo dei metodi analitici

Guida per i laboratori sulla validazione
dei metodi e argomenti correlati

Seconda edizione 2014

Traduzione italiana a cura di
E. Gregori, M. Patriarca e M. Sega



FORMAZIONE
E INFORMAZIONE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Guida Eurachem
Idoneità per lo scopo dei metodi analitici
Guida per i laboratori sulla validazione
dei metodi e argomenti correlati
Seconda edizione 2014

Traduzione italiana a cura di
Emanuela Gregori (a), Marina Patriarca (a) e Michela Segà (b)

*(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*
*(b) Divisione Metrologia per la Qualità della Vita,
Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica, Torino*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
16/39

Istituto Superiore di Sanità

Guida Eurachem. Idoneità per lo scopo dei metodi analitici. Guida per i laboratori sulla validazione dei metodi e argomenti correlati. Seconda edizione 2014.

Traduzione italiana a cura di Emanuela Gregori, Marina Patriarca e Michela Sega
2016, v. 65 p. Rapporti ISTISAN 16/39

Questa guida Eurachem è stata concepita allo scopo di assistere i laboratori nel processo della validazione dei metodi di prova, attraverso spiegazioni dei concetti teorici, indicazioni pratiche e riquadri di riferimento per la consultazione rapida. Essa può essere utile non solo a quanti si occupano direttamente di misurazioni analitiche in chimica, biologia e medicina di laboratorio, ma anche per facilitare la comunicazione tra tutti coloro che sono interessati alle misurazioni di tipo analitico (clienti, operatori di laboratorio a qualsiasi livello, enti di accreditamento e di controllo) e come strumento per la formazione, sia accademica sia continua.

Parole chiave: Assicurazione della qualità; Precisione; Giustezza; Accuratezza; Limite di rivelazione; Chimica; Biologia

Istituto Superiore di Sanità

Eurachem Guide. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. Second edition 2014.

Italian translation edited by Emanuela Gregori, Marina Patriarca and Michela Sega
2016, v. 65 p. Rapporti ISTISAN 16/39 (in Italian)

This Eurachem guide was developed to assist laboratories in the process of validation of test methods, through explanations of theoretical concepts, practical guidance and quick reference boxes. This document can be useful not only to those directly concerned with analytical measurements in chemistry, biology and laboratory medicine, but also to facilitate communication between all parties interested in analytical measurements (customers, laboratory staff at any level, accreditation and regulatory bodies) and as a tool for education and training in both academic and professional environments.

Key words: Quality assurance; Precision; Trueness; Accuracy; Detection limit; Chemistry; Biology

La traduzione italiana è stata realizzata nell'ambito di una collaborazione tra l'Istituto Superiore di Sanità e l'Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica.

Si ringrazia il Dott. Federico Pecoraro dell'Ente Italiano di Accreditamento (ACCREDIA) per i suoi commenti. Si ringrazia inoltre la sig.ra Valeria Patriarca per il supporto editoriale e grafico fornito nella preparazione del manoscritto.

Per informazioni su questo documento scrivere a: marina.patriarca@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Documento originale

Magnusson B, Örnemark U (Ed.). *Eurachem Guide. The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. 2nd ed.* Eurachem; 2014. Disponibile da: www.eurachem.org.

Per la versione inglese: © 2014 Eurachem project group

Per la versione italiana: © 2016 Istituto Superiore di Sanità

Citare questo documento come segue:

Gregori E, Patriarca M, Sega M (Ed.). *Guida Eurachem. Idoneità per lo scopo dei metodi analitici. Guida per i laboratori sulla validazione dei metodi e argomenti correlati. Seconda edizione 2014.* Traduzione italiana. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/39).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Il Gruppo di lavoro Eurachem è composto da:

Vicki Barwick	<i>LGC, UK</i>
Pedro P. Morillas Bravo	<i>Canal de Isabel II Gestión, ES</i>
Stephen L. R. Ellison	<i>LGC, UK</i>
Joakim Engman	<i>National Food Agency, SE</i>
Elin L. F. Gjengedal	<i>Norwegian University of Life Sciences, NO</i>
Ulla Oxenbøll Lund	<i>Eurofins Miljø A/S, DK</i>
Bertil Magnusson (editor)	<i>SP Technical Research Institute of Sweden, SE</i>
Hans-Thomas Müller	<i>Mersin, TR</i>
Marina Patriarca	<i>Istituto Superiore di Sanità, IT</i>
Barbara Pohl	<i>Merck KgaA, DE</i>
Piotr Robouch	<i>European Commission, EU</i>
Lorens P. Sibbesen (chairman)	<i>Labquality International, DK</i>
Elvar Theodorsson	<i>University Hospital in Linköping, SE</i>
Florent Vanstapel	<i>University Hospital Leuven, Leuven, BE</i>
Isabelle Verduyck	<i>BELAB, BE</i>
Aysun Yilmaz	<i>Cevre Food and Industrial Analysis Laboratory, TR</i>
Perihan Yolci Ömeroglu	<i>Okan University, TR</i>
Ulf Örnemark (editor)	<i>Emendo Dokumentgranskning, SE</i>

Ringraziamenti del documento originale

Questo documento è stato prodotto dai membri del gruppo di lavoro Eurachem *Method Validation* e altri coinvolti per questo specifico scopo.

Il Gruppo di lavoro per la versione italiana:

Curatrici:

Emanuela Gregori	<i>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Marina Patriarca	<i>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Michela Segà	<i>Divisione Metrologia per la Qualità della Vita, Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica, Torino</i>

Traduzione:

Prefazione alla seconda edizione Prefazione alla prima edizione Abbreviazioni e simboli	Valeria Patriarca ^(a)
Cap.1 - Introduzione Cap.2 - Che cos'è la validazione del metodo?	Enrica Ferretti ^(b)
Cap.3 - Perché è necessario validare i metodi? Cap.4 - Quando devono essere validati o verificati i metodi?	Pasquale Gallo ^(c)
Cap.5 - Come si valida un metodo?	Valentina Fuscoletti ^(d) , Paola Pettine ^(d)
Cap.6 - Caratteristiche della prestazione di un metodo 6.1. Selettività 6.2. Limite di rivelabilità e limite di quantificazione	Francesca Rolle ^(e)
6.3. Intervallo di misura 6.4. Sensibilità analitica 6.5. Giustezza – parte I	Sergio Guzzi ^(f)
6.5. Giustezza – parte II 6.6. Precisione 6.7. Incertezza di misura 6.8. Robustezza	Antonella Semeraro ^(a)
Cap.7 - Uso dei metodi validati	Pasquale Gallo ^(c)
Cap.8 - Utilizzo di dati di validazione per la progettazione del controllo di qualità Cap.9 - La documentazione per i metodi validati	Veruscka Mannoni ^(d)
Cap.10 - Implicazioni dei dati di validazione nel calcolo e nel report dei risultati Appendice A. Protocollo per la documentazione relativa al metodo	Angela Sorbo ^(a)
Appendice B. Basi statistiche per il calcolo del limite di rivelabilità Appendice C. Analisi della varianza (ANOVA) Appendice D. Note sull'analisi qualitativa	Sabrina Barbizzi ^(g)
Bibliografia	Valeria Patriarca ^(a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Brescia*

(c) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli*

(d) *Dipartimento di Ambiente e connessa prevenzione primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(e) *Divisione Metrologia per la Qualità della Vita, Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica, Torino*

(f) *ACCREDIA, Roma*

(g) *Servizio di metrologia ambientale, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma*

INDICE

Prefazione alla traduzione italiana	v
Prefazione alla seconda edizione	1
Prefazione alla prima edizione	2
Convenzioni editoriali, abbreviazioni e simboli	3
1. Introduzione	6
1.1. Fondamenti e scopo di questa guida	6
1.2. Note sull'uso di questa guida	7
1.2.1. Terminologia	7
1.2.2. Riferimenti rapidi	7
2. Che cos'è la validazione del metodo?	8
2.1. Definizioni	8
2.2. Qual è la differenza tra validazione e verifica?	8
3. Perché è necessario validare i metodi?	10
3.1. L'importanza delle misurazioni analitiche	10
3.2. Il dovere professionale del chimico analitico	10
3.3. Lo sviluppo del metodo	11
4. Quando devono essere validati o verificati i metodi?	12
4.1. Validazione del metodo	12
4.2. Verifica del metodo	12
5. Come si valida un metodo?	13
5.1. Chi esegue la validazione di un metodo?	13
5.1.1. Approcci per la validazione dei metodi	13
5.1.2. Approccio del confronto inter-laboratorio	13
5.1.3. Approccio dello studio di laboratorio singolo	13
5.2. Completezza degli studi di validazione	13
5.3. Piano di validazione e documentazione	14
5.4. Strumenti della validazione	15
5.4.1. Bianchi	15
5.4.2. Campioni di prova di routine	15
5.4.3. Materiali/soluzioni fortificate	15
5.4.4. Materiali "naturalmente contaminati"	16
5.4.5. Materiali di riferimento	16
5.4.6. Tecniche statistiche	16
5.5. Requisiti della validazione	17
5.6. Il processo di validazione del metodo	17
6. Caratteristiche di prestazione di un metodo	20
6.1. Selettività	20
6.1.1. Termini e definizioni	20
6.1.2. Effetti delle interferenze	20
6.1.3. Valutazione della selettività	20
6.2. Limite di rivelabilità e limite di quantificazione	21
6.2.1. Termini e definizioni	21
6.2.2. Determinazione dello scarto tipo a bassi livelli	22

6.2.3. Valutare il LOD.....	24
6.2.4. Valutare il LOQ.....	25
6.2.5. Procedure alternative.....	26
6.2.6. Capacità di rivelazione per l'analisi qualitativa.....	27
6.3. Intervallo di misura.....	28
6.3.1. Definizione.....	28
6.3.2. Elementi da considerare nello studio per la validazione.....	28
6.3.3. Intervallo di misura strumentale e del metodo.....	28
6.3.4. Valutazione dell'intervallo di misura strumentale.....	28
6.3.5. Valutazione dell'intervallo di misura del metodo.....	29
6.4. Sensibilità analitica.....	31
6.4.1. Definizione.....	31
6.4.2. Applicazioni.....	31
6.5. Giustezza.....	31
6.5.1. Terminologia per descrivere la qualità della misura.....	31
6.5.2. Determinazione dello scostamento di misura.....	32
6.5.3. Interpretazione dello scostamento delle misure.....	34
6.6. Precisione.....	36
6.6.1. Ripetizione.....	36
6.6.2. Condizioni di precisione.....	36
6.6.3. Limiti di precisione.....	37
6.6.4. Determinazione simultanea della ripetibilità e della ripetibilità intermedia.....	37
6.7. Incertezza di misura.....	38
6.8. Robustezza.....	39
6.8.1. Definizione.....	39
6.8.2. Il 'test di robustezza'.....	39
7. Uso dei metodi validati.....	41
8. Utilizzo di dati di validazione per la progettazione del controllo di qualità.....	43
8.1. Introduzione.....	43
8.2. Controllo di qualità interno.....	43
8.3. Controllo di qualità esterno.....	44
9. La documentazione per i metodi validati.....	46
9.1. Dalla bozza alla versione definitiva.....	46
9.2. Raccomandazioni.....	46
9.2.1. Verifica delle istruzioni.....	46
9.2.2. Raccomandazioni nelle norme.....	46
9.2.3. Controllo dei documenti.....	47
10. Implicazioni dei dati di validazione per il calcolo e l'emissione dei risultati.....	48
Appendice A. Protocollo per la documentazione relativa al metodo.....	49
Appendice B. Basi statistiche per il calcolo del limite di rivelabilità.....	54
Appendice C. Analisi della varianza (ANOVA).....	55
Appendice D. Note sull'analisi qualitativa.....	57
Bibliografia.....	60

Prefazione alla traduzione italiana

I metodi di misura debbono essere idonei per lo scopo previsto affinché i risultati prodotti possano essere utilizzati con fiducia come base per le decisioni. Il processo di dimostrare l'idoneità per lo scopo è detto "validazione". Nel caso dei metodi di prova, esso riguarda il confronto tra i requisiti specificati e le caratteristiche di prestazione osservate per il metodo. La norma ISO/IEC 17025 richiede che i metodi di prova utilizzati dal laboratorio siano stati validati in modo tale da soddisfare le esigenze di un dato campo di applicazione, specificando, tuttavia, che in questo processo si deve tenere conto del bilancio fra costi, rischi e possibilità tecniche. Nonostante il personale che opera nei laboratori analitici sia in genere consapevole dell'importanza della validazione, non sempre è loro chiaro come, quando e quanto estesamente si debba procedere. La prima edizione della Guida Eurachem, pubblicata nel 1998, è stata concepita allo scopo di assistere i laboratori in questo processo, attraverso spiegazioni dei concetti teorici, indicazioni pratiche e riquadri di riferimento per la consultazione rapida, ed ha rappresentato un punto di riferimento per quanti sono coinvolti a qualsiasi titolo nell'assicurazione e nella valutazione della qualità di risultati analitici. La seconda edizione, pur mantenendo fede agli stessi principi, è stata rivista ed ampliata per tener conto dei numerosi progressi negli aspetti teorici, regolatori e pratici che riguardano la validazione dei metodi. Essa può essere utile non solo a quanti si occupano direttamente di misurazioni analitiche in chimica, biologia e medicina di laboratorio, ma anche per facilitare la comunicazione tra tutti coloro che sono interessati alle misurazioni di tipo analitico (clienti, operatori di laboratorio a qualsiasi livello, enti di accreditamento e di controllo) e come strumento per la formazione, sia accademica sia continua.

Nella realizzazione della traduzione in lingua italiana, si è avuta cura di mantenere quanto più possibile l'aderenza al testo originale. Per i termini definiti nell'*International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms* è stata adottata la traduzione ufficiale italiana, pubblicata nella norma UNI CEI 70099. Così il termine *intermediate precision* è stato reso come "ripetibilità intermedia" e il termine *trueness* come "giustezza", anziché con altri termini di uso comune quali precisione intermedia ed esattezza. I riferimenti bibliografici a documenti normativi sono stati integrati ove possibile con l'indicazione delle loro versioni ufficiali in lingua italiana. Nel caso in cui siano intervenuti aggiornamenti di documenti normativi tra la pubblicazione della Guida e questa traduzione (ad esempio per la serie delle norme ISO 9000), il riferimento bibliografico è quello indicato nella versione inglese della Guida. Tuttavia è stato verificato che le parti citate non sono state modificate nella revisione.

Questo lavoro è stato realizzato di concerto da un gruppo di lavoro che ha coinvolto competenze ed esperienze diverse, oltre a passione, dedizione e spirito di collaborazione. Esso ha rappresentato per noi un momento di condivisione e di crescita culturale e ci auguriamo che esso possa essere altrettanto utile e stimolante per quanti operano in questo settore.

Emanuela Gregori, Marina Patriarca, Michela Segà

Prefazione alla seconda edizione

Dalla pubblicazione della prima edizione di questa Guida nel 1998 ci sono stati importanti sviluppi nell'area della qualità analitica. In primo luogo, sono state revisionate le norme della serie ISO 9000, largamente usate come base per la messa a punto di sistemi di gestione per la qualità. La loro filosofia forma una parte integrante delle norme e linee guida sulla valutazione della conformità, che indicano i requisiti per la competenza di laboratori, fornitori di prove valutative e produttori di materiali di riferimento. Tutti questi documenti ribadiscono l'importanza di utilizzare metodi validati.

In secondo luogo, sono state riviste o sviluppate varie linee guida sulla validazione dei metodi, di carattere generale o di settore. In molti settori, la legislazione dell'Unione Europea stabilisce requisiti obbligatori per le misurazioni analitiche di interesse.

Terzo, la comunità analitica ha investito molti sforzi per implementare il concetto di incertezza. Ad esempio, nella sua Guida *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis* (2002), la IUPAC ha previsto che "... data la sempre maggiore fiducia riposta nell'incertezza di misura come un indicatore chiave sia per l'idoneità per lo scopo sia per l'affidabilità dei risultati, i chimici analitici si impegneranno sempre di più nella validazione delle misurazioni per fornire una stima dell'incertezza...". Negli anni seguenti, gli enti di accreditamento hanno emesso documenti di politiche e di indirizzo volti chiaramente a riconoscere l'uso di dati di validazione del metodo nel processo di stima dell'incertezza di misura.

Inoltre, l'*International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms* (VIM) è stato rivisto in modo sostanziale, prendendo in considerazione le misurazioni di tipo chimico e biologico. Sebbene la terminologia relativa alla validazione del metodo sia ancora lontana dall'essere armonizzata, la situazione è comunque migliorata. Il VIM è anche un documento normativo per i laboratori accreditati rispetto, ad esempio, alle norme ISO/IEC 17025 e ISO 15189.

La seconda edizione di questa Guida si prefigge di riflettere i cambiamenti nei documenti internazionali di indirizzo (norme e linee guida) e di mettere meno enfasi sui termini e le definizioni. [A questo scopo], la Guida fa riferimento al VIM e ad altre fonti facilmente disponibili. Di conseguenza, la lista dei termini e delle definizioni è stata eliminata dalla sezione delle Appendici. I riferimenti citati in questa edizione della Guida sono elencati nella Bibliografia alla fine del documento. Altre fonti e riferimenti relativi allo sviluppo dei metodi e alla loro validazione sono disponibili nella *Reading list* presente nella sezione *Publications* del menu nel sito web di Eurachem alla pagina: www.eurachem.org. L'Appendice A è stata rivista come conseguenza delle modifiche apportate alla ISO 78-2. Questa edizione è stata inoltre ampliata con le informazioni sulle basi statistiche per il calcolo del limite di rivelabilità (Appendice B), l'analisi della varianza (Appendice C) e l'analisi qualitativa (Appendice D).

L'uso di sistemi di misura già disponibili in commercio sta diventando sempre più diffuso nei laboratori che effettuano analisi di routine, soprattutto nel settore clinico. Questo comporta che la responsabilità della validazione ricada principalmente sul produttore. Il compito del laboratorio sarà focalizzato sulla verifica dei dati di prestazione pubblicati dal produttore e sulla dimostrazione che il metodo funziona correttamente nel luogo dove viene espletata l'attività.

Comunque, rivedendo la prefazione alla prima edizione, si può concludere che i sei principi di base li enunciati conservano la loro rilevanza e sono coerenti con i requisiti indicati in norme internazionali come la ISO/IEC 17025.

Prefazione alla prima edizione¹

Nel corso di una iniziativa svoltasi in UK allo scopo di promuovere la buona pratica nelle misurazioni analitiche, sono stati identificati sei principi di pratica analitica che, adottati insieme, costituiscono la migliore condotta. I sei principi, descritti in modo più dettagliato in un'altra Guida², sono:

1. “Le misurazioni analitiche dovrebbero essere condotte in modo da soddisfare un requisito concordato” (cioè un obiettivo specificato).
2. “Le misurazioni analitiche dovrebbero essere eseguite utilizzando metodi e strumenti che sono stati testati per verificare la loro idoneità per lo scopo.”
3. “Il personale incaricato di eseguire le misurazioni analitiche dovrebbe essere qualificato e competente per lo specifico compito assegnato.” (e dimostrare di essere in grado di eseguire l'analisi in modo appropriato).
4. “Ci dovrebbe essere una valutazione indipendente delle prestazioni tecniche del laboratorio, ad intervalli regolari.”
5. “Le misurazioni analitiche eseguite in un laboratorio dovrebbero essere coerenti con quelle prodotte in altri luoghi.”
6. “Le organizzazioni che eseguono misurazioni analitiche dovrebbero avere procedure ben definite di assicurazione e controllo della qualità.”

Questi principi sono ugualmente rilevanti per tutti i laboratori, sia che lavorino soltanto per la propria organizzazione, sia che producano risultati che devono essere confrontati con quelli di altri laboratori.

Questo documento intende principalmente assistere i laboratori nell'attuazione del principio 2, fornendo loro indicazioni su come valutare i metodi di prova per dimostrare che sono idonei per lo scopo.

¹ La prima edizione (1998) di questa Guida è stata prodotta da un Gruppo di lavoro Eurachem sulla base di un documento redatto in forma preliminare da LGC (UK). Il Gruppo di lavoro Eurachem era così composto: D. Holcombe, P. De Bièvre, D. Böttger, C. Eastwood, J. Hlavay, M. Holmgren, W. Horwitz, M. Lauwaars, B. Lundgren, L. Massart, J. Miller, J. Morkowski, B. te Nijenhuis, B. Nyeland, R. Philipp, P. Radvila, J. Smeyers-Verbeke, R. Stephany, M. Suchanek, C. Vandervorst, H. Verplaetse, H. Wallien, M. Walsh, W. Wegscheider, D. Westwood, H. J. van de Wiel.

² The manager's guide to VAM, UK Department of Trade and Industry, Valid Analytical Measurement Programme. Pubblicato come: Sargent M. The VAM Principles. *Anal Proc* 1995;32:201-2.

Convenzioni editoriali, abbreviazioni e simboli^a

Nella realizzazione di questa traduzione, si è avuta cura di mantenere quanto più possibile l'aderenza al testo originale. Quando si sono rese necessarie delle integrazioni, al fine di renderle facilmente identificabili, esse sono state inserite nel testo tra parentesi quadre come note del traduttore (NdT) o come note a piè di pagina, indicate con lettere alfabetiche per distinguerle dalle note originali indicate con numeri arabi.

Nel testo italiano sono state utilizzate le seguenti convenzioni editoriali: gli apici singoli (‘ ’) sono utilizzati per le enfasi mentre i doppi apici (“ ”) per le citazioni. Queste ultime sono sempre accompagnate dal riferimento alla fonte. Il segno decimale è la virgola.

In questa Guida si utilizzano le seguenti abbreviazioni, acronimi e simboli.

AMC	<i>Analytical Methods Committee</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> Analisi della varianza
AOAC International	[Association of Official Analytical Chemists] organizzazione internazionalmente riconosciuta per lo sviluppo di metodi analitici standardizzati
AQ	si veda la voce QA
ASTM International	[American Society for Testing and Materials] organizzazione internazionalmente riconosciuta per lo sviluppo di metodi analitici standardizzati
BIPM	[Bureau International des Poids et Mesures] <i>International Bureau of Weights and Measures</i> Ufficio internazionale dei pesi e delle misure
CCQM	[Comité consultatif pour la quantité de matière: métrologie en chimie et biologie] <i>Consultative Committee for Amount of Substance – Metrology in Chemistry and Biology</i> Comitato consultivo per la quantità di sostanza – metrologia in chimica e in biologia
CEN	[Comité Européen de Normalisation] <i>European Committee for Standardization</i> Comitato europeo di normazione
CITAC	<i>Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry</i> Cooperazione sulla riferibilità internazionale in chimica analitica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CQ	si veda la voce QC
CRM	<i>Certified Reference Material</i> Materiale di Riferimento Certificato (MRC)
EA	<i>European co-operation for Accreditation</i> Cooperazione europea per l'accreditamento
EC	<i>European Commission</i> Commissione Europea
EPA/USEPA	[United States] <i>Environmental Protection Agency</i>
EQA	<i>External Quality Assessment</i> Valutazione Esterna di Qualità (VEQ)
EU	<i>European Union</i> Unione Europea (UE)
GUM	<i>Guide to the expression of Uncertainty in Measurement</i> (si veda la voce bibliografica n. 21)

^a NdT: Nell'elenco sono state incluse le sigle italiane per le abbreviazioni AQ, CQ, CRM, EU, EQA.

ICH	<i>International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use</i>
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i> Commissione internazionale elettrotecnica
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> Organizzazione internazionale di normazione
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> Unione internazionale di chimica pura e applicata
JCGM	<i>Joint Committee for Guides in Metrology</i> Commissione congiunta per le guide in metrologia
LOD	<i>Limit Of Detection</i> Limite di rivelabilità
LOQ	<i>Limit Of Quantification</i> Limite di quantificazione
MRC	si veda la voce CRM
NATA	<i>National Association of Testing Authorities [Australia]</i>
QA	<i>Quality Assurance</i> assicurazione di qualità
QC	<i>Quality Control</i> controllo di qualità
RSC	<i>Royal Society of Chemistry</i>
SANCO	[SANté et protection des CONsommateurs] <i>European Commission's Directorate-General for Health and Consumers</i> Direzione Generale per la salute e la tutela dei consumatori presso la Commissione dell'Unione Europea
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i> procedura operativa standard
PT	<i>Proficiency Testing</i> prova valutativa
RM	<i>Reference Material</i> materiale di riferimento
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> scarto tipo relativo
UE	si veda la voce EU
UV/VIS	<i>UltraViolet/VISible</i> ultravioletto/visibile
VEQ	si veda la voce EQA
VIM	[Vocabulaire International de Métrologie] <i>International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms</i> Vocabolario Internazionale di Metrologia - Concetti fondamentali e generali e termini correlati
<i>b</i>	<i>absolute bias</i> scostamento assoluto
<i>b (%)</i>	<i>relative bias in %</i> scostamento relativo percentuale
<i>k_Q</i>	<i>multiplier used in calculating limit of quantification</i> fattore moltiplicativo utilizzato per il calcolo del limite di quantificazione
<i>m</i>	<i>number of measurements</i> numero delle misurazioni

n	<i>number of replicate observations averaged when reporting results</i> numero di osservazioni ripetute utilizzate per il calcolo della media quando si riportano i risultati
n_b	<i>number of blank observations averaged when calculating the blank correction</i> numero di osservazioni del bianco utilizzate per il calcolo del bianco medio per la correzione
r	<i>repeatability limit</i> limite di ripetibilità
R	<i>reproducibility limit</i> limite di riproducibilità
$R(\%)$	<i>relative recovery (apparent recovery) in per cent</i> recupero relativo (recupero apparente) percentuale
$R'(\%)$	<i>relative spike recovery in per cent</i> recupero relativo dell'aggiunta percentuale
s	<i>standard deviation</i> scarto tipo
s_0	<i>estimated standard deviation of single results at or near zero concentration</i> stima dello scarto tipo di singoli risultati uguali o vicini alla concentrazione zero
s'_0	<i>standard deviation used for calculating an LOD or LOQ</i> scarto tipo utilizzato per il calcolo del LOD o del LOQ
s_I	<i>intermediate precision standard deviation</i> scarto tipo di ripetibilità intermedia
s_r	<i>repeatability standard deviation</i> scarto tipo di ripetibilità
s_R	<i>reproducibility standard deviation</i> scarto tipo di riproducibilità
u	<i>standard uncertainty</i> incertezza tipo
\bar{x}	<i>mean value (arithmetic average)</i> valore medio (media aritmetica)
x_{ref}	<i>reference value</i> valore di riferimento
\bar{x}_{ref}	<i>mean value of measurements with an alternative method, e.g. a reference method</i> valore medio delle misurazioni eseguite con un metodo alternativo, ad esempio un metodo di riferimento
\bar{x}'	<i>mean value of spiked sample in a recovery experiment</i> valore medio ottenuto per il campione addizionato in un esperimento di recupero
x_{spike}	<i>added concentration in a recovery experiment</i> concentrazione addizionata in un esperimento di recupero

1. Introduzione

1.1. Fondamenti e scopo di questa Guida

La validazione dei metodi è un requisito importante nelle attività di chimica analitica. La maggior parte dei chimici analitici è consapevole della sua importanza, ma non sempre è loro chiaro perché e quando la validazione debba essere fatta e cosa debba essere fatto esattamente. Alcuni analisti consideravano la validazione come qualcosa che poteva essere eseguito solamente in collaborazione con altri laboratori e quindi si astenevano dal farla. I requisiti delle norme, quali ISO/IEC 17025 (1), ISO 15189 (2) e ISO 15193 (3), sono stati d'aiuto nel fornire chiarimenti in merito. Ad esempio, la necessità di dimostrare che i metodi sono idonei allo scopo è sottolineata al punto 5.4.2 della ISO/IEC 17025:

“Il laboratorio deve utilizzare metodi di prova e/o di taratura, compresi i metodi di campionamento, che soddisfino le esigenze del cliente e che siano appropriati per le prove e/o le tarature da eseguire...” e inoltre: *“Quando il cliente non specifica il metodo da utilizzare, il laboratorio deve selezionare i metodi appropriati”*.

Lo scopo di questa Guida è affrontare le varie problematiche relative alla validazione dei metodi, per far sì che i lettori comprendano meglio di cosa si tratta e perché è importante, e inoltre dare un'idea di come la validazione possa essere effettuata.

Questa Guida è rivolta principalmente a 1) responsabili dei laboratori che devono garantire che i metodi sotto la loro supervisione siano adeguatamente validati e 2) analisti che sono responsabili di pianificare e condurre studi per la validazione dei metodi. Essa può essere utile anche ad altri soggetti come fonte di informazioni di base – al personale più esperto da un punto di vista gestionale e a quello meno esperto da un punto di vista tecnico o formativo.

La Guida si focalizza sulla validazione dei metodi eseguita in un singolo laboratorio. Essa si propone di indirizzare il lettore verso protocolli consolidati quando ne esistano e, laddove non ce ne siano, intende fornire una introduzione semplice ai processi coinvolti nella validazione e alcune idee di base per mettere il lettore in grado di progettare le proprie strategie di validazione. Inoltre sono stati inclusi

riferimenti ad ulteriori documenti riguardanti particolari aspetti tecnici della validazione.

Questa Guida tratta la validazione dei metodi quantitativi. Tuttavia, alcuni dei principi descritti, quali ad esempio i concetti di selettività e di limite di rivelabilità (*Limit Of Detection*, LOD), si applicano anche ai metodi qualitativi per determinare la presenza di uno o più analiti.

La Guida evita l'enfasi sull'utilizzo della statistica sebbene coloro che hanno messo in pratica conoscenze elementari di statistica troveranno senza dubbio più facile capire ed eseguire il processo di validazione del metodo. Sono indicati diversi riferimenti a pubblicazioni sulla statistica di base applicata in chimica analitica (4-6).

La comprensione, da parte dell'analista, della validazione del metodo è ostacolata dal fatto che molti dei termini metrologici e tecnici utilizzati per descrivere i processi di valutazione dei metodi, variano tra settori analitici diversi, sia in termini di significato, sia nel modo in cui vengono applicati. La Guida non può stabilire in quale contesto un termine venga utilizzato correttamente o meno, sebbene intenda fornire alcuni chiarimenti. L'approccio migliore, quando si utilizza un termine che può essere frainteso, è di indicarne la fonte e quale convenzione sia stata usata.

Nel processo di validazione del metodo è implicito che gli studi per determinare le caratteristiche di prestazione³ del metodo vengano condotti utilizzando apparecchiature in specifica, che funzionino correttamente e che siano adeguatamente tarate. Pertanto, questa Guida non copre nello specifico i concetti di 'qualificazione dell'apparecchiatura' o 'qualificazione dello strumento'. Analogamente, l'analista che conduce gli studi, deve essere competente nel campo di lavoro oggetto di studio e avere una conoscenza del proprio compito tale da poter prendere decisioni adeguate in base alle osservazioni fatte durante il progredire dello studio.

³ Sinonimi comunemente utilizzati per “caratteristiche di prestazione del metodo” sono “parametri di prestazione del metodo”, “caratteristiche metrologiche” e “proprietà relative alle prestazioni”.

1.2. Note sull'uso di questa Guida

1.2.1. Terminologia

Nella revisione di questa Guida ci si è focalizzati principalmente sull'aggiornamento della terminologia e dei riferimenti bibliografici per riflettere gli sviluppi intercorsi dalla prima edizione della Guida, pubblicata quindici anni fa. Per quanto riguarda la terminologia, dove possibile, è stata seguita la terza edizione del VIM pubblicata per la prima volta nel 2007 (7, 8). Questo approccio è stato integrato, dove necessario, con la terminologia utilizzata nella ISO/IEC 17025:2005 (1), in altri documenti ISO (9-11) e nel documento "IUPAC *Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation*" (12) per rispecchiare i termini comunemente utilizzati nei laboratori analitici.

In alcuni casi può essere difficile decidere quale termine utilizzare quando sono in uso parecchi termini simili. Per chiarezza si è ritenuto importante utilizzare ciascun termine in modo coerente in tutta la Guida. Un esempio è il termine utilizzato per descrivere il documento che fornisce la descrizione dettagliata del metodo da validare utilizzando personale e attrezzature in un determinato laboratorio. Per le analisi quantitative il VIM parla di 'procedura di misura', nella ISO/IEC 17025 questo documento è il 'metodo', nella ISO 15189 (2), esso è la 'procedura di esame' e molti laboratori lo indicano come 'Procedura Operativa Standard' (POS). Il gruppo di lavoro ha deciso di seguire la ISO/IEC 17025 e utilizzare il termine generico 'metodo'. Di conseguenza, questa Guida utilizza il termine largamente riconosciuto 'validazione del metodo' anche se 'validazione della procedura' potrebbe essere più corretto.

Il termine 'selettività' è stato preferito rispetto a 'specificità' (13) poiché è quello utilizzato dalla IUPAC (12). [NdT: lo stesso per il termine '*ruggedness*' rispetto a '*robustness*', che però in italiano vengono tradotti entrambi con 'robustezza'].

Per descrivere il lavoro del laboratorio vengono utilizzati vari termini, ad esempio 'taratura', 'misurazione', 'prova', 'analisi' ed

'esame'. Questa Guida utilizza 'analisi' in senso generale, specificando, laddove necessario, le circostanze. Analogamente, in questa Guida ci si riferisce spesso alla misura della concentrazione sebbene nel laboratorio chimico siano abitualmente determinate parecchie altre grandezze (14).

Nei processi di campionamento, di preparazione del campione e di analisi, possono essere utilizzati termini quali 'obiettivo del campionamento', 'campione primario', 'campione elementare', 'campione composito', 'sottocampione', 'campione di laboratorio', 'campione di prova', 'porzione di prova' e 'soluzione di prova' (15, 16). In questa Guida si usa generalmente il termine 'campione' o 'campione di prova'⁴ (17). I termini più importanti utilizzati nella Guida sono definiti nel testo, utilizzando le definizioni del VIM, della ISO 9000 (9) e IUPAC (17, 18) ove possibile. I termini del VIM che si applicano alla chimica analitica sono spiegati con maggiore dettaglio nella Guida Eurachem "Terminologia per le misurazioni analitiche – Introduzione al VIM 3" (8). Gli utilizzatori noteranno che non c'è ancora accordo universale sulla definizione di alcuni termini utilizzati nella validazione dei metodi.

1.2.2. Riferimenti rapidi

Nel capitolo 6, i riquadri ombreggiati denominati 'Schema di Schema di riferimento rapido' riassumono i consigli relativi a ciascuna caratteristica di prestazione di un metodo. Si riconosce comunque che in molti casi i laboratori potrebbero non avere il tempo e le risorse per condurre esperimenti con il dettaglio qui descritto. Condurre le operazioni descritte nei riquadri utilizzando meno repliche di quelle suggerite, potrà ancora fornire informazioni utili ed è certamente meglio di niente. Comunque, le informazioni ottenute saranno meno affidabili rispetto a quelle ottenute eseguendo tutte le repliche indicate.

⁴ Campione di prova: campione preparato dal campione di laboratorio, dal quale sono rimosse porzioni di prova per le prove o per l'analisi (17).

2. Che cos'è la validazione del metodo?

2.1. Definizioni

Nella Tabella 1 sono riportate le definizioni di 'validazione' tratte da tre documenti internazionali. La 'validazione del metodo' è essenzialmente il processo di definizione dei requisiti analitici e di conferma che il metodo considerato sia in grado di soddisfare quanto richiesto per quella specifica applicazione. Insa in questo processo è la necessità di valutare le prestazioni del metodo. Il giudizio di idoneità del metodo è importante; in passato la validazione del metodo tendeva a concentrarsi solo sulla valutazione delle caratteristiche di prestazione.

Generalmente si considera la validazione del metodo strettamente collegata al suo sviluppo. Molte delle caratteristiche di prestazione (Tabella 2) che sono associate alla validazione del metodo vengono in genere valutate, almeno approssimativamente, durante lo sviluppo del metodo. Tuttavia, è importante ricordare che deve essere eseguita la validazione formale della versione finale del metodo (la procedura documentata).

Alcuni settori utilizzano i concetti di 'validazione primaria' e 'validazione secondaria', quest'ultima con il significato di 'verifica' (19). Anche i concetti di 'qualifica' e 'conferma metrologica' (20) sembrano includere la 'verifica' (Tabella 1).

2.2. Qual è la differenza tra validazione e verifica?

La ISO 9000 (9) definisce la verifica come "Conferma, sostenuta da evidenze oggettive, del soddisfacimento di requisiti specificati". Questa definizione è molto simile a quella di validazione riportata nella Tabella 1. Il VIM (7) afferma che la verifica è la "messa a disposizione dell'evidenza oggettiva che un dato elemento soddisfa uno o più requisiti specificati" e che la validazione è una "verifica nella quale i requisiti specificati sono adeguati a un utilizzo previsto".

Un laboratorio può adottare una procedura validata che, ad esempio, è stata pubblicata in una norma, oppure, può acquistare da un fornitore commerciale un sistema di misura completo da utilizzare per una applicazione specifica. In entrambi questi casi, la validazione di base è già stata eseguita, ma il laboratorio dovrà confermare la sua competenza nell'applicazione del metodo. Quest'ultimo processo è la verifica. Significa che è necessario eseguire del lavoro sperimentale per dimostrare che il metodo funziona nel laboratorio dell'utente finale. Tuttavia, il carico di lavoro sarà verosimilmente molto inferiore in confronto a quello richiesto per la validazione di un metodo sviluppato all'interno del laboratorio stesso.

I termini validazione e verifica sono ulteriormente trattati nella Guida Eurachem sulla terminologia nelle misurazioni analitiche (8).

Tabella 1. Definizioni del concetto di 'validazione' in ISO 9000, ISO/IEC 17025 e VIM

Definizioni	Riferimento
Conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti, relativi a un utilizzo o ad un'applicazione specifici previsti, sono stati soddisfatti	ISO 9000 (9) ^a
Conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista sono soddisfatti	ISO/IEC 17025 (1)
Verifica, nella quale i requisiti specificati sono adeguati a un utilizzo previsto	VIM (7) ^b

^a ISO 9000 definisce 'processo di qualificazione' come "processo che permette di dimostrare la capacità di ottemperare a requisiti specificati"

^b VIM definisce 'verifica' come "messa a disposizione dell'evidenza oggettiva che un dato elemento soddisfa uno o più requisiti specificati"

Tabella 2. Caratteristiche di prestazione comunemente valutate durante la validazione del metodo**Caratteristiche di prestazione**

Selettività

Limite di rivelabilità (LOD) e Limite di quantificazione (LOQ)

Intervallo di lavoro

Sensibilità analitica

Giustezza

- Scostamento, recupero

Precisione

- Ripetibilità, ripetibilità intermedia e riproducibilità

Incertezza di misura^a

Robustezza

^a In senso stretto, l'incertezza di misura non è una caratteristica di prestazione di una particolare procedura di misura ma una proprietà dei risultati ottenuti utilizzando quella procedura di misura.

3. Perché è necessario validare i metodi?

3.1. L'importanza delle misurazioni analitiche

Milioni di prove, misurazioni ed esami sono effettuati ogni giorno, in migliaia di laboratori in tutto il mondo. Essi sono richiesti per innumerevoli motivi, ad esempio: per la valutazione delle merci per fini commerciali; a supporto del sistema sanitario; per il controllo della qualità delle acque potabili, degli alimenti e dei mangimi; per determinare la composizione elementare di una lega e confermarne l'adeguatezza per la costruzione di un aeroplano; per le analisi forensi di fluidi corporei nelle indagini giudiziarie. Di fatto, ogni aspetto della vita sociale richiede, in qualche modo, l'attività del laboratorio di analisi.

Eseguire queste misurazioni è costoso e ulteriori costi possono derivare dalle decisioni assunte sulla base dei risultati. Ad esempio, risultati analitici che dimostrino che un alimento non è idoneo al consumo possono comportare richieste di indennizzo; la conferma analitica della presenza di droghe proibite può determinare multe, reclusione o perfino, in alcune nazioni, esecuzioni capitali. È evidente perciò quanto sia importante eseguire ogni misurazione in modo corretto e poter dimostrare che il risultato è corretto.

3.2. Il dovere professionale del chimico analitico

Se il risultato di un'analisi non è affidabile, allora ha poco valore e tanto varrebbe non eseguire affatto la prova. Quando un cliente chiede un lavoro analitico ad un laboratorio, assume che il laboratorio abbia un livello di competenza che egli stesso non possiede. Il cliente si aspetta che i risultati presentati siano affidabili, e in genere ne dubita solo quando nasce un contenzioso. Per questo motivo, il laboratorio e il suo personale hanno la palese responsabilità di giustificare la fiducia del cliente, fornendo la risposta corretta alla parte analitica del problema, ovvero dei risultati che abbiano una dimostrabile 'idoneità per lo scopo'. In questo è implicito che le prove eseguite siano appropriate per gli aspetti analitici del problema che il cliente intende risolvere, e che il rapporto finale presenti i dati analitici in modo che il cliente possa

comprenderli immediatamente e trarne le appropriate conclusioni. La validazione consente agli analisti di dimostrare che un metodo è 'idoneo per lo scopo'.

Essere 'idoneo per lo scopo previsto' significa che il risultato analitico deve avere un grado di affidabilità tale da garantire che ogni decisione basata su di esso possa essere presa con sicurezza. Per questo motivo si devono convalidare le prestazioni del metodo e stimare l'incertezza del risultato al livello di fiducia richiesto. L'incertezza dovrebbe essere stimata e riportata, secondo modalità largamente riconosciute, intrinsecamente coerenti e facili da interpretare (21). La maggior parte delle informazioni necessarie a valutare l'incertezza possono essere ottenute durante la validazione del metodo. Questo argomento è trattato brevemente nel paragrafo 6.7 e in maggior dettaglio nella Guida Eurachem/CITAC 'Quantificazione dell'incertezza nelle misure analitiche' (22).

Indipendentemente dalla bontà del metodo e dalla competenza con cui è utilizzato, un problema può essere risolto attraverso i risultati analitici solo se i campioni analizzati sono appropriati per quel problema. Il prelievo dei campioni è un lavoro per esperti, che richiede la comprensione del problema e della chimica pertinente. Un laboratorio dovrebbe, laddove possibile, offrire al committente consigli circa il prelievo dei campioni, come parte della propria assistenza al cliente. Naturalmente, ci saranno occasioni in cui il laboratorio non potrà eseguire da sé o indirizzare il prelievo dei campioni. In queste occasioni i risultati dell'analisi dovranno essere riportati con riferimento ai campioni ricevuti, dichiarandolo esplicitamente nel rapporto di prova.

Si è prevalentemente (e giustamente) focalizzata l'attenzione sull'obiettivo generale della validazione, cioè dimostrare che i metodi sono 'idonei per lo scopo'. Tuttavia, è opportuno riconoscere i benefici ulteriori di uno studio di validazione del metodo per il laboratorio. Esso fornisce una solida conoscenza ed esperienza dei dettagli pratici per l'esecuzione del metodo, compresa la consapevolezza delle fasi critiche del processo. La validazione dà al laboratorio e ai suoi dipendenti una maggiore fiducia nei propri risultati.

3.3. Lo sviluppo del metodo

Il lavoro di validazione è preceduto da una fase di sviluppo che può coinvolgere diverse persone e assumere varie modalità.

Ad un estremo, c'è l'adattamento di un metodo esistente introducendo piccoli cambiamenti così da renderlo adatto per una nuova applicazione. Ad esempio, un metodo consolidato per determinare il benzene nell'acqua potrebbe essere adattato per dosare il toluene nell'acqua. La matrice è la stessa, e i due analiti hanno proprietà sostanzialmente simili. È probabile che gli stessi principi per la separazione, identificazione e quantificazione che sono applicati al benzene possano essere applicati anche al toluene.

Se, invece, fosse richiesto un metodo per determinare il benzene nel terreno, cercare di adattare il metodo per il benzene nell'acqua potrebbe non essere la scelta migliore e potrebbe essere meglio partire da qualche altro

metodo per determinare le sostanze organiche nel terreno.

All'altro estremo, il chimico analitico può partire da alcune idee sommarie e ricorrere a competenza ed esperienza per progettare un metodo idoneo. Ciò chiaramente comporta un bel po' di lavoro in più e qualche dubbio sul buon esito del metodo definitivo. Nella fase di sviluppo di un metodo non è insolito lavorare contemporaneamente a differenti progetti, per arrivare alla fine a scegliere il migliore.

Indipendentemente da tutti gli sforzi fatti durante lo sviluppo del metodo, non c'è garanzia che il metodo funzionerà adeguatamente durante la validazione (o nelle normali condizioni sperimentali in un certo laboratorio). Il coinvolgimento di più persone nelle fasi di sviluppo e validazione, offre la possibilità di controllare che le istruzioni operative (la procedura di misurazione) possano essere comprese e implementate correttamente.

4. Quando devono essere validati o verificati i metodi?

4.1. Validazione del metodo

Un metodo deve essere validato quando è necessario dimostrare che le sue caratteristiche di prestazione sono adeguate all'uso per un particolare scopo. Ad esempio, la norma ISO/IEC 17025 (1) stabilisce nella sezione 5.4.5.2 che il laboratorio deve validare:

- i metodi non normalizzati;
- i metodi sviluppati/progettati dal laboratorio;
- i metodi normalizzati utilizzati al di fuori del proprio scopo e campo di applicazione prefissato;
- estensioni e modifiche di metodi normalizzati.

La validazione dovrà essere tanto esauriente da soddisfare i requisiti connessi a un determinato uso/applicazione (23).

L'estensione della validazione dipenderà dall'applicazione, dal tipo di cambiamenti introdotti, e dalle condizioni in cui il metodo sarà utilizzato.

La validazione è necessaria anche quando bisogna dimostrare l'equivalenza dei risultati ottenuti mediante due metodi, ad esempio, un metodo sviluppato di recente e un metodo normato o regolamentato già esistente.

4.2. Verifica del metodo

Per i metodi norma(lizza)ti, come quelli pubblicati, ad esempio, da ISO o ASTM, la validazione da parte del laboratorio che utilizza il metodo non è necessaria. Comunque, il laboratorio deve verificare le prestazioni del metodo come descritto nella norma ISO/IEC 17025 sezione 5.4.2: “... *Il laboratorio deve confermare che può correttamente eseguire i metodi normalizzati prima di metterli in opera per le prove e/o le tarature.*”

La verifica è necessaria anche quando c'è un cambiamento importante, come uno strumento nuovo anche se simile, il trasferimento di un'apparecchiatura, ecc.

Nella medicina di laboratorio la maggioranza delle misurazioni e degli esami sono eseguiti con procedure commerciali che sono già state validate dal produttore, ma che devono essere verificate dall'utilizzatore finale (24). La norma ISO 15189 (2) sottolinea che “*le procedure di esame utilizzate senza modifiche saranno soggette ad una verifica indipendente da parte del laboratorio prima di essere introdotte nell'uso abituale*”. Tale verifica può includere anche situazioni quali l'aggiornamento di uno strumento con un nuovo software, o quando il controllo di qualità indica che le prestazioni di un metodo consolidato stanno cambiando nel tempo.

5. Come si valida un metodo?

5.1. Chi esegue la validazione di un metodo?

5.1.1. *Approcci per la validazione dei metodi*

Una volta terminato lo sviluppo del metodo il laboratorio deve descrivere dettagliatamente l'intera procedura di misura (si veda l'Appendice A). Quest'ultima sarà la procedura che verrà formalmente validata.

Esistono due differenti approcci per la validazione di un metodo: il primo prevede il confronto inter-laboratorio e il secondo la validazione interna con uno studio di laboratorio singolo. Indipendentemente dall'approccio adottato per la validazione, è responsabilità del laboratorio che utilizzerà il metodo assicurare che quest'ultimo sia idoneo per lo scopo previsto e, se necessario, eseguire ulteriori prove per integrare i dati di validazione esistenti.

5.1.2. *Approccio del confronto inter-laboratorio*

In letteratura esistono numerose pubblicazioni inerenti la validazione dei metodi effettuata mediante specifici confronti inter-laboratorio, spesso definiti 'studi collaborativi' o 'studi cooperativi'. Esistono numerosi protocolli relativi a questa tipologia di validazione (25-28) oltre alla norma ISO 5725 (29), considerata quella più largamente applicabile. Se si sta sviluppando un metodo che si prevede avrà un ampio bacino di utenza, come nel caso di una procedura che verrà pubblicata come norma, allora l'approccio più opportuno alla validazione sarà uno studio collaborativo che coinvolga un gruppo di laboratori. Un metodo pubblicato, validato in questo modo, si dimostra più robusto. Le informazioni che vengono normalmente pubblicate sono: la precisione (ripetibilità, riproducibilità e/o corrispondenti limiti di precisione) e, talvolta, la stima dello scostamento. Laddove un metodo sia stato validato da una delle organizzazioni per la normazione quali ISO, CEN o AOAC International, l'utente dovrà solitamente solo verificare i dati di prestazione pubblicati e/o fissare i dati di prestazione per il proprio utilizzo del metodo. Questo approccio, di

conseguenza, riduce il carico di lavoro per il laboratorio nella validazione del metodo da utilizzare.

5.1.3. *Approccio dello studio di laboratorio singolo*

I laboratori possono talvolta aver bisogno di metodi non disponibili come metodi normalizzati. Se il metodo verrà sviluppato per un utilizzo interno, ad esempio perché non è di interesse generale o perché gli altri laboratori sono in concorrenza, ai fini della validazione sarà opportuno utilizzare l'approccio di laboratorio singolo (12).

Se i metodi interni validati da un singolo laboratorio verranno o meno accettati ai fini legali, dipende dalle eventuali indicazioni relative al settore analitico interessato. Dovrebbe generalmente essere possibile richiedere una chiara dichiarazione dell'orientamento in materia da parte dell'autorità preposta.

5.2. Completezza degli studi di validazione

Il laboratorio deve decidere quali caratteristiche di prestazione (si veda la Tabella 2 e il capitolo 6) devono essere determinate ai fini della validazione del metodo e, in alcuni casi, quanto debba essere dettagliato lo studio relativo ad ogni singola caratteristica. Il protocollo IUPAC (12) elenca una casistica che tiene conto, tra l'altro, della tipologia di metodo da utilizzare e della competenza del laboratorio.

Quando lo scopo del lavoro analitico è ben definito e le applicazioni sono simili nel tempo, è possibile per una organizzazione o un settore emanare delle linee guida generali per definire l'estensione degli studi di validazione nel proprio contesto. Un esempio per il settore farmaceutico è riportato nella Tabella 3.

Un buon punto di partenza, per iniziare il processo di validazione, è un'attenta analisi delle specifiche analitiche elencate nello scopo del metodo (si veda il paragrafo A.5 in Appendice A); tuttavia è ben noto che, nella pratica, questo può non essere sempre possibile. La valutazione delle prestazioni del metodo può essere soggetta a limitazioni. Come riportato nella sezione 5.4.5.3 della

ISO/IEC 17025 “La validazione è sempre un bilancio fra costi, rischi e possibilità tecniche”. Il laboratorio dovrà fare del suo meglio, entro i vincoli imposti, tenendo conto delle richieste del cliente e dei requisiti di legge, delle esperienze pregresse sul metodo, degli strumenti a disposizione (paragrafo 5.4), e anche della necessità di compatibilità metrologica (7) con i risultati di altri metodi già in uso nello stesso o in altri laboratori. Durante lo sviluppo o la messa a punto del metodo, alcune caratteristiche di prestazione possono essere state determinate approssimativamente. Spesso, in una particolare serie di esperimenti si possono ottenere informazioni su più caratteristiche di prestazione. Quindi, con un’attenta programmazione delle prove sperimentali, è possibile minimizzare gli sforzi necessari per ottenere quanto necessario.

Le implicazioni dei vincoli descritti in precedenza sono particolarmente critiche per i

metodi che non saranno utilizzati di routine. Il processo di validazione di metodi destinati ad essere utilizzati di routine risulta invece ben definito. Naturalmente, gli stessi principi dovranno essere applicati sia per i metodi ‘ad hoc’ [NdT: intesi come metodi rivolti a richieste occasionali, quali individuare l’ordine di grandezza delle concentrazioni possibili o verificare una possibile contaminazione in una matrice insolita, per i quali lo sforzo speso nella validazione deve essere necessariamente limitato] sia per quelli di routine. È necessario avere un elevato livello di fiducia relativamente ai risultati prodotti. Può essere difficoltoso stabilire un compromesso fra vincoli di tempo e costi e la necessità di validare il metodo. In alcuni casi può risultare più conveniente subappaltare le analisi ad un altro laboratorio in grado di eseguirle su base routinaria.

Tabella 3. Estensione della validazione per quattro diverse applicazioni analitiche. Esempio relativo al settore farmaceutico (13). La ‘x’ indica una caratteristica di prestazione che deve di norma essere fornita nel corso della validazione

Caratteristica di prestazione	Tipologia di applicazione analitica			
	Prova di identificazione	Prova quantitativa per le impurezze	Prova limite per le impurezze	Quantificazione dei costituenti principali
Selettività	x	x	x	x
Limite di rivelabilità (LOD)			x	
Limite di quantificazione (LOQ)		x		
Campo di misura, incluso l’intervallo di linearità		x		x
Giustezza (scostamento)		x		x
Precisione (ripetibilità e ripetibilità intermedia)		x		x

NOTA: La tabella è stata semplificata e adattata alla struttura e alla terminologia adottate in questa Guida

5.3. Piano di validazione e documentazione

La validazione, inclusa la registrazione dei risultati, deve essere eseguita secondo una procedura documentata.

L’esatto schema di un piano di validazione (‘protocollo di validazione’) e del rapporto che ne riassume i risultati possono essere definiti in linee guida di settore (si veda il paragrafo 5.5). Gli enti di accreditamento nazionali possono

richiedere dei requisiti minimi per questa documentazione (23). Ad ogni modo, un modello semplice che combini il piano della validazione e i suoi risultati può, ad esempio, essere costituito dalle seguenti sezioni.

- **Introduzione** [NdT: ‘Title’ nel testo originale]. In questa sezione si deve identificare il metodo, il personale responsabile della validazione e i tempi previsti per il suo completamento. Essa deve contenere informazioni concise sullo

- scopo del metodo e una sua breve descrizione, oltre che dettagli sulla tipologia di metodo (es. norma internazionale, metodo interno, ecc.), analita, misurando, unità di misura, tipologia di campione e uso previsto. Il campionamento e la eventuale suddivisione del campione possono far parte del metodo e devono, in tal caso, essere oggetto di validazione. Anche se queste attività vengono eseguite al di fuori del laboratorio di analisi, è utile includere informazioni a riguardo nel piano e nel rapporto sulla validazione.
- **Pianificazione.** In questa sezione si deve delineare lo scopo della validazione, ad esempio, la validazione completa di un nuovo metodo, la verifica delle caratteristiche di prestazione di un metodo normalizzato, l'estensione dello scopo del metodo, ecc. Deve essere indicata l'estensione del processo di validazione, cioè le caratteristiche di prestazione che verranno esaminate e ogni altro requisito correlato.
 - **Caratteristiche di prestazione.** In questa sezione si deve fornire una breve spiegazione delle caratteristiche di prestazione richieste, ripeterne i requisiti, descrivere gli esperimenti che dovranno essere condotti e come ne saranno valutati i risultati. I risultati delle prove e le relative conclusioni dovranno essere documentati utilizzando una sezione distinta per ogni caratteristica di prestazione descritta.
 - **Riassunto.** L'ultima sezione deve riassumere il lavoro svolto e i suoi risultati. Qui si può fornire ogni implicazione per l'utilizzo routinario del metodo e per il controllo di qualità interno ed esterno. La cosa più importante è che la sezione contenga una dichiarazione conclusiva circa l'idoneità (o meno) del metodo per lo scopo previsto. Questa dichiarazione è un requisito della norma ISO/IEC 17025 (1).

5.4. Strumenti della validazione

5.4.1. Bianchi

L'utilizzo di diverse tipologie di 'bianchi' permette di valutare in che misura il segnale misurato è attribuibile all'analita o ad altri

fattori. Per l'analista sono disponibili diverse tipologie di bianchi:

- **Bianchi reagente**⁵. I reagenti utilizzati durante il processo analitico (inclusi i solventi utilizzati per i processi di estrazione o solubilizzazione) vengono analizzati per determinare se e in che misura interferiscano con la misura del segnale.
- **Campioni bianchi.** Si tratta essenzialmente di campioni costituiti dalla sola matrice, senza la presenza dell'analita, ad esempio un campione di urina umana privo di una specifica droga d'abuso, o un campione di carne senza residui di ormoni. I campioni bianchi possono risultare difficili da reperire ma tali materiali sono necessari per fornire una stima realistica delle interferenze che possono presentarsi nell'analisi dei campioni di prova.

5.4.2. Campioni di prova di routine

I campioni di prova di routine sono utili per fornire informazioni su precisione, interferenze, ecc., che possono essere riscontrate concretamente nel lavoro quotidiano di analisi. Se è nota, con accuratezza, la concentrazione di analita nel materiale di prova, la si potrà utilizzare per valutare l'entità dello scostamento. Una valutazione accurata del contenuto di analita può essere ottenuta con un metodo di riferimento, sebbene questi non siano sempre disponibili.

5.4.3. Materiali/soluzioni fortificate

Si tratta di materiali o soluzioni alle quali l'analita/gli analiti d'interesse sono stati addizionati deliberatamente. Questi materiali o soluzioni possono anche già contenere l'analita d'interesse pertanto è necessaria attenzione per assicurare che la procedura di fortificazione non porti ad un livello di concentrazione al di fuori del campo di misura del metodo. Fortificare con una quantità nota di un analita permette l'aumento della risposta dell'analita da misurare e consente di calcolarne la concentrazione in funzione del quantitativo aggiunto, anche se la quantità assoluta di

⁵ Un bianco reagente che venga sottoposto all'intera procedura di analisi è talvolta anche chiamato 'bianco procedurale'

analita presente prima e dopo l'aggiunta non è nota. Si noti che la maggior parte dei metodi di fortificazione non consentono all'analita aggiunto di legarsi alla matrice tanto fortemente quanto sarebbe avvenuto se l'analita fosse stato naturalmente presente nel campione. Pertanto ci si può aspettare che la stima dello scostamento ottenuta da campioni fortificati sia eccessivamente ottimistica.

La fortificazione non deve essere necessariamente limitata all'analita d'interesse. Essa può includere qualsiasi cosa aggiunta al campione per stimare l'effetto di tale aggiunta. Ad esempio, il campione può essere fortificato con diverse quantità di una particolare sostanza interferente al fine di definire la concentrazione dell'interferente alla quale la determinazione dell'analita viene inficiata.

La natura dell'aggiunta deve essere necessariamente nota.

5.4.4. Materiali "naturalmente contaminati"

[NdT: 'Incurred materials' nel testo originale]

Questi sono materiali nei quali l'analita d'interesse non è, di regola, presente, ma che sono stati contaminati, volontariamente o involontariamente, a monte del processo di prelievo del campione. L'analita è dunque legato alla matrice più fortemente di quanto non lo sarebbe se fosse stato aggiunto attraverso la procedura di fortificazione. Il valore dell'analita dipenderà dalla quantità in contatto con il materiale, dalla velocità di incorporazione e rilascio dalla matrice e da ogni altra forma di dissipazione attraverso il metabolismo, il decadimento spontaneo o altri processi chimici e fisici. L'utilità di campioni naturalmente contaminati per i propositi di una validazione dipende da quanto accuratamente possa essere stabilito il valore dell'analita. Di seguito si riportano esempi di materiali naturalmente contaminati:

1. Erbicidi nella farina ottenuta da cereali spruzzati con erbicidi durante la crescita;
2. Principi attivi in formulazioni farmaceutiche aggiunti nella fase di formulazione;
3. Polvere di albume (contenuto di proteine noto) aggiunta all'impasto di un biscotto prima della cottura al forno nelle analisi per la ricerca di allergeni.

5.4.5. Materiali di riferimento

Nella lingua inglese, bisogna prestare attenzione quando si parla di 'standard', poiché questo termine si riferisce anche a documenti scritti, come le norme ISO. Laddove il termine si riferisce a sostanze utilizzate per scopi di taratura o identificazione è preferibile riferirsi loro come a materiali di riferimento o calibranti/calibratori (7) [NdT: nella lingua italiana questo problema non esiste perché il termine 'standard' viene tradotto, a seconda del contesto, come 'norma' oppure come 'materiale di riferimento'. Invece, esiste un problema analogo per la parola 'campione' che viene utilizzata sia per i 'campioni di prova', che per i 'campioni di misura']. Tradizionalmente si pensa a questi come a soluzioni di singole sostanze ma in pratica possono essere costituiti da qualunque materiale in cui un particolare parametro o proprietà siano stati caratterizzati al punto da poter rappresentare un riferimento metrologico.

È importante distinguere fra materiali di riferimento (MR) e materiali di riferimento certificati (MRC) (7, 30) data la significativa differenza nella modalità del loro utilizzo nel processo di validazione del metodo (paragrafo 6.5.2). Gli MR possono essere costituiti virtualmente da qualsiasi materiale utilizzato come base di riferimento, e possono includere reagenti di laboratorio di purezza nota, prodotti chimici industriali, o altri artefatti. Le proprietà d'interesse in questo caso devono essere stabili e omogenee ma il materiale non richiede un alto grado di caratterizzazione, riferibilità metrologica, incertezza e documentazione come nel caso dei MRC.

La caratterizzazione del parametro di interesse in un MRC è generalmente controllata molto più rigorosamente di quanto non avvenga per un MR e in più il valore riportato è certificato con riferibilità metrologica e incertezza documentate. La caratterizzazione viene generalmente effettuata con una serie di metodi differenti, o attraverso una sola procedura di riferimento primaria, così da ridurre o eliminare per quanto possibile ogni scostamento nella caratterizzazione.

La valutazione dello scostamento richiede un riferimento affidabile quindi, preferibilmente, un MRC nella stessa matrice e con livelli di concentrazione dell'analita simili a quelli presenti nei campioni di prova.

5.4.6. Tecniche statistiche

I metodi statistici sono essenziali per riassumere i dati e produrre giudizi oggettivi sulle differenze tra gruppi di dati (valutazione della significatività). Gli analisti dovranno avere familiarità almeno con i concetti più elementari della teoria statistica soprattutto come ausilio nella valutazione dei parametri precisione, scostamento, intervallo di linearità, LOD, LOQ e incertezza di misura. Sono riportati i riferimenti di un certo numero di libri utili per un'introduzione alla statistica applicata alla chimica analitica (5, 6, 31-34).

5.5. Requisiti della validazione

In particolari settori, i requisiti per condurre la validazione dei metodi possono essere descritti in linee guida specifiche (es. 13, 25, 35). Laddove tali requisiti esistano, si raccomanda di seguirli. Questo assicura che la terminologia e la statistica utilizzate nella validazione siano interpretate coerentemente nel settore di pertinenza. Il riconoscimento ufficiale di un metodo può richiedere la caratterizzazione attraverso uno studio collaborativo.

5.6. Il processo di validazione del metodo

Di fronte ad uno specifico problema posto dal cliente, il laboratorio deve innanzi tutto stabilire i requisiti analitici che a loro volta determinano le caratteristiche di prestazione che il metodo dovrà avere per risolvere il problema (Figura 1).

A fronte di questi requisiti, il laboratorio avrà bisogno di verificare se esistono metodi adatti, o se è necessario svilupparne o modificarne uno. Si noti che alcuni regolamenti legislativi possono prescrivere l'uso di un metodo specifico. La Tabella 4 mostra il tipo di domande che possono essere poste nella formalizzazione dei requisiti analitici (colonna 1) e le corrispondenti caratteristiche di prestazione del metodo che

potrebbe essere necessario valutare (colonna 2). Il laboratorio identificherà e valuterà quindi le caratteristiche di prestazione pertinenti e le confronterà con i requisiti analitici. Il processo della validazione termina con una dichiarazione conclusiva in merito alla soddisfazione (o meno) dei requisiti analitici [NdT: dichiarazione di idoneità del metodo]. Se questi requisiti non sono soddisfatti è necessario sviluppare ulteriormente il metodo [NdT: o sostituirlo]. Questo processo di sviluppo e valutazione viene reiterato fino a che si ritiene che il metodo soddisfi i requisiti.

Nella realtà i requisiti analitici sono di rado concordati formalmente in anticipo con il cliente. I clienti generalmente definiscono le loro necessità in termini di costi e/o tempi e raramente conoscono il livello di prestazione analitica necessario, anche se i requisiti di prestazione per i metodi possano essere comunque specificati nel caso di analisi eseguite per rispondere ad un requisito legislativo o verificare la conformità con una specifica. Ad esempio, l'Unione Europea (UE) ha pubblicato requisiti analitici, tra l'altro, per l'analisi delle acque potabili (36), per le analisi effettuate nell'ambito della direttiva quadro sulle acque (37), per la determinazione dei residui di farmaci veterinari negli alimenti di origine animale (38) e dei residui di pesticidi negli alimenti e nei mangimi (39).

In ogni caso, di solito la decisione su quale livello di prestazione sia richiesto è lasciata alla discrezione dell'analista. Molto spesso questo si risolve nel definire requisiti analitici in linea con le prestazioni note del metodo (es. quelle pubblicate nei metodi normati, osservate nelle prove valutative (*Proficiency Test*, PT) o stimate con modelli matematici, quali la funzione di Horwitz) (40).

Vincoli economici possono imporre che lo sviluppo di un metodo, che soddisfi un particolare requisito analitico, non sia economicamente realizzabile, in questo caso è necessario decidere se si possano modificare i requisiti analitici in modo tale che possano essere soddisfatti o se si debba rivalutare la motivazione stessa della richiesta analitica.

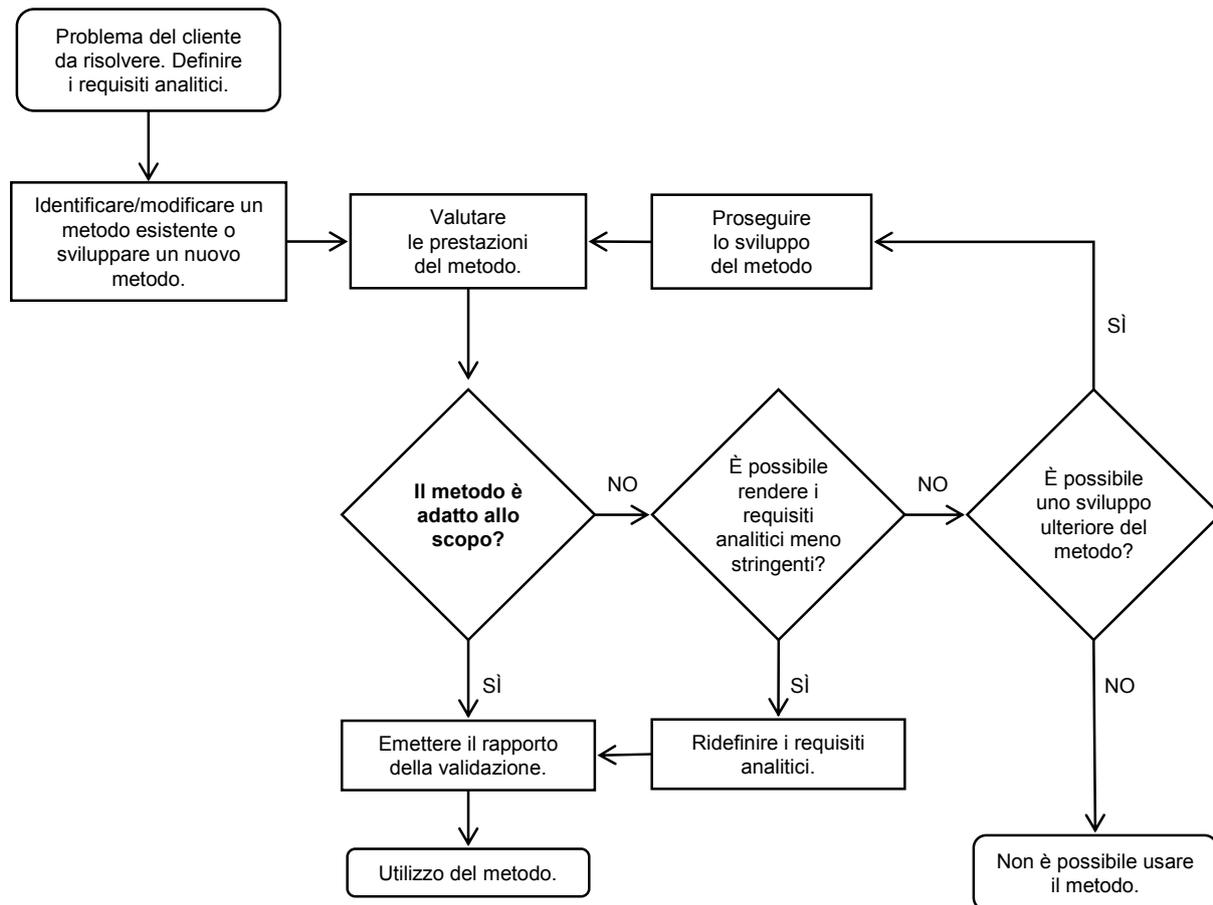


Figura 1. Schema della validazione di un metodo: il processo rappresentato parte dalla richiesta del cliente e arriva alla decisione del laboratorio circa la possibilità di soddisfare o meno le richieste del cliente con il metodo selezionato. Nota: la validazione del metodo consiste nella valutazione delle caratteristiche di prestazione del metodo e nel successivo confronto di queste con i requisiti analitici. Indipendentemente dal fatto che siano disponibili dati sulle prestazioni del metodo, l'idoneità per lo scopo sarà determinata da come si comporta il metodo quando viene utilizzato dall'analista designato con le attrezzature disponibili

Tabella 4. Quesiti che potrebbero essere posti nella fase di formalizzazione dei requisiti analitici e relative caratteristiche di prestazione con il rimando alla specifica sezione in questa Guida

Quesito	Caratteristica di prestazione	Paragrafo	Nota
Ci sono limitazioni (e quali) alle risorse disponibili - personale, tempo, denaro, strumentazione e reagenti, strutture del laboratorio?	-	-	a)
La richiesta include il campionamento e la suddivisione in aliquote (e queste attività dovranno essere effettuate dal laboratorio)?			
Ci sono restrizioni sulla quantità o sulla disponibilità del campione?			
Qual è la natura chimica, biologica e fisica della matrice?			
L'analita è disperso o localizzato?			
È richiesta una risposta di tipo qualitativo o quantitativo?	Selettività LOD e LOQ	6.1 6.2	
Quali sono gli analiti da ricercare e i livelli previsti (% , µg/g, ng/g, ecc.)? Gli analiti sono presenti in più forme (es. stati di ossidazione diversi, stereoisomeri), ed è necessario poterle distinguere?	Selettività LOD e LOQ Campo di misura e intervallo di linearità	6.1 6.2 6.3	
Qual è la grandezza che si intende misurare ('il misurando')? Si ricerca la concentrazione 'totale' dell'analita presente, o il 'quantitativo estratto' in condizioni specifiche?	Recupero	6.5	
Che giustezza e precisione sono richieste? Qual è l'incertezza massima ammessa (incertezza obiettivo) e come deve essere espressa? [NdT: 'incertezza obiettivo', VIM 2.34 – "incertezza di misura specificata in forma di limite superiore e stabilita sulla base dell'utilizzo previsto dei risultati di misura"]	Giustezza e recupero Ripetibilità, ripetibilità intermedia, riproducibilità Incertezza di misura	6.5 6.6 6.7	b)
Quali sono le specie che si prevede possano interferire con l'analita/gli analiti?	Selettività	6.1	
Sono stati stabiliti limiti di tolleranza per tutti i parametri critici per lo svolgimento delle analisi (es. tempo di estrazione, temperatura d'incubazione)?	Robustezza	6.8	c)
I risultati devono essere confrontati con quelli ottenuti da altri laboratori?	Incertezza di misura	6.7	b)
I risultati devono essere confrontati con specifiche esterne?	Incertezza di misura	6.7	b)

a) Non tutti gli aspetti considerati nei requisiti analitici sono direttamente correlati alla validazione del metodo ma determinano in modo più ampio quali tecniche analitiche possano essere applicate nello specifico. Ad esempio, a seconda che l'analita sia disperso nel campione o isolato sulla superficie, si dovranno applicare tecniche diverse.

b) Un elemento essenziale dei requisiti analitici è la possibilità di valutare se un metodo è adatto o meno per lo scopo previsto. Devono quindi includere l'incertezza di misura richiesta, espressa come incertezza tipo o come incertezza estesa.

c) Di solito la robustezza rispetto allo scopo, cioè tipologia di matrici e campo di misura, dei metodi normalizzati pubblicati è stata già dimostrata. Perciò la verifica da parte del laboratorio singolo per l'applicazione di un metodo normalizzato pubblicato di solito non richiede la valutazione della robustezza.

6. Caratteristiche di prestazione di un metodo

6.1. Selettività

6.1.1. Termini e definizioni

La selettività analitica indica la “*misura in cui un metodo può essere usato per determinare particolari analiti in miscele o matrici senza interferenze da parte di altri componenti con comportamento simile*” (41).

Le definizioni in vari altri documenti (7, 18, 42) sono abbastanza simili a questa interpretazione. Mentre la IUPAC raccomanda il termine ‘selettività’, in alcune aree, ad esempio nel settore farmaceutico (13) si usa il termine ‘specificità’, o meglio ‘specificità analitica’, per evitare confusione con il termine ‘specificità (diagnostica)’, che si usa nella medicina di laboratorio (43).

6.1.2. Effetti delle interferenze

In generale, si può dire che i metodi analitici consistano in una fase di misura che può essere o meno preceduta da una fase di isolamento. Nella fase di misura, di norma la concentrazione di un analita non è misurata direttamente. Viene invece quantificata una proprietà specifica (es. l'intensità della luce). È, dunque, fondamentale stabilire che la proprietà misurata sia dovuta solo all'analita e non a qualcos'altro chimicamente o fisicamente simile, o che compaia per coincidenza causando così uno scostamento nel risultato di misura. Potrebbe essere necessario che la fase di misura sia preceduta da una fase di isolamento per migliorare la selettività del sistema di misura.

Le interferenze possono aumentare o diminuire il segnale attribuito al misurando, causando uno scostamento. L'entità dell'effetto per una data matrice è solitamente proporzionale al segnale e, pertanto, si parla a volte di effetto ‘proporzionale’. Esso modifica la pendenza della funzione di taratura, ma non la sua intercetta. Questo effetto è anche chiamato ‘rotazionale’ (44).

Un effetto ‘traslazionale’ o ‘effetto fisso’ si genera da un segnale prodotto da interferenti presenti nella soluzione di prova. È quindi indipendente dalla concentrazione dell'analita. Esso è spesso chiamato interferenza ‘di fondo’ o ‘della linea di base’. Interessa l'intercetta di

una funzione di taratura, ma non la sua pendenza.

Non è insolito che effetti proporzionali e traslazionali siano presenti simultaneamente. Il metodo delle aggiunte *standard* può correggere solo gli effetti proporzionali.

6.1.3. Valutazione della selettività

La selettività di una procedura deve essere stabilita per i metodi sviluppati dal laboratorio, per i metodi adattati dalla letteratura scientifica e per i metodi pubblicati da enti di normazione se utilizzati al di fuori dello scopo specificato nel metodo normato. Se i metodi pubblicati dagli enti di normazione sono utilizzati all'interno del proprio scopo, la selettività in questo ambito è generalmente già stata studiata quale parte del processo di standardizzazione del metodo.

Per valutare la selettività di un metodo, di solito si studia la sua capacità di misurare l'analita di interesse in campioni in cui siano stati introdotti deliberatamente interferenti specifici (quelli che si pensa possano essere verosimilmente presenti nei campioni). Qualora non sia chiaro se gli interferenti siano già presenti oppure no, si può valutare la selettività del metodo studiando la sua capacità di misurare l'analita per confronto con altri metodi indipendenti. L'Esempio 1, l'Esempio 2 e lo Schema di riferimento rapido 1, riportati nel seguito, illustrano le considerazioni pratiche riguardo alla selettività.

Le tecniche di conferma possono essere utili quale mezzo per verificare l'identità degli analiti. Maggiore è l'evidenza che si può raccogliere, meglio è. Inevitabilmente, vi è un compromesso tra costi e tempo impiegati per identificare l'analita e la sicurezza con cui si può decidere se l'identificazione sia stata effettuata correttamente.

Mentre la valutazione della ripetibilità richiede che la misurazione sia ripetuta diverse volte mediante una sola tecnica, la conferma dell'identità dell'analita richiede che la misurazione sia effettuata mediante varie tecniche, preferibilmente indipendenti. La conferma aumenta la fiducia nella tecnica in esame ed è particolarmente utile quando le tecniche di conferma operano su principi significativamente differenti. In alcune applicazioni, per esempio nell'analisi di

composti organici ignoti mediante gascromatografia, l'uso di tecniche di conferma è essenziale. Quando il metodo di misura valutato è altamente selettivo, l'uso di altre tecniche di conferma può non essere necessario.

Un aspetto importante della selettività che si deve tenere presente è la possibilità che un

analita possa essere presente nel campione in più di una forma, quale, ad esempio: legato o non legato, inorganico od organometallico, o in diversi stati di ossidazione. La definizione del misurando è dunque essenziale per evitare confusione.

Esempio 1 - Cromatografia. Un picco in una traccia cromatografica potrebbe essere identificato come dovuto all'analita di interesse sulla base del fatto che un MR, contenente l'analita, generi un segnale nello stesso punto nel cromatogramma. Ma il segnale è dovuto all'analita o a qualcos'altro che coeluisce per coincidenza, cioè ad un effetto fisso? Potrebbe trattarsi dell'uno o l'altro caso, oppure di entrambi. L'identificazione dell'analita, se basata solo su questo mezzo, non è affidabile ed è necessaria qualche forma di evidenza a supporto. Ad esempio, la cromatografia potrebbe essere ripetuta utilizzando una colonna a diversa polarità, usando un differente principio di separazione per stabilire se il segnale ottenuto dal campione di prova e quello generato dall'MR appaiano ancora allo stesso tempo di ritenzione. Laddove un picco sia dovuto a più di un composto, una colonna con differente polarità potrebbe essere un buon modo per separarli. In molti casi, l'accoppiamento con i moderni spettrometri di massa può offrire un'elevata selettività, ad esempio la gascromatografia o la cromatografia liquida, accoppiata alla rivelazione con spettrometria di massa.

Esempio 2 - Spettroscopia. Nella spettroscopia infrarossa, l'identificazione di composti ignoti potrebbe essere effettuata facendo corrispondere i segnali di assorbanza (cioè 'i picchi') nello spettro dell'analita con quelli di spettri di riferimento raccolti in una libreria spettrale. Quando si ritiene che sia stata fatta la corretta identificazione, si dovrebbe registrare uno spettro di un MR per quell'analita esattamente nelle stesse condizioni della porzione di prova. Maggiore è il numero di picchi che combaciano tra lo spettro di riferimento dell'analita e l'MR, più elevata sarà la fiducia che l'identificazione sia corretta. Potrebbe anche valere la pena di esaminare quanto la forma dello spettro sia dipendente dal modo in cui l'analita è stato isolato e preparato per l'analisi all'infrarosso. Ad esempio, se lo spettro è stato registrato da un campione posto su un disco di sale, la distribuzione dimensionale delle particelle della porzione di prova sul disco potrebbe influenzare la forma dello spettro.

Schema di riferimento rapido 1 - Selettività

Cosa fare	Quante volte	Cosa calcolare/determinare dai dati	Commenti
Analizzare campioni di prova e gli MR, mediante il metodo candidato e altri metodi indipendenti.	1	Utilizzare i risultati delle tecniche di conferma per valutare la capacità del metodo di confermare l'identità dell'analita e la sua capacità di misurare l'analita isolato da altri interferenti.	Decidere quante prove a supporto siano ragionevolmente necessarie per una affidabilità sufficiente.
Analizzare campioni di prova contenenti vari interferenti presunti, in presenza degli analiti di interesse.	1	Esaminare gli effetti degli interferenti. La presenza dell'interferente impedisce l'individuazione o la quantificazione degli analiti?	Se la presenza degli interferenti impedisce l'individuazione o la quantificazione degli analiti, è necessario un ulteriore sviluppo del metodo.

6.2. Limite di rivelabilità e limite di quantificazione

6.2.1. Termini e definizioni

Se le misurazioni sono effettuate a basse concentrazioni, ci sono tre concetti generali da considerare. Primo, potrebbe essere necessario stabilire un valore del risultato che si ritiene indicare un livello di analita significativamente

diverso da zero. Spesso a questo livello deve seguire un'azione, come dichiarare un materiale contaminato. Questo livello è noto come 'valore critico', 'limite decisionale' o, nelle direttive dell'Unione Europea, come $CC\alpha$ (38).

Secondo, è importante conoscere la più bassa concentrazione di analita che può essere rivelata dal metodo ad un livello di fiducia specificato. In altre parole, qual è la concentrazione reale alla quale si potrà affermare con sicurezza che il

valore critico descritto sopra è stato superato? Per questo concetto sono utilizzati termini quali 'limite di rivelabilità (*Limit Of Detection* - LOD o *Detection Limit* - DL), 'valore minimo rivelabile' o, nelle direttive dell'Unione Europea, $CC\beta$ (38).

Terzo, è anche importante stabilire il livello più basso a cui la prestazione è accettabile per una certa tipologia di applicazione. Ci si riferisce solitamente a questo terzo concetto come limite di quantificazione (*Limit Of Quantification/Quantitation*, LOQ oppure *Quantification/Quantitation Limit*, QL)⁶.

La terminologia riferita a tutti questi concetti è molto varia e cambia tra settori. Per esempio, il termine 'limite di rivelabilità' (LOD o DL) in passato non era accettato in modo generale, sebbene utilizzato in alcuni documenti di settore (13, 38). Tuttavia, ora è incluso nel VIM (7) e nello IUPAC *Gold Book* (17). L'ISO utilizza, come termine generale, 'valore minimo rilevabile della variabile di stato netta' che, in chimica, si traduce in 'minima concentrazione netta rilevabile' (45-48). In questa Guida, per i tre concetti di cui sopra, si utilizzano i termini 'valore critico', 'limite di rivelabilità (LOD)' e 'limite di quantificazione (LOQ)'. Nella validazione del metodo, LOD e LOQ sono quelli determinati più comunemente.

È inoltre necessario distinguere tra il limite di rivelabilità strumentale e il limite di rivelabilità del metodo. Il limite di rivelabilità strumentale può essere basato sull'analisi di un campione, spesso un bianco reagente [NdT: si veda il paragrafo 5.4.1], sottoposto direttamente allo strumento (cioè omettendo ogni fase di preparazione del campione) oppure sul rapporto segnale-rumore, ad esempio in un cromatogramma. Per ottenere un limite di rivelabilità del metodo, il LOD deve essere basato sull'analisi di campioni che siano stati sottoposti all'intera procedura di misura, utilizzando risultati calcolati con la stessa equazione impiegata per i campioni di prova. Tra i due, il limite di rivelabilità del metodo è il più utile per la validazione del metodo ed è dunque su questo che questa Guida si concentra.

I paragrafi seguenti descrivono la valutazione sperimentale di LOD e LOQ. La base statistica per il calcolo del LOD è fornita nell'Appendice B. Poiché il LOD e il LOQ

dipendono entrambi dalla precisione allo zero o vicino allo zero, il paragrafo 6.2.2 descrive inizialmente la valutazione sperimentale dello scarto tipo dei risultati vicino allo zero.

6.2.2. Determinazione dello scarto tipo a bassi livelli

Di norma, sia il LOD sia il LOQ sono calcolati moltiplicando uno scarto tipo (s'_0) per un fattore opportuno. È importante che questo scarto tipo sia rappresentativo della precisione ottenuta per campioni di prova tipici e che siano effettuate sufficienti misurazioni ripetute per ottenere una stima affidabile. In questa sezione, lo scarto tipo s'_0 è basato su uno scarto tipo s_0 per risultati singoli vicini allo zero, ottenuti con le stesse convenzioni utilizzate nella pratica, ad esempio medie di repliche strumentali e correzione per il bianco (si veda nel seguito). Altri approcci alternativi sono discussi nel paragrafo 6.2.5.

Per determinare il LOD e il LOQ mediante un semplice esperimento di prove ripetute, si debbono considerare gli aspetti seguenti.

Campioni adatti per la stima di LOD e LOQ: I campioni utilizzati dovrebbero essere preferibilmente a) campioni bianchi [NdT: si veda il paragrafo 5.4.1], cioè matrici che non contengono quantità rivelabili di analita, o b) campioni di prova contenenti l'analita in concentrazioni vicine o al di sotto del LOD atteso. I campioni bianchi funzionano bene per metodi in cui per un bianco si ottiene un segnale misurabile, come in spettrofotometria e in spettroscopia atomica. Tuttavia, per tecniche come la cromatografia, che si basano sulla rivelazione di un picco al di sopra del rumore, sono necessari campioni con livelli di concentrazione vicini o al di sopra del LOD. Questi possono essere preparati, ad esempio, mediante aggiunte (*spiking*) ad un campione bianco (si veda il paragrafo 5.4).

Qualora non siano disponibili campioni bianchi o di prova a basse concentrazioni, spesso possono essere usati bianchi reagente⁷. Se questi bianchi reagente non sono sottoposti a tutta la procedura di misura, e sono presentati direttamente allo strumento, il calcolo basato su queste misurazioni fornirà il LOD/LOQ strumentale.

⁶ Altri sinonimi in uso includono 'limite di reporting', 'limite di determinazione' e 'limite di applicazione'.

⁷ C'è confusione riguardo alla terminologia connessa ai bianchi, per un'ulteriore discussione si veda il paragrafo 5.4.1.

Considerare lo scopo del metodo: Per metodi con uno scopo che include matrici molto differenti potrebbe essere necessario determinare separatamente lo scarto tipo per ogni matrice.

Assicurare la rappresentatività dell'esperimento: lo scarto tipo dovrebbe essere rappresentativo della prestazione del metodo durante l'utilizzo nel laboratorio, cioè lo scarto tipo deve essere calcolato basandosi sui risultati di prove in cui le analisi siano effettuate esattamente secondo l'intera procedura di misura documentata, includendo ogni fase di preparazione del campione. I valori utilizzati per calcolare lo scarto tipo s_0 , dovrebbero essere espressi nelle unità di misura specificate nella procedura.

Condizioni di misura: Lo scarto tipo è solitamente ottenuto in condizioni di ripetibilità e tale è la procedura descritta in questa sezione. Tuttavia, si può ottenere una stima più affidabile utilizzando condizioni di ripetibilità intermedia. Questo approccio è discusso ulteriormente nel paragrafo 6.2.5.

Numero di osservazioni: Il numero di replicati (m) dovrebbe essere sufficiente per ottenere una stima adeguata dello scarto tipo. Generalmente, si considerano necessari da 6 a 15 replicati; le procedure/protocolli di validazione spesso raccomandano 10 replicati (si veda il paragrafo 6.2.5.1).

Correzione nel caso si riportati la media di più replicati: In molte procedure di misura, il risultato riportato nell'uso *routinario* del metodo è la media di più replicati, in cui ogni replicato è ottenuto seguendo l'intera procedura di misura. In questo caso, lo scarto tipo di risultati singoli s_0 dovrebbe essere corretto dividendolo per la radice quadrata di n dove n è il numero di replicati considerati per il calcolo della media nell'uso corrente del metodo.

Tenere conto dell'effetto delle correzioni per il bianco: Se nella procedura di misura sono specificate correzioni per il bianco, è necessario prestarvi attenzione nel determinare lo scarto tipo utilizzato per calcolare il LOD e il LOQ. Se i risultati ottenuti durante lo studio di validazione sono stati tutti corretti per il medesimo valore di bianco – l'approccio raccomandato qui per semplicità – lo scarto tipo dei risultati sarà più piccolo di quello che si osserva nella pratica quando i risultati vengono corretti per diversi valori di bianco ottenuti in corse differenti.

In tale caso, s_0 dovrebbe essere corretto moltiplicando per

$$\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$$

in cui n è il numero di replicati utilizzati per calcolare il risultato (riportato come media) e ciascun replicato è ottenuto seguendo l'intera procedura di misura, e n_b è il numero di osservazioni del bianco utilizzate per calcolare la correzione per il bianco.

Si noti che, se si opera in condizioni di ripetibilità intermedia, i risultati saranno corretti per valori di bianco diversi, cosicché non è necessaria alcuna correzione dello scarto tipo (si veda il paragrafo 6.2.5).

L'Esempio 3 illustra questi calcoli e il diagramma di flusso nella Figura 2 riassume le correzioni richieste se il risultato è ottenuto come una media e per le correzioni per il bianco.

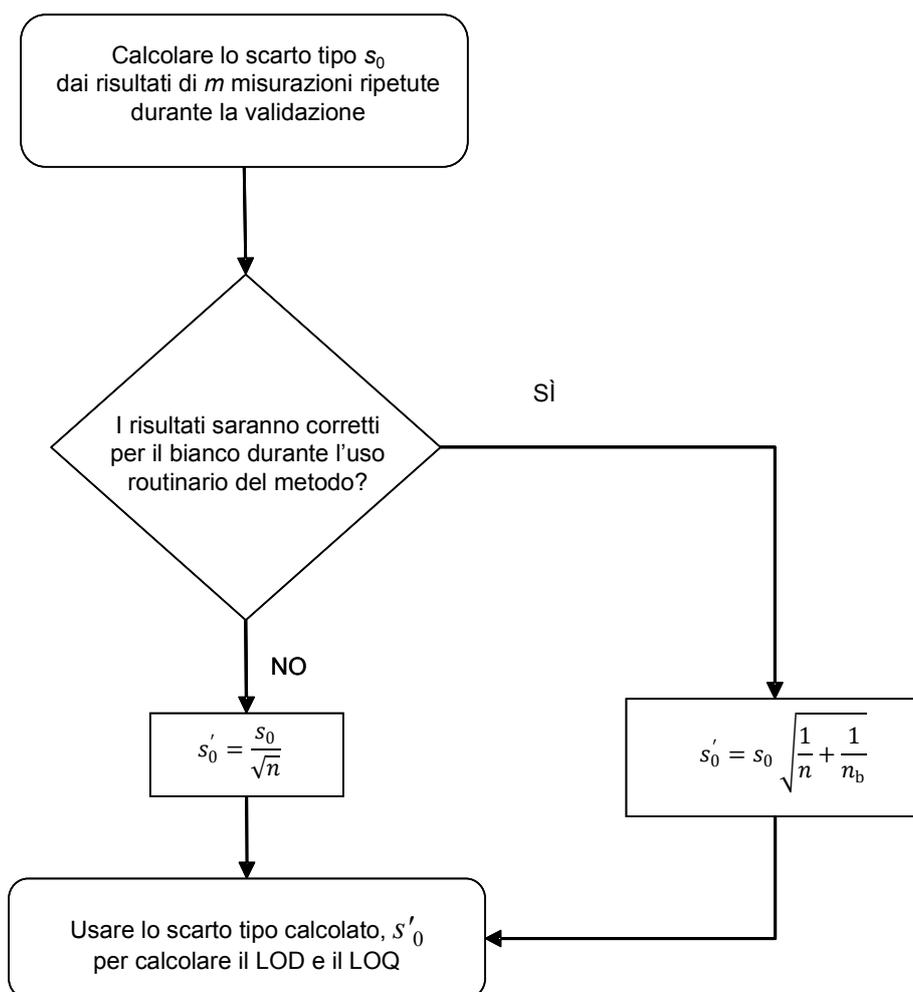
Esempio 3 - Un esperimento per la validazione è basato sull'analisi di un campione bianco. Si effettuano in condizioni di ripetibilità dieci (m) misurazioni indipendenti del campione bianco. I risultati hanno un valore medio di 2 mg/kg e uno scarto tipo s_0 di 1 mg/kg.

Caso 1 - La procedura di misura stabilisce che i campioni di prova debbano essere misurati una volta ($n=1$) e i risultati corretti per il risultato di un singolo campione bianco ($n_b=1$). In una serie di misurazioni, ciascuna corsa consiste in singoli replicati di campioni di routine e un campione bianco (n_b). Lo scarto tipo per calcolare LOD e LOQ è quindi, secondo la Figura 2, uguale a:

$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{1}} = 1\sqrt{2} = 1,4 \text{ mg/kg}$$

Caso 2 - La procedura di misura stabilisce che i campioni di prova debbano essere analizzati in duplicato ($n=2$) e che anche il campione di bianco debba essere analizzato in duplicato. In una serie di misurazioni, ogni corsa è costituita da duplicati ($n=2$) di campioni routinari e da due (n_b) campioni di bianco. La concentrazione ottenuta per i campioni di routine, viene corretta sottraendo il valore medio dei due campioni di bianco. Lo scarto tipo per calcolare LOD e LOQ è quindi, secondo la Figura 2, uguale a:

$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{2}} = 1 \text{ mg/kg}$$



s_0 è lo scarto tipo stimato di m risultati singoli a concentrazione nulla o vicina allo zero

s'_0 è lo scarto tipo utilizzato per calcolare LOD e LOQ

n è il numero di osservazioni ripetute mediate quando si riportano risultati, in cui ciascun replicato è ottenuto seguendo l'intera procedura di misura

n_b è il numero di osservazioni del bianco mediate quando si calcola la correzione del bianco secondo la procedura di misura

Figura 2. Calcolo dello scarto tipo, s'_0 , da utilizzare per la stima di LOD e LOQ. Il diagramma di flusso inizia con uno scarto tipo sperimentale, s_0 , calcolato a partire dai risultati di misurazioni ripetute in condizioni di ripetibilità su un campione prossimo a concentrazione nulla, sia senza correzione per il bianco sia con una correzione per il bianco applicata a tutti i risultati così come specificato dal metodo. Questa correzione per il bianco può essere basata su una singola osservazione del bianco o su una media di diverse osservazioni del bianco

6.2.3. Valutare il LOD

Per gli scopi della validazione di norma è sufficiente fornire un valore approssimato per il LOD, cioè al livello a cui la rivelazione dell'analita diventa problematica. Per questo scopo, di solito l'approccio '3s', mostrato nello Schema di riferimento rapido 2, è sufficiente.

Laddove il lavoro sia effettuato a supporto della conformità a una normativa o a una

specificata, è richiesto un approccio più rigoroso, in particolare che tenga conto dei gradi di libertà associati a s_0 . Ciò è descritto in dettaglio dalla IUPAC (49) e da varie altre fonti (50, 51). Laddove il valore critico e/o il LOD siano utilizzati per prendere decisioni, la precisione dovrebbe essere monitorata e i limiti potrebbero dover essere ricalcolati di tanto in tanto. Settori e/o normative diverse

potrebbero utilizzare approcci differenti per la stima del LOD. Quando si riporta un limite di rivelabilità, si raccomanda che venga dichiarata la convenzione utilizzata. In assenza

di una guida di settore sulla stima del LOD, gli approcci forniti nello Schema di riferimento rapido 2 possono essere usati come guida generale.

Schema di riferimento rapido 2 - Limite di rivelabilità (LOD)

Cosa fare	Quante volte	Cosa calcolare dai dati	Commenti
a) Misurazioni ripetute di campioni bianchi, cioè matrici che non contengano quantità rivelabili di analita. o Misurazioni ripetute di campioni di prova con basse concentrazioni di analita.	10	Calcolare lo scarto tipo s_0 dei risultati. Calcolare s'_0 da s_0 seguendo il diagramma di flusso nella Figura 2. Calcolare il LOD come $LOD = 3 \times s'_0$.	
b) Misurazioni ripetute di bianchi reagente. o Misurazioni ripetute di bianchi reagente addizionati con basse concentrazioni di analita.	10	Calcolare lo scarto tipo, s_0 , dei risultati. Calcolare s'_0 da s_0 seguendo il diagramma di flusso nella Figura 2. Calcolare il LOD come $LOD = 3 \times s'_0$.	L'approccio b) è accettabile nel caso in cui non sia possibile ottenere campioni bianchi o campioni di prova a basse concentrazioni. Qualora questi bianchi reagente non siano trattati seguendo l'intera procedura di misura e siano sottoposti direttamente allo strumento, il calcolo fornirà il LOD strumentale.
NOTE 1) Per alcune tecniche analitiche, ad esempio la cromatografia, potrebbe essere necessario aggiungere (<i>spiking</i>) il campione di prova contenente una concentrazione troppo bassa o il bianco reagente per ottenere uno scarto tipo diverso da zero. 2) L'intera procedura di misura dovrebbe essere ripetuta per ciascuna determinazione. 3) Lo scarto tipo è espresso in unità di concentrazione. Quando lo scarto tipo è espresso nelle unità del segnale, il LOD è la concentrazione corrispondente al segnale del bianco $y_B + 3 \times s'_0$. Un breve esempio di calcoli del LOD in questa situazione è riportato anche da Miller & Miller (5).			

6.2.4. Valutare il LOQ

Il LOQ è il più basso livello di analita che può essere determinato con una prestazione accettabile. Linee guida diverse interpretano 'prestazione accettabile' in vari modi includendovi la precisione, la precisione e la giustezza o l'incertezza di misura (52). Nella pratica, tuttavia, il LOQ è calcolato nella maggior parte delle convenzioni, come la concentrazione di analita corrispondente allo scarto tipo (s'_0) ottenuto ai livelli bassi di concentrazione, moltiplicato per un fattore k_Q .

Il valore IUPAC predefinito per k_Q è 10 (49) e se lo scarto tipo è approssimativamente costante a basse concentrazioni, questo moltiplicatore corrisponde a uno scarto tipo relativo (*Relative Standard Deviation*, RSD) del 10%. A volte, sono stati anche utilizzati moltiplicatori pari a 5 o a 6, che corrispondono rispettivamente a valori di RSD del 20% e del 17% (53, 54). Si vedano inoltre la Guida Eurachem (8) e lo Schema di riferimento rapido 3.

Schema di riferimento rapido 3 – Limite di quantificazione (LOQ)

Cosa fare	Quante volte	Cosa calcolare dai dati	Commenti
a) Misurazioni ripetute di campioni bianchi, cioè matrici che non contengano quantità rivelabili di analita. o Misurazioni ripetute di campioni di prova con basse concentrazioni di analita.	10	Calcolare lo scarto tipo, s_0 , dei risultati. Calcolare s'_0 da s_0 , seguendo il diagramma di flusso nella Figura 2. Calcolare il LOQ come $LOQ = k_Q \times s'_0$.	Il valore del moltiplicatore k_Q è solitamente 10, ma altri valori come 5 o 6 sono usati comunemente (in base a criteri di 'idoneità per lo scopo').
b) Misurazioni ripetute di bianchi reagente. o Misurazioni ripetute di bianchi reagente addizionati con basse concentrazioni di analita.	10	Calcolare lo scarto tipo s_0 , dei risultati. Calcolare s'_0 da s_0 seguendo il diagramma di flusso nella Figura 2. Calcolare il LOQ come $LOQ = k_Q \times s'_0$.	L'approccio b) è accettabile, quando non sia possibile ottenere campioni di bianchi o campioni di prova a bassa concentrazione. Qualora questi bianchi reagente non siano trattati seguendo l'intera procedura di misura e siano sottoposti direttamente allo strumento, il calcolo fornirà il LOQ strumentale.
NOTE			
<ol style="list-style-type: none"> 1) Per alcune tecniche analitiche, ad esempio la cromatografia, potrebbe essere necessario aggiungere (<i>spiking</i>) il campione di prova contenente una concentrazione troppo bassa o il bianco reagente per ottenere uno scarto tipo diverso da zero. 2) L'intera procedura di misura dovrebbe essere ripetuta per ogni determinazione. 3) Lo scarto tipo è espresso in unità di concentrazione. 			

6.2.5. Procedure alternative

Le sezioni precedenti hanno descritto un approccio generale per valutare il LOD e il LOQ, basati sullo scarto tipo dei risultati ottenuti, in condizioni di ripetibilità, a concentrazioni prossime allo zero. Questo approccio è ampiamente applicato ma ci sono procedure alternative descritte in altri documenti normativi e protocolli.

In alcuni casi, ad esempio quando i valori del bianco variano in modo significativo da un giorno all'altro, le condizioni di ripetibilità intermedia sono preferibili rispetto alle condizioni di ripetibilità. Ad esempio, se sono disponibili i risultati di controlli di qualità per campioni di prova a bassi livelli di concentrazione, lo scarto tipo di questi risultati può essere utilizzato per la stima di LOD e LOQ. Nel caso in cui lo scarto tipo utilizzato per calcolare il LOD e il LOQ sia ottenuto in condizioni di ripetibilità intermedia, non è necessario seguire quanto mostrato nella

Figura 2 per tenere conto della correzione per il bianco. Pertanto, lo scarto tipo sperimentale ottenuto dal controllo di qualità interno coincide con lo scarto tipo s'_0 , che si utilizza per calcolare il LOD e il LOQ. La norma ISO 11843-2 (46) descrive come si possa ottenere il LOD strumentale direttamente da una curva di taratura.

6.2.5.1. Affidabilità delle stime di LOD e LOQ

Si noti che, anche con i 10 replicati indicati nello Schema di riferimento rapido 2 e nello Schema di riferimento rapido 3, le stime di uno scarto tipo sono intrinsecamente variabili. Dunque, la stima di LOD/LOQ ottenuta durante la validazione dovrebbe essere presa come un valore indicativo. Ciò è sufficiente se si richiede una stima di LOD/LOQ semplicemente per dimostrare che le concentrazioni dei campioni sono ben al di sopra del LOD/LOQ. Nel caso in cui ci si aspetti che i campioni di prova contengano

basse concentrazioni dell'analita, il LOD/LOQ dovrebbe essere monitorato regolarmente.

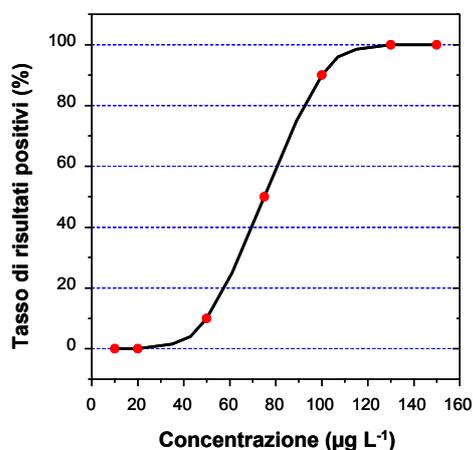
6.2.6. Capacità di rivelazione per l'analisi qualitativa

Un'analisi qualitativa (Appendice D) implica l'identificazione o la classificazione di sostanze ed è di fatto una risposta di tipo 'sì/no' rispetto a una data concentrazione 'soglia' di un analita (55). Per i metodi qualitativi, la precisione non può essere espressa come uno scarto tipo o uno scarto tipo relativo, ma potrebbe essere espressa come tassi [NdT: frazioni o percentuali] di risultati veri e falsi positivi o negativi [NdT: il tasso, ad esempio, di falsi positivi è la proporzione di tutti i campioni la cui concentrazione effettiva non supera la 'soglia' ma che, ciononostante, forniscono risultati positivi. Ciò può essere espresso come: numero

di risultati falsi positivi / (numero di risultati falsi positivi + numero risultati di veri negativi)].

In uno studio di validazione la concentrazione 'soglia' può essere determinata stabilendo i tassi di risultati falsi positivi e falsi negativi per una serie di livelli al di sotto e al di sopra della concentrazione 'soglia' attesa. La concentrazione 'soglia' si trova dove i tassi di risultati falsi negativi per concentrazioni al di sopra della 'soglia' sono bassi – con una probabilità definita, ad esempio del 5%. Durante la validazione si verifica il limite di soglia proposto, riportato nella procedura che documenta il metodo (si vedano l'Esempio 4 e lo Schema di riferimento rapido 4).

Esempio 4 - Determinazione della concentrazione 'soglia' per un metodo qualitativo con una 'soglia' dichiarata pari a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Sono state registrate dieci osservazioni per ciascun livello. È stata costruita una curva di risposta che riporta le frazioni (in %) di risultati positivi in funzione della concentrazione, da cui è stato possibile determinare, mediante controllo visivo, la concentrazione a cui la prova diventa inaffidabile. Con un criterio di < 5% per il tasso di risultati falsi negativi, la concentrazione 'soglia' è tra 100 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$.



C ($\mu\text{g L}^{-1}$)	N. di risultati positivi / N. di risultati negativi
150	10/0
130	10/0
100	9/1
75	5/5
50	1/9
20	0/10
10	0/10

Schema di riferimento rapido 4 - Limite di rivelabilità (LOD) per analisi qualitative

Cosa fare	Quante volte	Cosa calcolare/determinare dai dati
Misurare, in ordine casuale, campioni bianchi addizionati con l'analita in un intervallo di livelli di concentrazione.	10	Costruire una curva di risposta che riporti le percentuali di risultati positivi o negativi in funzione della concentrazione, da cui sarà possibile determinare, mediante controllo visivo, la concentrazione ('soglia') a cui la prova diventa inaffidabile.

6.3. Intervallo di misura

6.3.1. Definizione

L'intervallo di misura⁸ è l'intervallo all'interno del quale il metodo fornisce risultati con un'incertezza accettabile. L'estremo inferiore dell'intervallo di misura è definito dal limite di quantificazione (LOQ). L'estremo superiore dell'intervallo di misura è definito dalle concentrazioni alle quali si osservano anomalie significative nella sensibilità analitica. Un esempio è l'effetto di appiattimento che si osserva nella spettroscopia UV/VIS per alti valori di assorbanza.

6.3.2. Elementi da considerare nello studio per la validazione

L'intervallo di misura del metodo da validare dovrebbe essere dichiarato nel campo di applicazione della procedura documentata (si veda il punto A.5 dell'Appendice A). Durante la validazione è necessario confermare che il metodo può essere usato all'interno di tale intervallo. Per valutare l'intervallo di misura il laboratorio deve considerare sia la linearità del metodo che la procedura di taratura indicata nel metodo.

6.3.3. Intervallo di misura strumentale e del metodo

Molti metodi prevedono che il campione di prova ricevuto dal laboratorio (il campione di laboratorio) sia processato (digerito, sottoposto ad estrazione, diluito) prima di poter essere introdotto nello strumento di misura e che venga registrato un segnale di risposta. In tali casi si individuano due intervalli di misura. L'intervallo di misura del metodo, indicato nel campo di applicazione del metodo (si veda come esempio, il punto A.5 dell'Appendice A) si riferisce alla concentrazione nel campione di laboratorio ed è espresso nelle stesse unità, ad esempio, nel caso di un campione solido, in mg kg⁻¹. L'intervallo di misura strumentale è definito in termini di concentrazione di un campione di prova processato e presentato allo strumento per la misurazione (es. in mg L⁻¹ per

la soluzione ottenuta dopo l'estrazione del campione). Un esempio di intervallo di misura strumentale è indicato nella Figura 3A dove il segnale strumentale è riportato rispetto alla concentrazione dei campioni per la taratura. Nella Figura 3B è indicato invece un esempio di intervallo di misura del metodo dove le concentrazioni misurate nei campioni sono riportate rispetto ai loro valori noti. La concentrazione misurata è il risultato ottenuto applicando l'intera procedura di misura (inclusa qualsiasi fase di pretrattamento del campione prevista) e utilizzando lo strumento tarato secondo quanto indicato nel metodo scritto.

Durante la validazione dovrebbero essere valutati sia l'intervallo di misura strumentale che l'intervallo di misura del metodo. Di solito queste informazioni vengono ottenute durante la fase di sviluppo del metodo. In questi casi sarà sufficiente includere tali dati nel rapporto di validazione.

6.3.4. Valutazione dell'intervallo di misura strumentale

Tra il LOQ e l'estremo superiore dell'intervallo di misura strumentale la risposta dello strumento segue le regole di una relazione nota ad esempio, lineare, curvilinea, ecc.

Durante la validazione è necessario i) confermare tale relazione, ii) dimostrare che l'intervallo di misura strumentale sia compatibile con l'intervallo dichiarato nel campo di applicazione del metodo, iii) verificare che la procedura di taratura strumentale proposta (singolo punto, forcetta - *bracketing*, multi-punto) sia adeguata.

Per valutare l'intervallo di misura strumentale e confermarne l'idoneità per lo scopo occorre utilizzare campioni di taratura con concentrazioni che vanno oltre ($\pm 10\%$ o anche $\pm 20\%$) l'intervallo di concentrazione atteso e riportare i segnali in un grafico (si veda lo Schema di riferimento rapido 5, fase 1). Ad esempio, nel caso di un intervallo atteso tra 1 e 100 mg L⁻¹, si potrebbero utilizzare concentrazioni comprese tra 0,8 a 120 mg L⁻¹ ($\pm 20\%$).

Le concentrazioni scelte dovrebbero essere distribuite in maniera approssimativamente equidistante all'interno dell'intervallo di misura.

⁸ Il termine del VIM (7) è 'intervallo di misura' o 'campo di misura'.

La valutazione iniziale dell'intervallo di misura si effettua mediante una ispezione visiva della curva di risposta. La fase successiva è la conferma della relazione tra la concentrazione e la risposta strumentale attraverso l'esame dei parametri statistici della regressione e del diagramma dei residui per il modello scelto (es. lineare, quadratico) (si veda lo Schema di riferimento rapido 5, fase 2). La valutazione può anche includere test statistici

più sofisticati per misurare la 'bontà dell'adattamento' (56, 57). In base alla curva di risposta e ai relativi valori dei parametri statistici, ottenuti sull'intero intervallo di misura strumentale, l'analista può valutare se la procedura di taratura riportata nel metodo sia idonea per lo scopo previsto. La stima dell'intervallo di misura del metodo ne fornirà un'ulteriore valutazione.

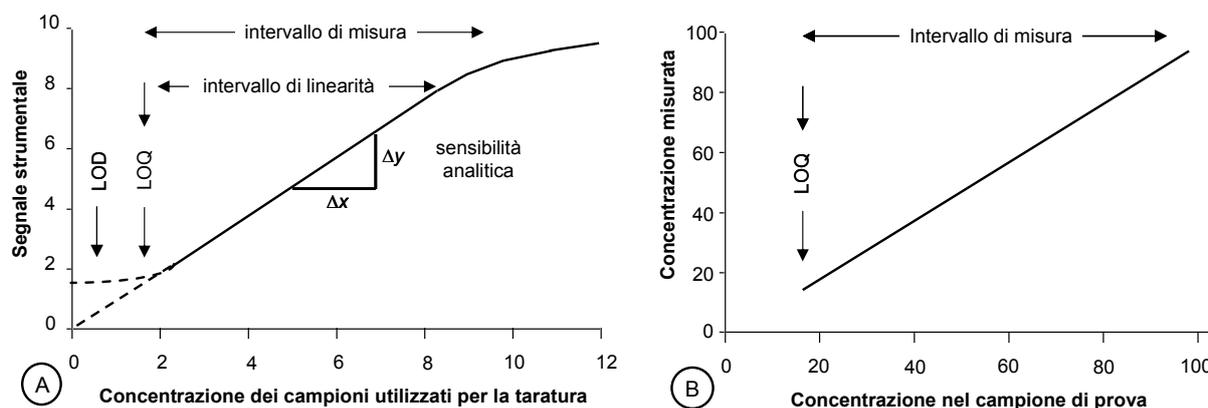


Figura 3. A) Esempio tipico di curva di risposta ottenuta con un metodo strumentale. Sono identificate le caratteristiche di prestazione 'intervallo di misura', 'intervallo di linearità', 'sensibilità analitica', 'LOD' e 'LOQ'. B) Esempio tipico di una curva ottenuta per una procedura di misura, dove le concentrazioni misurate nei campioni di prova sono riportate rispetto ai loro valori noti

6.3.5. Valutazione dell'intervallo di misura del metodo

Per valutare l'intervallo di misura del metodo:

1. dovrebbero essere disponibili campioni bianchi e campioni a concentrazione nota;
2. i campioni utilizzati dovrebbero essere trattati seguendo tutta la procedura di misura;
3. per quanto possibile, le concentrazioni dei campioni dovrebbero coprire l'intero intervallo di interesse;
4. lo strumento dovrebbe essere stato tarato secondo la procedura di taratura prevista.

Per ogni campione, si calcola il risultato di misura come descritto nella procedura (si veda lo Schema di riferimento rapido 5, fase 3). Questi valori (y) sono riportati in grafico rispetto alle concentrazioni note dei campioni (x), come nella Figura 3B. Una ispezione visiva del grafico, unitamente ai parametri

della regressione lineare e al relativo diagramma dei residui, consente di valutare l'intervallo di misura del metodo e la sua linearità.

Alla valutazione dell'intervallo di misura, si aggiungono le informazioni ottenute dagli studi della precisione e dello scostamento di misura (si vedano i paragrafi 6.5.2 e 6.6.2.1), se questi includono livelli di concentrazione distribuiti nell'intero intervallo di misura del metodo.

L'intervallo di misura del metodo deve essere definito per ogni matrice prevista nel campo di applicazione. Infatti, le interferenze dovute alla matrice possono influenzare la linearità della risposta e la resa di fasi di estrazione/recupero dell'analita può variare al variare della matrice del campione.

Schema di riferimento rapido 5 – Intervallo di misura e intervallo di linearità

Cosa fare	Quante volte	Cosa calcolare/determinare dai dati	Commenti
1) Analizzare i bianchi e i campioni per la taratura a 6-10 concentrazioni diverse distribuite in maniera approssimativamente equidistante lungo l'intervallo di interesse.	1	Riportare in grafico la risposta (asse y) verso la concentrazione (asse x). Esaminare visivamente il grafico e identificare l'intervallo di linearità approssimativo e i limiti superiore e inferiore dell'intervallo di misura strumentale. Passare alla fase 2).	Questo confermerà visivamente se l'intervallo di misura strumentale è lineare o meno. <i>Nota:</i> Quando il segnale non è direttamente proporzionale alla concentrazione, ad esempio, quando si lavora con il pH o con altri elettrodi iono-selettivi o con metodi immunometrici, prima di valutare la linearità è necessaria una trasformazione dei valori misurati.
2) Analizzare i bianchi e i campioni per la taratura, a 6-10 concentrazioni diverse distribuite in maniera approssimativamente equidistante lungo l'intervallo di linearità, ciascuno per 2-3 volte.	1	Riportare in grafico la risposta (asse y) verso la concentrazione (asse x). Esaminare visivamente il grafico per identificare eventuali dati aberranti (outliers) che potrebbero non essere messi in evidenza dall'esame dei soli parametri della regressione. Calcolare i parametri del tipo di regressione appropriata. Calcolare e riportare in grafico i residui (differenza tra il valore osservato e il valore predetto dalla retta di regressione, per ogni valore x). La linearità è confermata se i residui si distribuiscono casualmente intorno allo zero. Andamenti sistematici indicano assenza di linearità o un cambiamento nella varianza associato con il livello di concentrazione.	Questa fase è necessaria per verificare l'ipotesi che l'intervallo di misura sia effettivamente lineare, in particolare quando il metodo prevede una taratura a due punti. Se lo scarto tipo è proporzionale alla concentrazione, è opportuno valutare la possibilità di utilizzare una regressione lineare pesata invece di una semplice regressione lineare non pesata. È rischioso rimuovere un dato aberrante (<i>outlier</i>) senza averlo prima controllato mediante ulteriori misure a concentrazioni vicine. In alcune circostanze, una funzione non lineare potrebbe fornire la migliore approssimazione per la relazione tra i dati ottenuti per la taratura strumentale. In tal caso il numero di campioni per la taratura deve essere aumentato. Funzioni di grado più alto della quadratica non sono in genere consigliate.
3) Tarare lo strumento secondo la procedura di taratura prevista. Analizzare, come descritto in procedura, il bianco e i materiali di riferimento oppure i campioni bianchi fortificati, a 6-10 livelli di concentrazione distribuiti in maniera approssimativamente equidistante lungo l'intervallo di interesse, ciascuno per 2-3 volte.	1	Riportare in grafico la concentrazione misurata (asse y) verso la concentrazione dei campioni di prova (asse x). Esaminare visivamente il grafico per identificare l'intervallo di linearità approssimativo e i limiti superiore e inferiore dell'intervallo di misura. Calcolare i parametri del tipo di regressione appropriata. Calcolare e riportare in grafico i residui (differenza tra il valore osservato e il valore predetto dalla retta di regressione, per ogni valore x). La linearità è confermata se i residui si distribuiscono casualmente intorno allo zero. Andamenti sistematici indicano assenza di linearità.	Questa fase è necessaria per valutare se l'intervallo strumentale proposto e la procedura di taratura sono adatti allo scopo. Se sono disponibili dati derivanti da studi dello scostamento di misura e della precisione che coprono l'intervallo di interesse, potrebbe non essere richiesto uno studio separato dell'intervallo di misura del metodo.

6.4. Sensibilità analitica

6.4.1. Definizione

La sensibilità analitica è il cambiamento della risposta dello strumento in corrispondenza del cambiamento della grandezza misurata (es. la concentrazione di un analita), cioè, il gradiente della curva di risposta (7, 18). La dizione ‘sensibilità analitica’ è raccomandata per evitare confusione con il concetto di ‘sensibilità diagnostica’ utilizzato in medicina di laboratorio (43). Il termine ‘sensibilità’ è alle volte utilizzato per riferirsi al limite di rivelabilità ma tale uso è scoraggiato dal VIM (7).

6.4.2. Applicazioni

La sensibilità analitica non è una caratteristica prestazionale particolarmente importante. Ci sono, tuttavia almeno due applicazioni utili:

1. Molti elettrodi iono-selettivi mostrano un comportamento Nernstiano, ovvero la loro sensibilità analitica teorica è nota. Perciò ci si aspetta, ad esempio, che, quando un elettrodo di vetro funziona correttamente il segnale vari di 59 mV per unità di pH.
2. Nei sistemi di misura spettrofotometrica l'assorbanza può essere predetta dalla legge di Lambert-Beer. Questo principio

può essere sfruttato per il controllo delle prestazioni dello strumento e in effetti alcuni metodi normati prevedono questo tipo di verifiche (58).

6.5. Giustezza

6.5.1. Terminologia per descrivere la qualità della misura

In questa Guida, la qualità dei risultati ottenuti con un metodo viene descritta mediante tre caratteristiche prestazionali, tra loro in relazione, ‘giustezza’, ‘precisione’ ed ‘incertezza’.

Tuttavia anche altri concetti vengono frequentemente utilizzati, quali tipi di errore (casuale, sistematico, grossolano), accuratezza (giustezza e precisione), e incertezza. Alcuni di questi concetti hanno un significato qualitativo, altri quantitativo. Nel tempo, termini e definizioni sono cambiati e sono stati introdotti nuovi termini; in aggiunta, differenti settori applicativi tuttora favoriscono termini diversi. Tutto questo può creare una gran confusione.

La Figura 4 illustra i legami tra i termini [NdT: utilizzati per descrivere la qualità dei risultati analitici]. Ulteriori dettagli sono forniti nel VIM (7) e nella Guida Eurachem sulla terminologia (8).

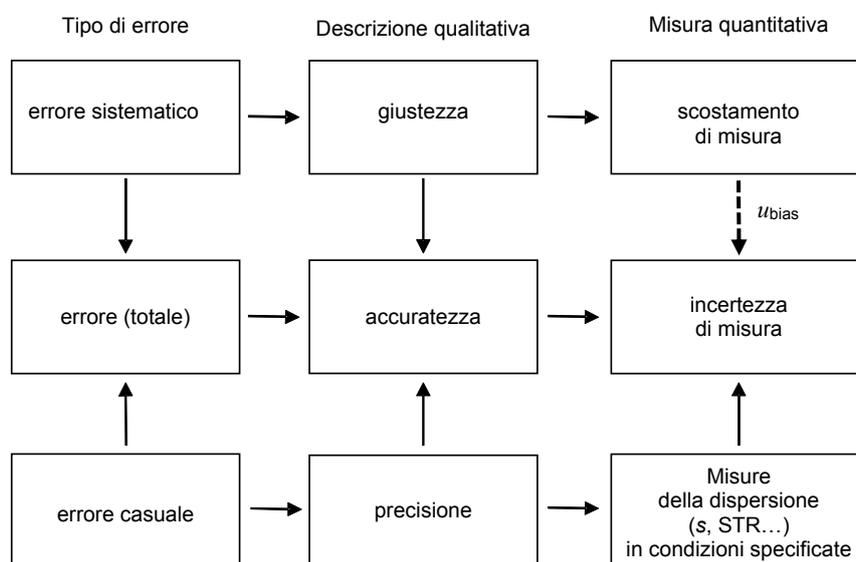


Figura 4. Illustrazione delle relazioni tra alcuni concetti fondamentali utilizzati nella descrizione della qualità dei risultati di misura (modificata da Menditto *et al.*) (59). Nella GUM si assume che gli scostamenti di misura noti vengano corretti e che sia l'incertezza della correzione per lo scostamento di misura u_{bias} ad essere inclusa nel bilancio finale dell'incertezza. Questo è il significato della freccia tratteggiata sotto la casella 'scostamento'. I prerequisiti di qualsiasi considerazione sui concetti di accuratezza e incertezza sono che le misurazioni siano effettuate in accordo a procedure documentate e che non si tenga conto degli effetti degli 'errori grossolani' (sbagli)

L'accuratezza di misura esprime il grado di concordanza tra un singolo valore misurato e il valore vero del misurando (29, 48) (per la definizione esatta si veda il VIM, sezione 2.13). Con la validazione di un metodo si cerca di investigare l'accuratezza dei risultati valutando gli effetti, sia sistematici che casuali, sui singoli risultati. Pertanto per valutare l'accuratezza, si studiano di solito le componenti: 'giustezza' e 'precisione'. In aggiunta, la stima dell'incertezza di misura è sempre più spesso utilizzata per fornire un'indicazione dell'accuratezza, con un solo numero. La valutazione della giustezza è descritta di seguito, mentre quella della precisione è discussa nel paragrafo 6.6 e la stima dell'incertezza è riassunta nel paragrafo 6.7.

Il concetto di 'giustezza' di misura esprime quanto la media di un numero infinito di risultati (prodotti dal metodo) sia vicina ad un valore di riferimento. Dato che non è possibile produrre un numero infinito di risultati, la giustezza non può essere misurata direttamente. Tuttavia se ne può fare una stima pratica, di norma espressa quantitativamente in termini di 'scostamento di misura'.

6.5.2. Determinazione dello scostamento di misura

Una determinazione pratica dello scostamento di misura si basa sul confronto tra la media dei risultati (\bar{x}) ottenuti con il metodo proposto e un idoneo valore di riferimento (x_{ref})⁹.

Sono possibili tre approcci generali:

- analisi di materiali di riferimento;
- prove di recupero utilizzando campioni fortificati;
- confronto con risultati ottenuti con un altro metodo – si veda lo Schema di riferimento rapido 6.

Lo studio dello scostamento di misura dovrebbe coprire il campo di applicazione del metodo e potrebbe pertanto richiedere l'analisi di differenti tipi di campioni e/o differenti livelli di analiti. A tal fine può essere necessaria una combinazione di questi approcci.

Lo scostamento di misura può essere espresso in termini assoluti

$$b = \bar{x} - x_{\text{ref}} \quad (\text{Eq. 1})$$

o relativi in percento

$$b (\%) = \frac{\bar{x} - x_{\text{ref}}}{x_{\text{ref}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

o come recupero relativo della fortificazione

$$R' (\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{spike}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

dove \bar{x}' è il valore medio del campione fortificato e x_{spike} è la quantità di analita aggiunta.

In alcuni settori analitici è anche utilizzato il recupero relativo ('recupero apparente') in percento (60).

$$R (\%) = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Per determinare lo scostamento di misura utilizzando un MR si determinano la media e lo scarto tipo di una serie di misure replicate e i valori ottenuti vengono confrontati con il valore assegnato all'MR per quella grandezza. L'MR ideale è un materiale di riferimento certificato in matrice con valori assegnati vicini a quelli dei campioni di prova di interesse. È generalmente accettato che gli MRC forniscano valori riferibili (61, 62). È anche importante ricordare che un particolare MR dovrebbe essere usato per un solo scopo durante lo studio di validazione. Ad esempio, un MR utilizzato per la taratura non deve essere utilizzato anche per la valutazione dello scostamento di misura.

Rispetto alla vasta gamma di tipologie di campioni e di analiti con i quali hanno a che fare i laboratori, la disponibilità di MR è limitata, tuttavia è importante che il materiale scelto sia 'idoneo all'uso'. Potrebbe essere necessario prendere in considerazione come sia stato caratterizzato l'MR, ad esempio se la procedura di preparazione del campione utilizzata durante la caratterizzazione del materiale non abbia inteso fornire la quantità estratta in condizioni specificate invece della concentrazione totale dell'analita. Nell'ambito delle attività di controllo, dovrebbe essere utilizzato un materiale certificato adatto, idealmente della stessa matrice se disponibile. Per metodi utilizzati nel lungo periodo per scopi aziendali interni, il controllo dello scostamento di misura può essere effettuato utilizzando un materiale interno stabile, ma nella valutazione iniziale si dovrebbe comunque aver utilizzato un MRC.

⁹ Talvolta il valore di riferimento è indicato come 'valore vero' o 'valore convenzionale' della grandezza.

In mancanza di MR adatti per ottenere un'indicazione del probabile livello di scostamento di misura possono essere utilizzate prove di recupero (esperimenti con fortificazione). Gli analiti possono essere presenti nel campione sotto varie forme e talvolta solo alcune di esse sono di interesse per l'analista. Il metodo potrebbe quindi essere progettato appositamente per determinare solo una particolare forma dell'analita. Se questo non è il caso, una carenza nella determinazione di parte o di tutto l'analita presente può indicare un problema intrinseco al metodo di prova. Per questo motivo è necessario valutare l'efficienza del metodo nel rilevare tutto l'analita presente (60, 63).

Poiché di solito la quantità di analita presente in un campione non è nota, è difficile essere certi dell'efficienza del procedimento di estrazione dalla matrice. Un modo per valutarla è fortificare aliquote di campione a varie concentrazioni di analita, eseguire le estrazioni e misurare la concentrazione dell'analita negli estratti. Il problema intrinseco in queste modalità operative è che l'analita introdotto in questo modo probabilmente non sarà legato così fortemente tanto quanto lo sarebbe stato se fosse stato naturalmente presente nell'aliquota analizzata e quindi questa tecnica può dare un'impressione irrealistica di alta efficienza del procedimento estrattivo.

È anche possibile valutare lo scostamento di misura confrontando i risultati del metodo proposto con quelli ottenuti con un altro

metodo. Esistono due possibilità per il metodo alternativo da utilizzare: un metodo di riferimento oppure un metodo utilizzato correntemente nelle attività di routine del laboratorio. Si intende che il metodo di riferimento fornisca un 'valore accettato di riferimento' per la proprietà misurata e che darà generalmente risultati con una incertezza più piccola di quella del metodo proposto.

Un particolare tipo di metodo di riferimento è un metodo primario¹⁰. Il secondo caso si presenta quando lo scopo della validazione è dimostrare che il metodo proposto dia risultati che sono equivalenti a quelli ottenuti con il metodo esistente. In tal caso l'obiettivo è stabilire che non c'è uno scostamento significativo rispetto ai risultati ottenuti con il metodo esistente (sebbene tale metodo potrebbe essere di per sé affetto da scostamento).

In entrambi i casi vengono confrontati i risultati del metodo proposto e del metodo alternativo, per lo stesso campione o serie di campioni. Il/i campione/i possono essere RM prodotti in laboratorio o semplicemente campioni di prova. Il vantaggio di questo approccio è che i materiali non devono essere necessariamente dei MRC in quanto il metodo alternativo fornisce il valore di riferimento. Quindi il metodo potrà essere provato mediante l'uso di campioni 'reali' che sono rappresentativi di quelli che saranno analizzati routinariamente dal laboratorio.

¹⁰ 'Metodo primario': un metodo che possiede le più elevate qualità metrologiche, il cui svolgimento può essere completamente descritto e compreso e per il quale le incertezze sono espresse in unità SI. Un metodo primario diretto misura il valore di un'incognita senza far riferimento ad un campione di misura della stessa grandezza. Un metodo primario di rapporto misura il valore di un rapporto tra un'incognita e un campione della stessa grandezza; lo svolgimento di questo metodo deve essere completamente descritto da un'equazione di misura (CCQM) [NdT: la definizione è stata aggiornata con quella del Verbale della 4a sessione del CCQM, febbraio 1995]. Il termine corrispondente del VIM (7) (si veda il paragrafo 2.8) è 'procedura di misura di riferimento primaria'.

Schema di riferimento rapido 6 - Giustizia

Cosa fare	Quante volte	Quali calcoli effettuare	Commenti
a) Analizzare l'MR utilizzando il metodo proposto	10	<p>Confrontare il valore medio, \bar{x} con il valore di riferimento x_{ref} dell'MR. Calcolare lo scostamento, b, lo scostamento relativo percentuale, b (%) o il recupero relativo percentuale ('recupero apparente').</p> $b = \bar{x} - x_{\text{ref}}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{\text{ref}}}{x_{\text{ref}}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100$	Fornisce una misura dello scostamento che tiene conto degli effetti dovuti sia allo scostamento del metodo che a quello del laboratorio.
b) Analizzare campioni bianchi [NdT: si veda il paragrafo 5.4.1] o campioni di prova e le loro corrispondenti aliquote fortificate con l'analita di interesse a varie concentrazioni.	10	<p>Confrontare la differenza tra il valore medio fortificato \bar{x}' e il valore medio \bar{x} con la concentrazione aggiunta x_{spike}. Calcolare il recupero relativo percentuale dell'aggiunta R' (%).</p> $R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{spike}}} \times 100$	<p>Per valutare il recupero netto della quantità aggiunta, le aliquote fortificate devono essere confrontate con aliquote non fortificate dello stesso campione (campione bianco o campione di prova).</p> <p>Di solito la stima del recupero ottenuta in questo modo sarà migliore rispetto a quanto avviene nell'analisi di campioni di prova, nei quali l'analita è legato più fortemente.</p>
c) Analizzare l'MR o il campione di prova utilizzando il metodo proposto e il metodo alternativo	10	<p>Confrontare il valore medio, \bar{x} con il valore medio \bar{x}_{ref} delle misurazioni eseguite con il metodo alternativo. Calcolare lo scostamento b o lo scostamento relativo percentuale b (%) o il recupero relativo percentuale ('recupero apparente') R' (%).</p> $b = \bar{x} - \bar{x}_{\text{ref}}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - \bar{x}_{\text{ref}}}{\bar{x}_{\text{ref}}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100$	<p>Fornisce una misura dello scostamento rispetto al metodo alternativo. Il metodo alternativo potrebbe essere un metodo di riferimento o, se l'intenzione è sostituire un metodo con un altro ed è necessario dimostrare l'equivalenza delle prestazioni, un metodo correntemente in uso in laboratorio.</p> <p>Il metodo alternativo potrebbe esso stesso essere affetto da uno scostamento, in tal caso l'esperimento non fornirà una misura assoluta della giustizia.</p>

Lo scostamento può variare con la matrice e i livelli di concentrazione, il che significa che il numero di matrici e dei livelli di concentrazioni da esaminare deve essere dichiarato nel piano di validazione.

6.5.3. Interpretazione dello scostamento delle misure

La Figura 5 mostra due componenti dello scostamento, denominate nel testo 'scostamento del metodo' e 'scostamento del laboratorio'.

Lo scostamento del metodo deriva da errori sistematici inerenti al metodo,

indipendentemente dal laboratorio che lo utilizza. Lo scostamento del laboratorio deriva da ulteriori errori sistematici, specifici del laboratorio e della sua interpretazione del metodo. Un laboratorio da solo può stimare soltanto lo scostamento combinato (totale) che deriva da queste due fonti. Ad ogni modo, nel verificare lo scostamento, è importante essere consapevoli delle convenzioni vigenti per lo

scopo specifico del metodo. Per esempio, per alcune applicazioni in campo alimentare, i limiti di legge sono stabiliti in base ai risultati ottenuti con quello specifico metodo empirico ('definito operativamente') normato. Lo scostamento del metodo per procedure di misura 'empiriche' è zero per definizione. Lo scostamento che deriva unicamente da quel metodo particolare (si veda la Figura 5) deve essere quindi ignorato, e la preoccupazione principale deve essere la comparabilità metrologica con altri laboratori che usano lo stesso metodo. In questa situazione, idealmente il laboratorio dovrebbe determinare lo scostamento utilizzando un materiale di riferimento certificato con quel particolare metodo ufficiale o empirico in esame, nel qual caso si applicano le consuete linee guida per la verifica e l'interpretazione dello scostamento. Quando non sono disponibili tali materiali, o per aggiungere ulteriori informazioni, il laboratorio può utilizzare materiali alternativi, ma in tal caso, quando interpreta i risultati, dovrebbe prestare attenzione a considerare tutte le differenze conosciute tra il metodo oggetto di studio e il(i) metodo(i) usato(i) per ottenere il valore di riferimento.

Per soddisfare un particolare requisito analitico, lo stesso analita può essere misurato utilizzando differenti strumenti di misura in diversi siti all'interno della stessa

organizzazione. In questo caso, si osservano le numerose e complesse fonti di scostamento che hanno origine all'interno della stessa organizzazione. In questa comune e complessa situazione, l'organizzazione può stabilire procedure per stimare un'incertezza rappresentativa che includa, per ogni applicazione, gli effetti derivanti da tutti i siti/strumenti. Queste procedure dovrebbero utilizzare preferibilmente materiali che abbiano le stesse proprietà, inclusa la matrice, dei campioni che si intendono sottoporre a misurazione. L'analisi delle componenti della varianza può essere utilizzata per identificare le cause principali di variazione che contribuiscono all'incertezza di misura complessiva, consentendo azioni successive per ridurre le differenze all'interno dell'organizzazione.

Per la maggior parte degli scopi, tuttavia, l'accettabilità dello scostamento deve essere decisa sulla base dello scostamento complessivo determinato mediante appropriati MR, materiali addizionati o metodi di riferimento, tenendo in considerazione la precisione del metodo, le incertezze nei valori di riferimento e l'accuratezza richiesta per l'uso finale. A questo scopo si raccomanda l'impiego di test di significatività statistica (64, 65).

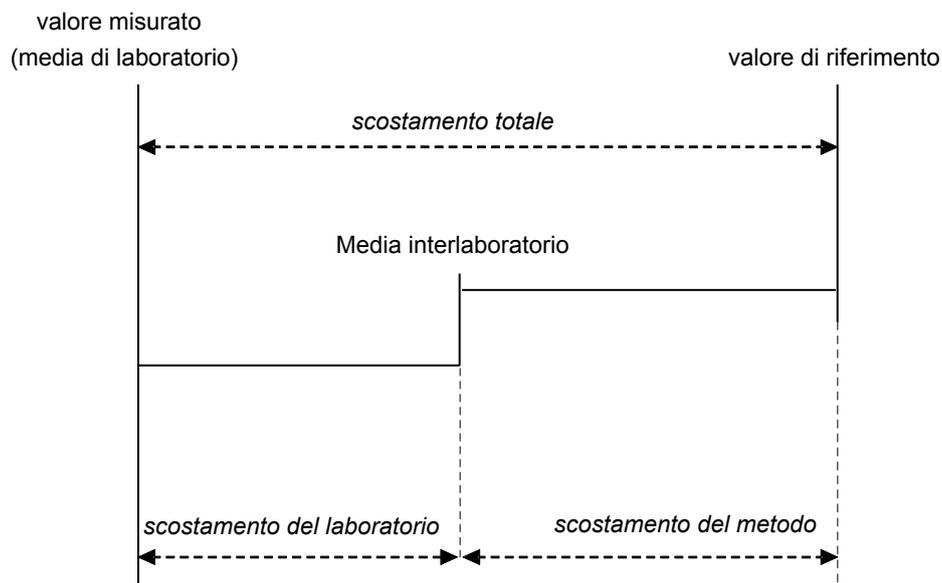


Figura 5. Lo scostamento totale misurato è composto dallo scostamento del metodo e dallo scostamento del laboratorio. Nota: lo scostamento del laboratorio e del metodo così come sono illustrati in questa figura, agiscono nella stessa direzione. In realtà non è sempre così

6.6. Precisione

6.6.1. Ripetizione

La ripetizione è essenziale per ottenere stime affidabili di caratteristiche di prestazione del metodo quali la precisione e lo scostamento. Gli esperimenti basati su analisi in replicato devono essere pianificati in modo da tenere conto di tutte le variazioni nelle condizioni operative che ci si aspetta possano verificarsi durante l'uso del metodo nella routine. Lo scopo dovrebbe essere quello di determinare la variabilità tipica e non la variabilità minima.

6.6.2. Condizioni di precisione

La precisione (precisione di misura) è una misura di quanto sono vicini i risultati tra loro (7, 29). È solitamente espressa da parametri statistici che descrivono la dispersione dei risultati, in genere lo scarto tipo (o lo scarto tipo relativo), calcolato dai risultati ottenuti dall'esecuzione di misurazioni ripetute su un materiale idoneo in condizioni specificate. La decisione sulle 'condizioni specificate' è un aspetto importante per la valutazione della precisione di misura – le condizioni determinano il tipo di stima della precisione ottenuto.

'Ripetibilità di misura' e 'riproducibilità di misura' rappresentano le due misure estreme della precisione che si possono ottenere. La documentazione di metodi normati (es. dalla ISO) include di solito i dati sia di ripetibilità sia di riproducibilità, dove applicabile.

La ripetibilità, che ci si aspetta fornisca la variazione più piccola nei risultati, è una misura della variabilità nei risultati quando una misurazione è condotta da un singolo analista utilizzando la stessa strumentazione in un breve intervallo di tempo.¹¹

La riproducibilità, che ci si aspetta fornisca la variazione più grande nei risultati, è una misura della variabilità nei risultati fra laboratori.¹²

Fra questi due estremi, la 'ripetibilità intermedia (di misura)' fornisce una stima della variazione nei risultati quando le misurazioni sono eseguite da un solo

laboratorio ma in condizioni che variano maggiormente rispetto alle condizioni di ripetibilità. Le condizioni esatte studiate dovrebbero essere dichiarate caso per caso. Lo scopo è di ottenere una stima della precisione che riflette tutte le fonti di variazione che si presenteranno in un singolo laboratorio in condizioni di routine (analisti diversi, intervallo di tempo esteso, attrezzature o apparecchiature diverse, ecc.).¹³

6.6.2.1. Stima della precisione – aspetti generali

Generalmente la precisione dipende dalla concentrazione dell'analita e dovrebbe quindi essere determinata per un certo numero di concentrazioni su tutto l'intervallo di interesse. Ciò potrebbe includere una particolare concentrazione di interesse (come, ad esempio, un limite di legge) più le concentrazioni ai limiti dell'intervallo di misura. Se pertinente, dovrebbe essere stabilita la relazione fra la precisione e la concentrazione dell'analita. Nei casi in cui la concentrazione misurata è ben al di sopra del limite di rivelabilità, si trova spesso che la precisione è proporzionale alla concentrazione dell'analita. In questi casi può essere più appropriato esprimere la precisione come scarto tipo relativo poiché questo è approssimativamente costante in tutto l'intervallo di interesse.

Per i metodi qualitativi, la precisione non può essere espressa come scarto tipo o scarto tipo relativo, ma può essere espressa come tassi [NdT: frazioni o percentuali] di risultati veri e falsi positivi (o veri e falsi negativi) (55) (si veda il paragrafo 6.2.6).

La valutazione della precisione richiede un numero sufficiente di misure replicate eseguite su materiali idonei. I materiali dovrebbero essere rappresentativi dei campioni di prova in termini di matrice, concentrazione dell'analita, omogeneità e stabilità, ma non è necessario che siano MRC. I replicati dovrebbero anche essere indipendenti, cioè, si dovrebbe ripetere l'intero processo di misura, incluso ogni passaggio del processo di preparazione. Il numero minimo di replicati specificato in protocolli diversi varia, ma è tipicamente compreso tra 6 e 15 per ogni materiale utilizzato nello studio.

¹¹ La ripetibilità è a volte denominata precisione 'nella corsa' o 'nella serie'.

¹² Nella validazione la riproducibilità si riferisce alla variazione tra laboratori che usano lo stesso metodo. La riproducibilità si può anche riferire a variazioni osservate fra laboratori che utilizzano metodi diversi ma che intendono misurare la stessa grandezza (7).

¹³ La ripetibilità intermedia è a volte denominata 'riproducibilità intra-laboratorio', 'variazione fra le corse' o 'fra le serie'.

Si deve tener presente che è difficile stimare uno scarto tipo affidabile da serie di dati con pochi replicati. Se accettabile, i valori calcolati da diverse piccole serie di misure replicate possono essere combinati (cumulati) per ottenere stime con sufficienti gradi di libertà.

Alcuni disegni sperimentali, basati sull'analisi della varianza (ANOVA), sono un modo efficiente per ottenere stime della ripetibilità e della ripetibilità intermedia con un numero appropriato di gradi di libertà (si vedano il paragrafo 6.6.4 e l'Appendice C per ulteriori spiegazioni su questo approccio). Si veda lo Schema di riferimento rapido 7 per informazioni sugli esperimenti per valutare la precisione.

6.6.3. Limiti di precisione

È utile calcolare un 'limite di precisione' a partire dallo scarto tipo s (29, 48). Questo permette all'analista di decidere se ci sia una differenza significativa, ad uno specificato livello di fiducia, fra i risultati di analisi in duplicato del campione ottenuti in condizioni specificate. Il limite di ripetibilità (r) è calcolato come segue:

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r \quad (\text{Eq. 5})$$

dove il fattore $\sqrt{2}$ riflette la differenza fra le due misurazioni, t è il valore della t di Student a due code per un numero specificato di gradi di libertà (che si riferisce alla stima di s_r) e al livello di fiducia richiesto. Per valori di gradi di libertà relativamente grandi, $t \approx 2$ al livello di fiducia del 95%, quindi il limite di ripetibilità è spesso approssimato a:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (\text{Eq. 6})$$

I limiti della ripetibilità intermedia e della riproducibilità (R) sono calcolati in modo simile, sostituendo s_r con s_I e s_R , rispettivamente.

La documentazione dei metodi normati (es. dalla ISO) include di solito i dati dei limiti sia di ripetibilità sia di riproducibilità ove applicabile.

6.6.4. Determinazione simultanea della ripetibilità e della ripetibilità intermedia

Approcci per la determinazione simultanea della ripetibilità e della ripetibilità intermedia sono descritti nella ISO 5725-3 (29). In aggiunta, anche un modello descritto dalla IUPAC (12) offre la possibilità di determinare ripetibilità e ripetibilità intermedia da un unico studio. Aliquote del materiale scelto per la prova vengono analizzate in replicato in condizioni di ripetibilità in un certo numero di corse analitiche differenti, variando al massimo possibile le condizioni tra le serie analitiche (giorni diversi, analisti diversi, strumentazione diversa, ecc.). Con il test ANOVA a una via (5, 6), la ripetibilità può essere calcolata dalla varianza all'interno del gruppo, mentre la ripetibilità intermedia è ottenuta come la radice quadrata della somma delle varianze all'interno del gruppo e fra i gruppi. Questo tipo di modello può fornire un modo efficiente per ottenere gradi di libertà sufficienti per le stime della ripetibilità e della precisione tra i gruppi. Ad esempio, 8 gruppi di 2 replicati forniscono 8 e 7 gradi di libertà per la stima della ripetibilità e della precisione tra le corse, rispettivamente. Si veda l'Appendice C per ulteriori informazioni.

Schema di riferimento rapido 7 – Ripetibilità, ripetibilità intermedia e riproducibilità

Cosa fare	Quante volte	Cosa calcolare / determinare dai dati	Commenti
Misurare campioni a varie concentrazioni lungo tutto l'intervallo di lavoro (MR, campioni di prova o campioni bianchi [NdT: si veda il paragrafo 5.4.1] addizionati). Ripetibilità e ripetibilità intermedia possono essere determinate da studi separati (si vedano i punti a) e b) seguenti) o simultaneamente in uno studio singolo (si veda il punto c) seguente).			
a) Stesso analista e strumentazione, stesso laboratorio, breve periodo di tempo.	6-15 replicati per ogni materiale.	Determinare lo scarto tipo (s) dei risultati per ogni materiale.	Stime dello scarto tipo di ripetibilità s_r per ogni materiale. ^a
b) Diversi operatori e strumentazione, stesso laboratorio, periodo di tempo esteso.	6-15 replicati per ogni materiale.	Determinare lo scarto tipo (s) dei risultati per ogni materiale.	Stime dello scarto tipo di ripetibilità intermedia s_i per ogni materiale.
c) Diversi operatori e strumentazione, stesso laboratorio, periodo di tempo esteso.	6-15 gruppi di misurazioni in duplicato ^b ottenute in condizioni di ripetibilità in diversi giorni/strumentazioni per ogni materiale.	Calcolare lo scarto tipo di ripetibilità dai risultati ANOVA per ogni materiale. Calcolare lo scarto tipo tra i gruppi mediante ANOVA e combinarlo con lo scarto tipo di ripetibilità per ogni materiale.	Stime dello scarto tipo di ripetibilità s_r per ogni materiale. Stime dello scarto tipo della ripetibilità intermedia s_i per ogni materiale.
d) Diversi operatori e strumentazione, diversi laboratori, periodo di tempo esteso.	6-15 gruppi di misurazioni in duplicato ^b ottenute in condizioni di ripetibilità in diversi laboratori per ogni materiale.	Calcolare lo scarto tipo di ripetibilità dai risultati ANOVA per ogni materiale. Calcolare lo scarto tipo inter-laboratorio dai risultati ANOVA e combinarlo con lo scarto tipo di ripetibilità per ogni materiale.	Stime dello scarto tipo di ripetibilità s_r per ogni materiale. Stime dello scarto tipo di riproducibilità s_R per ogni materiale. Per questo caso è necessario un confronto inter-laboratorio speciale ('studio collaborativo').
^a Uno scarto tipo di ripetibilità può essere stimato cumulando piccole serie di dati, ad esempio $n = 2$, da giorni diversi. ^b Misure in duplicato all'interno di ogni gruppo forniranno un numero bilanciato di gradi di libertà per le stime degli scarti tipo nel gruppo e tra gruppi. Aumentando il numero di replicati per gruppo aumenterà il numero di gradi di libertà associati con la stima della ripetibilità.			

6.7. Incertezza di misura

Una discussione completa riguardo l'incertezza (di misura) esula dallo scopo di questa guida ma informazioni dettagliate possono essere trovate altrove (21, 22). L'incertezza è un intervallo associato ad un risultato di misura che esprime l'intervallo dei valori che può essere ragionevolmente

attribuito alla grandezza sottoposta a misura. Una valutazione dell'incertezza dovrebbe prendere in considerazione 'tutti gli effetti riconosciuti' che hanno influenza sul risultato. Le incertezze associate a ciascun effetto vengono combinate secondo procedure ben note.

Vengono descritti diversi approcci per ottenere una valutazione dell'incertezza per i risultati di misure chimiche (22, 66-68). Questi prendono in considerazione:

- la precisione complessiva, a lungo termine del metodo (es. la ripetibilità intermedia oppure la riproducibilità);
- lo scostamento e la sua incertezza, compresa l'incertezza statistica coinvolta nella misura dello scostamento, e l'incertezza del valore di riferimento (69-73);
- la taratura della strumentazione. Le incertezze associate con la taratura di strumenti quali bilance, termometri, pipette e matracci tarati sono spesso trascurabili in confronto alla precisione complessiva e all'incertezza della stima dello scostamento sistematico. Se questo può essere dimostrato non è necessario includere queste incertezze di taratura nella valutazione dell'incertezza;
- ogni altro effetto significativo in aggiunta a quelli esplicitati sopra. Ad esempio, gli intervalli permessi dal metodo per le temperature o i tempi possono non essere stati interamente valutati nello studio di validazione, e potrebbe essere necessario includere i loro contributi. Tali effetti possono essere quantificati in modo utile dagli studi di robustezza (si veda il paragrafo 6.8), o da studi simili che stabiliscano l'entità del contributo di un dato effetto al risultato.

Nei casi in cui il contributo di effetti singoli è importante, ad esempio nei laboratori di taratura, sarà necessario considerare separatamente i contributi singoli di ciascun effetto.

Si noti che, fatta salva la necessità di tenere conto di effetti non compresi nello scopo dello studio collaborativo, lo scarto tipo di riproducibilità costituisce una stima approssimata, ma sufficientemente valida, dell'incertezza tipo composta a condizione che lo scostamento del laboratorio, misurato su materiali adeguati, sia piccolo rispetto allo scarto tipo di riproducibilità, la ripetibilità intra-laboratorio sia comparabile alla ripetibilità del metodo normato, e la ripetibilità intermedia del laboratorio non sia più grande dello scarto tipo di riproducibilità pubblicato (67).

6.8. Robustezza

6.8.1. Definizione

La 'robustezza' di una procedura analitica è *"una misura della sua capacità di non essere influenzata da piccole, ma deliberate, variazioni ai parametri del metodo. La robustezza fornisce un'indicazione dell'affidabilità del metodo durante il normale utilizzo"* (13).

6.8.2. Il 'test di robustezza'

In ogni metodo ci saranno alcune fasi che, se non eseguite con sufficiente attenzione, possono avere un effetto significativo sulle prestazioni del metodo e perfino determinarne il mancato funzionamento. Queste fasi devono essere identificate, di solito come parte dello sviluppo del metodo, e, se possibile, se ne deve valutare l'influenza sulle prestazioni del metodo utilizzando un 'test di robustezza'. Questo termine, definito dall'AOAC, si riferisce ad una tecnica comprovata per valutare la robustezza usando il disegno sperimentale di Plackett-Burman (74).

Un 'test di robustezza' prevede di introdurre deliberatamente cambiamenti nel metodo, e indagare gli effetti che ne derivano sulle prestazioni.¹⁴ È quindi possibile identificare le variabili nel metodo che hanno l'effetto più significativo e assicurare che, quando si utilizza il metodo, esse siano controllate attentamente. Quando c'è la necessità di perfezionare ulteriormente il metodo, i miglioramenti possono essere probabilmente effettuati concentrandosi su quelle parti del metodo note per essere critiche.

La robustezza di una procedura deve essere stabilita per i metodi sviluppati all'interno di un laboratorio, i metodi adattati dalla letteratura scientifica e i metodi pubblicati dagli enti di normazione se utilizzati fuori dallo scopo specificato nel metodo normato. Quando i metodi pubblicati da un ente di normazione sono utilizzati nell'ambito dello scopo del metodo, la robustezza sarà stata solitamente studiata come parte del processo di standardizzazione del metodo. Quindi nella maggior parte dei casi non è necessario uno studio di robustezza a livello del singolo

¹⁴ Di solito si studia l'effetto sul misurando, ma in alternativa si può investigare l'effetto su un parametro sperimentale, ad esempio, la risoluzione dei picchi in un cromatogramma.

laboratorio. Le informazioni riguardo la robustezza devono essere indicate nella procedura di misura del laboratorio sotto forma

di limiti di tolleranza stabiliti per i parametri sperimentali critici (si vedano l'Esempio 5 e lo Schema di riferimento rapido 8).

Esempio 5 – Le istruzioni seguenti, riprese dalla ISO 11732 (58), indicano il livello di criticità dei parametri sperimentali.

- NH_4Cl essiccato a massa costante alla temperatura di 105 ± 2 °C.
- Le quantità indicate possono essere ridotte (es. di un decimo).
- La soluzione è stabile per circa un mese se conservata in bottiglie di plastica (polietilene) a temperatura ambiente.
- L'assorbanza della soluzione dovrebbe essere 0,3-0,5.
- Degassare e purificare la soluzione..., riempire con la soluzione il serbatoio del reagente e lasciare riposare per almeno 2 ore.
- Questa soluzione può essere conservata in un frigorifero al massimo per una settimana.
- Per la raccolta dei campioni sono adatti contenitori di vetro, polialcheni o politetrafluoroetilene (PTFE).

In casi eccezionali, il campione può essere conservato fino a due settimane, a condizione che sia stato filtrato su membrana dopo l'acidificazione.

Schema di riferimento rapido 8 – Robustezza

Cosa fare	Quante volte	Cosa calcolare / determinare dai dati	Commenti
<p>Identificare le variabili che potrebbero avere effetti significativi sulle prestazioni del metodo.</p> <p>Pianificare gli esperimenti (analizzando MR o campioni di prova) per monitorare l'effetto sui risultati di misura di variazioni sistematiche delle variabili.</p>	<p>Si valuta in modo più efficace utilizzando disegni sperimentali. Ad esempio, 7 parametri possono essere studiati in 8 esperimenti usando il disegno sperimentale di Plackett-Burman (74).</p>	<p>Determinare l'effetto sui risultati di misura di ogni cambiamento di condizioni.</p> <p>Classificare le variabili in ordine decrescente di entità dell'effetto sulle prestazioni del metodo.</p> <p>Condurre test di significatività per determinare se gli effetti osservati sono statisticamente significativi.</p>	<p>Progettare il controllo qualità o modificare il metodo in modo da controllare le variabili critiche, ad esempio, dichiarando limiti di tolleranza adeguati nella procedura operativa standard.</p>

7. Uso dei metodi validati

Quando si utilizza un metodo altrui, che sia stato sviluppato in un altro laboratorio, un metodo pubblicato, o persino un metodo normato o ufficiale, ci sono due problemi che devono essere considerati.

Per prima cosa, i dati della validazione effettuata sono adeguati per le finalità richieste o è necessario estendere la validazione? Si deve tener presente che, oltre alla quantità di informazioni fornite circa le prestazioni del metodo, deve essere valutata anche l'affidabilità della fonte dei dati di validazione. I dati ottenuti negli studi collaborativi oppure da organizzazioni di standardizzazione riconosciute, sono generalmente considerati affidabili, mentre i dati pubblicati solo nella letteratura scientifica o forniti dai produttori delle apparecchiature e/o dei reagenti lo sono meno. In secondo luogo, se i dati della validazione effettuata sono adeguati, il laboratorio è in grado di verificare le prestazioni dichiarate per il metodo? (si veda il paragrafo 2.2). Le apparecchiature e le strutture disponibili sono adeguate? Se il metodo è stato validato mediante molte prove anche in condizioni sperimentali estreme, allora probabilmente anche un nuovo analista competente otterrà risultati soddisfacenti nell'ambito dei dati di prestazione esistenti. Tuttavia, ciò deve sempre essere perlomeno verificato. Di solito è sufficiente provare l'abilità dell'analista nell'ottenere la ripetibilità dichiarata e verificare eventuali errori sistematici, a condizione che il metodo normato sia usato nell'ambito del proprio scopo. Questo argomento è trattato più dettagliatamente in seguito.

I metodi normalizzati sono generalmente il risultato di uno studio collaborativo e gli organismi di normazione che li emettono frequentemente impiegano esperti di statistica che contribuiscono ad assicurare che gli studi di validazione siano progettati, eseguiti e valutati correttamente. La norma ISO 5725 (29) descrive un modello sul quale si dovrebbero basare i confronti inter-laboratorio, affinché forniscano informazioni affidabili sulle prestazioni del metodo. Questo modello viene applicato sempre di più, ma non tutti i metodi normati vi sono stati sottoposti. Sarebbe rischioso supporre che tutti i metodi

normati siano stati correttamente validati ed è responsabilità dell'analista controllare se le informazioni dichiarate per le prestazioni del metodo siano adeguate o meno.

Allo stesso modo, spesso si suppone che i metodi normati possano essere messi in uso immediatamente e i dati di prestazione pubblicati possano essere ottenuti senza dubbio da chiunque usi il metodo. Questa supposizione è rischiosa. Persino chi ha familiarità o è esperto nel particolare campo della chimica in cui si applica il metodo dovrà fare pratica prima di diventare pienamente competente nell'uso del metodo.

Quando si utilizzano metodi validati (o peraltro qualunque altro metodo) si raccomanda di attenersi alle regole seguenti per far sì che le prestazioni ottenute siano accettabili.

1. Per prima cosa, l'analista dovrebbe conoscere bene il nuovo metodo prima di usarlo per la prima volta. L'ideale è che il metodo sia prima dimostrato all'analista da qualcuno già esperto nella sua utilizzazione. Poi, l'analista dovrebbe usarlo inizialmente sotto attenta supervisione. Il livello di supervisione sarà ridotto fino a quando l'analista sarà ritenuto sufficientemente competente per procedere da solo. Ad esempio, questo livello di competenza potrebbe essere fissato in termini di capacità dell'analista di ottenere i livelli di prestazione dichiarati nel metodo, quali la ripetibilità, il limite di rivelabilità, ecc. Questa è una modalità tipica per addestrare qualcuno ad usare un nuovo metodo e spesso le procedure di addestramento di laboratorio sono progettate in questo modo, individuando misure oggettive per verificare la competenza acquisita, a determinati intervalli durante l'addestramento. In ogni caso, l'analista dovrebbe aver letto completamente il metodo ed essersi familiarizzato con gli aspetti teorici che sottintendono a quella misurazione, ripercorrendo mentalmente le varie fasi, individuando i punti in cui si possono fare delle pause e gli stadi del processo in cui deve impegnarsi in un lavoro

ininterrotto. Ad esempio, se è necessario preparare i reagenti, quanto sono stabili successivamente? Devono essere preparati in anticipo? Un classico punto debole consiste nel trascorrere molte ore a preparare un numero di campioni e poi scoprire che la preparazione del reattivo necessario per lo stadio successivo del lavoro richiede una sintesi complessa, nel frattempo i campioni stessi potrebbero degradarsi.

2. In secondo luogo, si deve valutare quanti campioni possono essere gestiti opportunamente in un determinato periodo di tempo. È meglio analizzare bene pochi campioni che tentare di

analizzarne un grande numero e dover ripetere la maggior parte di essi.

3. Infine, occorre assicurarsi di avere a disposizione tutto il necessario per eseguire il metodo prima di iniziare il lavoro. Questo comporta la disponibilità di apparecchiature, reagenti e materiali di riferimento appropriati (con ogni preparazione connessa), magari riservarsi lo spazio sotto cappa chimica, ecc.

Se è necessario adattare o modificare un metodo validato altrui, allora è richiesta una rivalidazione appropriata. A seconda della natura delle modifiche, potrebbe perfino risultare che i dati della validazione originaria siano del tutto inappropriati.

8. Utilizzo di dati di validazione per la progettazione del controllo di qualità

8.1. Introduzione

‘Assicurazione di Qualità’ (AQ) e ‘Controllo di Qualità’ (CQ) sono termini il cui significato spesso varia a seconda del contesto. Secondo la ISO, il termine ‘assicurazione della qualità’ contempla le attività che il laboratorio intraprende per infondere fiducia che i requisiti per la qualità saranno soddisfatti, mentre il ‘controllo della qualità’ descrive le singole misure che vengono attuate per soddisfare effettivamente i requisiti (9).

La validazione del metodo fornisce un’idea delle capacità e delle limitazioni del metodo che possono essere incontrate durante il suo utilizzo routinario mentre il metodo è sotto controllo. Per verificare che il metodo resti sotto controllo, cioè per verificare che le sue prestazioni siano quelle previste, sono necessari controlli specifici. Durante la fase di validazione del metodo vengono utilizzati in gran parte campioni di contenuto noto. Una volta messo in uso nel laboratorio, esso viene utilizzato per campioni di contenuto sconosciuto. Un CQ interno appropriato può essere attuato misurando ripetutamente nel tempo dei campioni di prova stabili. Questo consente all’analista di verificare se la variabilità delle risposte ottenute rifletta veramente una diversità nei campioni analizzati o se si stiano verificando cambiamenti inattesi e indesiderati nelle prestazioni del metodo. In pratica questi campioni noti dovrebbero essere misurati in ogni lotto di campioni di prova come parte del processo di controllo di qualità. I controlli effettuati dipenderanno dalla natura, dalla criticità e dalla frequenza delle analisi, dalla dimensione del lotto, dal grado di automazione e difficoltà del metodo, ma anche dall’esperienza acquisita durante i processi di sviluppo e validazione.

Il CQ può essere attuato in vari modi, sia all’interno del laboratorio (CQ interno) che tra laboratori (CQ esterno).

8.2. Controllo di qualità interno

Il CQ interno si riferisce alle procedure intraprese dal personale del laboratorio per il monitoraggio continuo delle operazioni

effettuate e dei risultati delle misurazioni al fine di decidere se i risultati siano sufficientemente affidabili per essere emessi (18, 75). Questo comprende analisi ripetute di campioni di prova stabili, bianchi, soluzioni o materiali a titolo noto simili a quelli utilizzati per la taratura, campioni addizionati, campioni ciechi e campioni per il CQ (76). Per il monitoraggio dei risultati del CQ è raccomandato l’utilizzo di carte di controllo (76, 77). Deve essere possibile dimostrare che il CQ adottato è sufficiente a garantire la validità dei risultati. Per monitorare i diversi tipi di variazione che possono riscontrarsi all’interno del processo si possono usare tipi differenti di controllo di qualità: campioni di CQ, analizzati ad intervalli nella sequenza analitica, indicheranno la deriva nel sistema; l’uso di vari tipi di bianchi indicherà quali sono i contributi al segnale strumentale oltre a quelli dell’analita; le analisi in duplicato forniscono una verifica della ripetibilità.

I campioni utilizzati per il CQ sono campioni tipici che, in un dato periodo di tempo, risultano sufficientemente stabili e omogenei da dare lo stesso risultato (tenuto conto della variazione casuale nella esecuzione del metodo) e sono disponibili in quantità sufficienti a consentire analisi ripetute nel tempo. In questo periodo la ripetibilità intermedia del metodo può essere controllata monitorando i valori ottenuti dall’analisi dei campioni di CQ, solitamente riportandoli su una carta di controllo. Sulla carta di controllo sono fissati limiti per i valori osservati (convenzionalmente i ‘limiti di allarme’ sono fissati a $\pm 2s$ dal valore medio, e i ‘limiti di azione’ sono fissati a $\pm 3s$ attorno al valore medio). Il CQ è considerato soddisfacente a condizione che i valori riportati nella carta siano conformi alle regole pertinenti i limiti stabiliti. Fintantoché il valore del campione di controllo è accettabile, è verosimile che i risultati dei campioni della stessa sequenza analitica del CQ possano essere considerati affidabili. L’accettabilità del valore ottenuto per il campione CQ dovrebbe essere verificata il prima possibile nel processo di analisi affinché nel caso in cui si verifichi un problema, le risorse sprecate in determinazioni inaffidabili siano ridotte al minimo.

Durante la validazione del metodo, si ottengono delle stime iniziali della precisione nelle diverse condizioni. Al fine di definire limiti realistici sulla carta di controllo, le misurazioni devono riflettere il modo in cui il metodo è effettivamente destinato a essere utilizzato quotidianamente. Pertanto le misurazioni effettuate durante la validazione dovrebbero riprodurre tutte le possibili variazioni delle condizioni operative: diversi analisti, variazioni della temperatura del laboratorio, ecc. Se questo non viene fatto, lo scarto tipo sarà irrealisticamente piccolo, dando luogo a limiti troppo stringenti per la carta di controllo che non possono essere rispettati nell'uso normale. Per questo motivo, in genere è consigliato rivalutare i limiti stabiliti dopo un anno o quando siano stati raccolti un numero sufficiente di risultati (76).

L'impiego di vari tipi di bianchi consente all'analista di garantire che i calcoli effettuati per l'analita possano essere opportunamente corretti per rimuovere qualsiasi contributo alla risposta che non sia attribuibile all'analita stesso. L'analisi replicata di campioni di prova analizzati nella routine fornisce uno strumento per controllare, in un processo analitico, cambiamenti della precisione che potrebbero influire negativamente sul risultato (78). Per controllare la ripetibilità i replicati possono essere analizzati uno di seguito all'altro nella sequenza analitica.

L'analisi di campioni 'ciechi' è effettivamente un tipo di analisi ripetuta e fornisce un mezzo per controllare la precisione. Essa consiste nel collocare, all'interno della sequenza analitica, più aliquote dello stesso campione, possibilmente da parte del supervisore del laboratorio, ed è chiamata 'analisi in cieco' perché normalmente l'analista non è consapevole né dell'identità delle aliquote né che si tratti di replicati. In questo modo l'analista non ha idee preconcepite su quali risultati debbano essere correlati.

Soluzioni o materiali a titolo noto simili a quelli utilizzati per la taratura, posti ad intervalli regolari nella sequenza analitica, consentono di controllare che la risposta del processo analitico all'analita sia stabile.

È responsabilità della direzione del laboratorio stabilire e giustificare un livello di controllo della qualità adeguato, basato sulla valutazione del rischio, che tenga conto dell'affidabilità del metodo, della criticità del lavoro, e della possibilità di ripetere l'analisi in

caso risultasse eseguita non correttamente la prima volta.

Per analisi di routine è largamente accettato come ragionevole un livello di CQ interno del 5%, vale a dire 1 campione ogni 20 analizzati dovrebbe essere il campione CQ.

Tuttavia, per metodi robusti, utilizzati di routine con un elevato numero di campioni, può essere ragionevole utilizzare un numero inferiore di campioni CQ. Per procedure più complesse non è inusuale un livello di CQ del 20% e, in certi casi, può essere richiesto di arrivare anche al 50%. Per le analisi eseguite di rado, si dovrebbe eseguire in ogni occasione una validazione completa del sistema, cosa che, in genere, può prevedere l'impiego di un MR con una concentrazione nota o certificata di analita, seguito da analisi replicate del campione di prova e da una prova su campione addizionato (un campione a cui è stata deliberatamente aggiunta una quantità nota di analita). Le analisi effettuate più frequentemente dovrebbero essere oggetto di procedure di CQ sistematiche che prevedano l'impiego di carte di controllo e campioni di controllo.

8.3. Controllo di qualità esterno

La partecipazione regolare a prove valutative (*Proficiency Testing*, PT), conosciuta anche come Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) è per il laboratorio una modalità riconosciuta per monitorare le sue prestazioni sia relativamente ai propri requisiti sia rispetto alle prestazioni ottenute da altri laboratori dello stesso livello. La partecipazione a prove valutative consente di mettere in evidenza sia la variazione tra laboratori (riproducibilità) sia gli errori sistematici (scostamenti).

La partecipazione a prove valutative e ad altri tipi di confronti interlaboratorio è riconosciuta come un mezzo importante per monitorare il grado di equivalenza dei risultati analitici a livello nazionale e internazionale. Gli enti di accreditamento riconoscono i benefici di queste attività e incoraggiano vivamente i laboratori a partecipare a prove valutative come parte integrante della loro gestione della qualità (79). È importante che il monitoraggio dei risultati ottenuti nei PT sia parte delle procedure di CQ e che ne seguano azioni appropriate quando necessario.

In alcuni casi, gli enti di accreditamento possono indicare la partecipazione a una

particolare prova valutativa come requisito per l'accreditamento. Il valore della partecipazione dipende, naturalmente, dalla qualità della prova valutativa stessa. I requisiti per la competenza degli organizzatori di prove valutative sono descritti nella norma ISO/IEC 17043 (80). Informazioni pratiche su come scegliere, utilizzare e interpretare le prove valutative sono presentate in una Guida Eurachem (81). Informazioni su un gran numero di prove valutative possono essere reperite nel

database EPTIS (www.eptis.bam.de). Tuttavia, in particolare in settori analitici emergenti o per applicazioni poco frequenti, possono non esistere prove valutative del tutto appropriate. Queste e altre limitazioni sono state prese in considerazione in una recente linea guida (82) che richiede ai laboratori accreditati di definire una strategia per la loro partecipazione a prove valutative.

9. La documentazione per i metodi validati

9.1. Dalla bozza alla versione definitiva

Il metodo oggetto di validazione, viene eseguito utilizzando una procedura documentata che dovrebbe essere considerata una bozza fino a quando il rapporto di validazione non sia approvato. Una volta che il processo di validazione è completo, è importante documentare la procedura analitica in modo che il metodo possa essere messo in opera chiaramente e senza ambiguità. Ci sono una serie di ragioni per affermare tutto ciò.

- Le varie valutazioni del metodo effettuate durante il processo di validazione presuppongono che, durante il suo utilizzo, il metodo venga eseguito ogni volta nello stesso modo. In caso contrario, le prestazioni reali del metodo non corrisponderanno a quelle predette dai dati di validazione. Pertanto la documentazione deve limitare la possibilità di introdurre variazioni accidentali al metodo.
- Una documentazione adeguata è necessaria per gli scopi di verifiche ispettive e valutazioni e può, anche, essere richiesta per motivi legati a contratti o regolamenti.
- Una documentazione appropriata del metodo contribuirà a garantire che lo stesso sia applicato in modo coerente di volta in volta. Poiché la qualità della documentazione ha un effetto diretto sulla possibilità di riprodurre il metodo esattamente, è probabile che abbia anche influenza sulla precisione e sulla incertezza di misura. Infatti, il contributo all'incertezza associato a metodi inadeguatamente documentati potrebbe essere così grande da renderli in realtà inutilizzabili. Qualsiasi anomalia nella documentazione deve essere risolta prima che si possa ottenere una ragionevole stima dell'incertezza.

9.2. Raccomandazioni

9.2.1. Verifica delle istruzioni

Non è facile documentare un metodo in maniera appropriata. Le informazioni dovrebbero apparire all'incirca nell'ordine in cui si prevede che saranno necessarie

all'utilizzatore. Un errore comune è quello di pensare che tutti comprendano i meccanismi del metodo nella stessa misura della persona che l'ha sviluppato e documentato. Questa presunta conoscenza può essere pericolosa. Un modo utile per testare la documentazione è far eseguire, a un collega competente, la procedura documentata, esattamente nel modo descritto. Se quanto avviene corrisponde a quanto si intendeva avvenisse, il metodo così documentato dovrebbe essere idoneo per essere utilizzato da analisti diversi fornendo risultati coerenti. In caso contrario, quindi, si rende necessaria una nuova stesura per descrivere le procedure in maniera più dettagliata e ridurre le ambiguità.

9.2.2. Raccomandazioni nelle norme

Numerose norme forniscono indicazioni sul tipo di informazioni che dovrebbero essere incluse quando si documenta un metodo. Dal punto di vista del chimico probabilmente le norme più utili sono quelle serie ISO 78, che descrivono la documentazione per un gran numero di tipi diversi di metodi di analisi chimica (gli enti di normazione producono, validano e naturalmente documentano ogni anno un gran numero di metodi e, quindi, necessitano di un approccio il più coerente possibile. Queste norme sulla documentazione dei metodi sono prodotte in primo luogo a beneficio dei loro comitati tecnici). La norma ISO 78-2 (83) fornisce consigli sulla documentazione dei metodi chimici in generale. Un formato basato su queste indicazioni è incluso nell'Appendice A. Le norme di questa serie indicano un ordine logico per gli argomenti con titoli raccomandati e consigli sulle informazioni che dovrebbero figurare per ogni voce. Quando si utilizzano queste norme il lettore dovrebbe tener conto della necessità di bilanciare la flessibilità dell'approccio rispetto alla sua coerenza. Sebbene sia auspicabile che tutti i metodi presentino lo stesso formato documentale, si dovrebbe altresì ammettere che non tutti i metodi richiedono lo stesso grado di dettaglio e spesso sarà appropriato omettere dal documento alcune delle sezioni raccomandate.

9.2.3. Controllo dei documenti

Un laboratorio che documenta i suoi metodi può trarre vantaggio dallo sviluppo di un proprio stile. Oltre a presentare le informazioni rilevanti in un modo logico e facile da usare, ciò consente anche di distribuire il carico del lavoro di documentazione tra un certo numero di autori. La coerenza al modello delle bozze generate da vari autori può essere verificata da un unico soggetto con tale autorità.

Il processo documentale di un metodo costituisce una parte importante del sistema di gestione della qualità di un laboratorio e dovrebbe essere oggetto di un adeguato grado di controllo. Lo scopo di questo è garantire che siano effettivamente utilizzati solo i metodi e le procedure autorizzati come idonei all'uso. Pertanto, come parte del processo di documentazione, i metodi dovrebbero contenere le informazioni che consentano all'utilizzatore di valutare se il metodo sia stato

autorizzato per l'uso e sia completo. Altre informazioni che dovrebbero essere disponibili riguardano il numero di versione e la data del metodo; l'autore; quante copie esistono del metodo; eventuali restrizioni relative alla riproduzione.

Periodicamente i metodi possono richiedere un aggiornamento. Per esempio può essere stata migliorata la tecnologia alla base della procedura. Il controllo dei documenti consente di eseguire facilmente il ritiro di metodi obsoleti e l'emissione di metodi revisionati. Attualmente il processo di controllo dei documenti è notevolmente semplificato dall'utilizzo di software specifici. Ad esempio, poiché le modifiche dovrebbero essere apportate solo da persone autorizzate, questo aspetto può essere tenuto sotto controllo nel software applicando ai file rilevanti ampio accesso in modalità 'sola lettura' e limitando a pochi l'accesso in modalità 'scrittura'.

10. Implicazioni dei dati di validazione per il calcolo e l'emissione dei risultati

È importante che l'analista sia in grado di tradurre i dati, ottenuti durante l'analisi di campioni con il metodo validato, in risultati che contribuiscano direttamente a risolvere il problema del cliente. In questo giocano un ruolo importante le caratteristiche di prestazione stabilite durante la validazione. I dati di ripetibilità, ripetibilità intermedia e riproducibilità possono essere usati per stabilire se le differenze trovate durante l'analisi dei campioni siano significative. I controlli di qualità basati sui dati di validazione possono essere usati per confermare che il metodo è sotto controllo e che i risultati che si stanno producendo hanno significato. La stima dell'incertezza di misura permette di esprimere il risultato come un intervallo di valori con un livello di fiducia accettato.

È importante che l'analista abbia accesso ai dati di validazione in modo da poterli utilizzare a supporto della validità dei risultati prodotti. Se tale informazione debba essere trasmessa al cliente o meno è un altro discorso. Molto spesso il cliente non ha le conoscenze tecniche per valutare correttamente il significato dei dati. In tali circostanze è forse meglio mettere a disposizione i dati su sua richiesta.

Questioni come la validazione del metodo, la variabilità e l'incertezza di misura devono essere trattate attentamente in determinate circostanze, per esempio in ambito legale o forense. Ammettere apertamente l'esistenza di un'incertezza associata alla misura ed essere preparati a giustificare le decisioni prese in base alla conoscenza di tale incertezza può essere la cosa migliore.

Bisogna fare attenzione quando si prova a usare un risultato analitico con la sua incertezza associata per decidere se la partita di origine, dalla quale il campione analizzato è stato prelevato, sia o meno conforme ad una specifica o ad un limite (84). Una tale decisione non può essere responsabilità dell'analista sebbene egli sia chiamato a fornire consulenza tecnica come supporto al processo decisionale.

Nel riportare i risultati, l'analista deve decidere se correggerli per eventuali scostamenti di misura rilevati o se riportare i risultati senza correzione ma indicando chiaramente l'esistenza di tale scostamento.

Bisogna fare attenzione quando i risultati sono riportati come 'non rilevati'. Di per sé questa frase non dà alcuna informazione e bisognerebbe includere una spiegazione su quale sia il limite di rivelabilità nel caso specifico. Talvolta è appropriato riportare un valore numerico anche se può essere inferiore all'apparente limite di rivelabilità. Le autorità possono talvolta richiedere di indicare il limite di quantificazione.

Qualora con il risultato di misura sia richiesta una dichiarazione relativa all'incertezza, può essere appropriato indicare il valore dell'incertezza estesa applicando un adeguato fattore di copertura. Ad esempio, un fattore di copertura pari a 2 in genere corrisponde ad un intervallo all'interno del quale si può trovare il valore del misurando con un livello di fiducia di circa il 95%. Per ulteriori indicazioni su come riportare l'incertezza di misura, si veda la sezione 9 della Guida Eurachem/CITAC (22).

Appendice A. Protocollo per la documentazione relativa al metodo

Il processo di adeguata documentazione dei metodi è discusso nel capitolo 9 della Guida. Di seguito si riporta uno schema che può servire come riferimento per un formato adatto. Esso è basato sulla ISO 78-2 (83), ma contiene alcuni suggerimenti supplementari sulla taratura, sul controllo di qualità e sul controllo dei documenti. L'Appendice A deve essere considerata solo come una guida e dovrebbe essere adattata in modo da soddisfare ogni esigenza particolare.

A.1 Prefazione

A.1.1 Sommario dello stato di aggiornamento e della revisione

Questa sezione ha una doppia finalità. In primo luogo ha lo scopo di permettere che possano essere introdotte piccole modifiche al testo del metodo senza dover procedere ad una sua completa revisione e ristampa. In secondo luogo si raccomanda che ogni metodo sia periodicamente revisionato rispetto alla sua idoneità per lo scopo e il sommario consente di registrare che questo sia stato fatto. Il sommario di norma è posto all'inizio del metodo, subito dopo la copertina.

A.1.2 Aggiornamenti

Ogni modifica riportata a mano sul testo del metodo sarà accettata a patto che i cambiamenti siano anche registrati nella tabella sottostante (annotazioni scritte a mano accettabili) e siano opportunamente autorizzati. È implicito che l'autorizzazione conferma il fatto che gli effetti delle modifiche sullo stato di validazione del metodo sono stati investigati e non hanno causato problemi, e che le modifiche sono state riportate in tutte le copie del metodo.

#	Sezione	Natura della modifica	Data	Autorizzazione
1 (es.)	3.4	Cambio del flusso a 1,2 mL min ⁻¹	8/2/96	DGH

A.1.3 Revisione

In qualunque momento ci si dovrebbe aspettare che la data in cui il metodo è stato utilizzato cada tra la data di revisione e la data della revisione successiva, come mostrato nella tabella sottostante.

Data di revisione	Esito della revisione	Data della prossima revisione	Autorizzazione

A.2 Introduzione

L'introduzione serve, se necessario, per inserire informazioni generali, quali commenti sul contenuto tecnico della procedura o sulle ragioni per cui è stata predisposta. Informazioni di base sul metodo, se richieste, dovrebbero essere preferibilmente incluse in questa sezione.

A.3 Titolo

Il titolo dovrà indicare la tipologia di campioni al quale il metodo si applica, l'analita o la caratteristica da determinare e il principio della determinazione. Ci si dovrebbe limitare, ove possibile, alle informazioni riportate di seguito.

Formato da preferire: Determinazione di A {*analita o misurando*} (in presenza di B {*interferenza*}) in C {*matrice*} mediante D {*principio*}.

A.4 Avvertenze

Attirare l'attenzione su eventuali pericoli e descrivere le precauzioni necessarie per evitarli. Dettagli sulle precauzioni possono essere inseriti nelle relative sezioni ma in questa deve essere evidenziata l'esistenza di pericoli e la necessità di misure di prevenzione.

Fornire adeguate avvertenze su ogni pericolo relativo a:

- manipolazione dei campioni;
- manipolazione o preparazione di solventi, reagenti, materiali di riferimento o altri materiali;
- funzionamento delle apparecchiature;
- necessità di ambienti di lavoro speciali, come ad esempio le cappe chimiche;
- possibili conseguenze di un aumento di scala dell'esperimento (limiti di esplosione).

A.5 Scopo

Questa sezione permette ad un potenziale utente di verificare rapidamente se il metodo può essere adatto all'applicazione desiderata o se ci sono delle limitazioni. Dovrebbero essere inclusi i seguenti dettagli:

- una descrizione del problema di base (il motivo per il quale è necessario il metodo);
- l'analita o misurando (o gli analiti/misurandi) che può essere determinato con il metodo;
- la forma in cui l'analita (o gli analiti) è determinato – speciazione, totale/disponibile, ecc.;
- la matrice (o le matrici) in cui l'analita (o gli analiti) può essere determinato;
- un intervallo di lavoro (intervallo di misura) nel quale il metodo può essere applicato. Esso si dovrebbe riferire a proprietà del campione di laboratorio, come ad esempio le concentrazioni;
- interferenze note che impediscono o limitano l'uso del metodo;
- la tecnica strumentale usata nel metodo;
- la minima quantità di campione necessaria.

Nel settore alimentare (35) si usa il concetto di 'applicabilità' come sinonimo di scopo e lo si definisce come "analiti, matrici, e concentrazioni per i quali un metodo di analisi può essere usato in modo soddisfacente".

A.6 Riferimenti (normativi)

Questa sezione dovrà contenere una lista dei documenti che sono necessari per l'applicazione del metodo. I documenti che sono serviti solo come riferimento durante la messa a punto del metodo dovranno essere inseriti nella bibliografia alla fine del documento.

A.7 Definizioni

Si forniscano definizioni per i termini usati nel testo ove possano essere necessarie per la comprensione completa del testo stesso. Si usino ove possibile le definizioni ISO. Si indichino le fonti. Le formule di struttura di composti chimici possono essere incluse in questa sezione se necessarie.

A.8 Principio

In questa sezione si delineano le fasi essenziali del metodo, esplicitando il principio di funzionamento della tecnica analitica. Può essere utile usare un diagramma di flusso o un diagramma causa-effetto. Questa sezione dovrebbe essere scritta in modo da consentire un riepilogo a colpo d'occhio del funzionamento del metodo. Si dovrebbe includere una spiegazione del principio sul quale si basano i calcoli. Ove sia opportuno per chiarire il funzionamento del metodo o i calcoli, si includano i dettagli delle eventuali reazioni chimiche coinvolte (es. questo può essere importante se è prevista la derivattizzazione o nella titrimetria).

Esempio: "La concentrazione è ottenuta leggendo su una curva di taratura a 6 punti la concentrazione corrispondente all'assorbanza del campione, corretta per il valore di bianco, e moltiplicandola per il fattore di concentrazione".

A.9 Reazioni

In questa sezione dovranno essere indicate le reazioni essenziali considerate necessarie per la comprensione del testo o dei calcoli. La loro conoscenza giustifica i calcoli effettuati usando i dati ottenuti nelle determinazioni e può portare ad una migliore comprensione del metodo, soprattutto se esso comporta diverse modifiche successive dello stato di ossidazione dell'elemento da determinare.

Quando sono coinvolte titolazioni, è particolarmente utile indicare le reazioni per definire il numero di equivalenti per ogni mole di reagente.

A.10 Reagenti e materiali

Elencare tutti i reagenti e i materiali richiesti per l'analisi insieme alle loro caratteristiche essenziali (concentrazione, densità, ecc.) e numerarli per potervi fare riferimento nel seguito. Elencare:

- numeri CAS (se disponibili);
- dettagli di eventuali rischi associati incluse le istruzioni per lo smaltimento;
- grado analitico o purezza;
- la necessità che i materiali per la taratura e per il controllo di qualità provengano da lotti indipendenti;
- dettagli sulla preparazione di reagenti e materiali, compresa l'eventuale necessità di eseguirla in anticipo;
- requisiti per il contenimento e lo stoccaggio;
- durata e stabilità delle materie prime e dei reagenti preparati;
- composizione richiesta con note su come esprimere la concentrazione o altra grandezza;
- requisiti per l'etichettatura.

A.11 Apparecchiature

Descrivere le singole attrezzature e come sono collegate in modo sufficientemente dettagliato da consentire un assemblaggio univoco. Numerare i singoli elementi per potervi fare riferimento nel seguito. Schemi e diagrammi di flusso possono rendere più chiara la descrizione. Qualsiasi verifica del funzionamento dell'apparecchiatura assemblata deve essere descritta nella sezione 'Procedura' in un sottoparagrafo intitolato 'Verifiche preliminari' o 'Verifiche strumentali' (si veda il punto A.13).

Elencare i requisiti minimi di prestazione e di verifica, facendo riferimento anche alla sezione dedicata alla taratura (A.13) e alle sezioni rilevanti dei manuali degli strumenti. Se appropriato, fare riferimento alle norme internazionali o ad altri documenti accettabili a livello internazionale in materia di vetreria da laboratorio e relative apparecchiature. Includere i requisiti ambientali (cappe chimiche, ecc).

A.12 Campionamento

Il campionamento in questo protocollo include sia il campionamento per ottenere il campione di laboratorio sia il sottocampionamento in laboratorio per ottenere il campione di prova da cui verrà estratta l'aliquota da saggio.

Se il campionamento per la preparazione del campione da laboratorio è indipendente dall'analisi chimica in sé, generalmente è sufficiente fare riferimento per informazione alla procedura di campionamento. In assenza di tale procedura, la sezione sul campionamento può comprendere un piano e una procedura di campionamento, fornendo indicazioni su come evitare l'alterazione del prodotto e tenendo conto dei requisiti per l'applicazione di metodi statistici.

La sezione sul campionamento dovrebbe fornire tutte le informazioni necessarie per la preparazione del campione di prova a partire dal campione di laboratorio. Includere dettagli su stoccaggio, condizionamento / pretrattamento e smaltimento. Se questa fase è particolarmente complicata può essere giustificata la stesura di un documento separato che descriva i singoli passaggi.

A.13 Procedura

Descrivere ciascuna sequenza di operazioni. Se il metodo in questione è già contenuto in un'altra norma, si dovrà usare la frase 'utilizzare il metodo specificato nella norma ISO 12345' o 'utilizzare uno dei metodi specificati nella norma ISO 12345', indicando, se necessario, ogni modifica apportata. Menzionare operazioni per le quali sono necessarie speciali misure di sicurezza. La sezione 'Procedura' normalmente include sottoparagrafi su quanto segue:

- aliquota da saggio (la sua preparazione dal campione di prova o dal campione di laboratorio e la massa o il volume richiesti);
- analisi del bianco (condizioni e limitazioni);
- prove preliminari o verifiche (es. per verificare le prestazioni di uno strumento di misura);

- determinazione(i) o prova(e). Ciò include l'indicazione del numero di misurazioni o prove (es. in doppio) e la descrizione dettagliata di tutte le fasi;
- taratura. Identificare le parti critiche del processo analitico. Queste dovranno essere tenute sotto controllo attraverso la corretta gestione e taratura. Fare riferimento incrociato alle sezioni pertinenti precedenti. Descrivere le modalità per la taratura delle apparecchiature - ciò che deve essere tarato, come, con che cosa, e con quale frequenza? Prestare attenzione a che la riferibilità metrologica dei calibranti indicati sia adeguata.

A.14 Calcoli

Descrivere come si calcola il risultato (o i risultati). Specificare le unità di misura in cui il risultato e altre grandezze devono essere espressi; l'equazione utilizzata per il calcolo; il significato dei simboli algebrici utilizzati nell'equazione; il numero di cifre decimali o cifre significative con cui il risultato deve essere espresso. I simboli delle grandezze devono essere conformi alla ISO 80000 (14).

A.15 Precisione

Per i metodi che sono stati oggetto di un confronto interlaboratorio, devono essere indicati i dati di precisione (cioè la ripetibilità di misura e la riproducibilità di misura), calcolati, e preferibilmente anche pubblicati, in conformità con la norma ISO 5725 (29) o in accordo ad un'altra adeguata norma internazionale (che dovrà essere indicata come riferimento). Indicare chiaramente se i valori di precisione di misura sono espressi in termini assoluti o relativi, o come limiti di precisione.

A.16 Assicurazione di qualità e controllo di qualità

L'esecuzione della validazione dovrebbe fornire anche gli elementi per una descrizione delle procedure da seguire per il controllo di qualità interno ed esterno (prove valutative). Spiegare come deve essere eseguito il controllo di qualità, la frequenza dei controlli di qualità nella serie analitica, i criteri di accettabilità per il controllo, le azioni da intraprendere in caso di esito negativo del controllo, anche facendo riferimento alle parti rilevanti delle precedenti sezioni.

A.17 Casi particolari

Includere eventuali modifiche alla procedura rese necessarie dalla presenza o assenza di componenti specifici nel prodotto da analizzare, modifiche alle quali si sarà già fatto riferimento nella sezione 'Scopo'. Ogni caso particolare deve essere trattato separatamente (sotto un diverso titolo).

A.18 Rapporto di prova

Questa sezione dovrebbe specificare le informazioni da includere nel rapporto di prova. Dovrebbero essere normalmente incluse le seguenti informazioni:

- un riferimento al metodo utilizzato;
- il risultato (o i risultati) e una indicazione della qualità ad esso/i associata (precisione di misura, incertezza di misura specificata; intervallo di fiducia) se del caso, includendo un riferimento alla sezione 'Calcoli';
- eventuali deviazioni dalla procedura;
- qualsiasi caratteristica insolita osservata;
- la data della prova.

A.19 Allegati

Per migliorare la leggibilità è più pratico inserire alcune informazioni in un allegato. Si deve indicare chiaramente se l'allegato è normativo o informativo. Esempi di informazioni che possono essere incluse in allegato sono i dati di validazione del metodo, l'analisi del rischio e il calcolo dell'incertezza. Per quest'ultimo, si dovrebbero riportare le principali fonti di incertezza identificate nel metodo e i loro valori. Contributi non significativi che non sono utilizzati nel calcolo finale dovrebbero comunque essere menzionati. Si dovrebbe indicare l'incertezza tipo composta e/o

l'incertezza estesa spiegando come sono state ottenute. Una trattazione più dettagliata può essere inclusa in un documento separato a cui si faccia riferimento.

A.20 Bibliografia

Se sono considerati necessari riferimenti informativi, questi possono essere inclusi nel punto del testo al quale sono riferiti o, se ce ne sono molti, in una bibliografia alla fine del documento.

Appendice B. Basi statistiche per il calcolo del limite di rivelabilità¹⁵

Nello Schema di riferimento rapido 2 nel paragrafo 6.2.3 è stato indicato che il limite di rivelabilità (LOD) può essere calcolato moltiplicando uno scarto tipo adeguatamente scelto per un fattore pari a 3. Questa Appendice descrive le basi statistiche che determinano questo fattore.

Quando si determina il LOD lo scopo è di solito quello di stabilire la concentrazione più bassa di analita presente nel campione che può essere rivelata, utilizzando una determinata procedura di misura, con un livello di fiducia definito. La determinazione del LOD è un processo in due fasi. Nella prima fase si stabilisce un 'valore critico', scelto in modo che la probabilità di ottenere un risultato di misura che superi il valore critico non sia maggiore di α , se effettivamente il campione non contiene l'analita. Il valore critico fissa il criterio per dichiarare un campione 'positivo'. Di solito si pone la probabilità di ottenere un falso positivo pari a $\alpha = 0,05$ e questo conduce ad un valore critico pari approssimativamente a $1,65s$ (dove s è lo scarto tipo di un elevato numero di risultati per un campione bianco o un campione che contenga una bassa concentrazione dell'analita, e $1,65$ è il valore del t di Student a una coda per infiniti gradi di libertà a un livello di significatività, $\alpha = 0,05$). Il modo più conveniente per esprimere il valore critico è in termini di concentrazione, anche se in principio può essere rappresentato da una qualsiasi osservazione, come per esempio l'area di un picco. Ogni risultato che è superiore al valore critico dovrebbe essere dichiarato positivo.

Tuttavia, se il valore vero della concentrazione in un campione fosse esattamente uguale al valore critico (espresso in termini di concentrazione), ci si dovrebbe aspettare che circa la metà dei risultati di misura cadano al di sotto del valore critico con un tasso di falsi negativi del 50%. Un tasso di falsi negativi del 50% è ovviamente troppo alto per l'uso pratico; il metodo di prova non fornisce risultati affidabili al di sopra del valore critico se il valore vero della concentrazione è uguale al valore critico. Il LOD ha lo scopo di rappresentare la concentrazione vera alla quale il tasso di falsi negativi è accettabile una volta specificato il valore critico. l'errore di falso negativo, β , è in genere assunto uguale all'errore di falso positivo, principalmente per ragioni storiche (la IUPAC raccomanda valori predefiniti di $\alpha = \beta = 0,05$) (49). Utilizzando $\alpha = \beta = 0,05$, il LOD deve essere $1,65s$ sopra il valore specificato per il valore critico. Il fattore per calcolare il LOD con $\alpha = \beta = 0,05$ è quindi $1,65 + 1,65 = 3,30$. Questo fattore è spesso arrotondato per ottenere l'espressione '3s' riportata nello Schema di riferimento rapido 2. Le modalità di calcolo si basano su diverse approssimazioni descritte in letteratura (49).

Il fattore moltiplicativo 3, ottenuto come descritto nel paragrafo precedente, deriva dal valore del t di Student a una coda per infiniti gradi di libertà, arrotondato ad una cifra significativa. Per una stima rigorosa del LOD da un punto di vista statistico, il fattore moltiplicativo utilizzato dovrebbe tenere in considerazione il numero di gradi di libertà associati con la stima di s . Ad esempio, se s è calcolato da 10 misurazioni ripetute, il valore del t di Student, a un livello di significatività $\alpha = 0,05$, è pari a $1,83$ (9 gradi di libertà), quindi il LOD dovrebbe essere calcolato come $3,7s$.

¹⁵ Il testo è basato sulla Guida Eurachem "Terminologia per le misurazioni analitiche" (8).

Appendice C. Analisi della varianza (ANOVA)

Il concetto fondamentale alla base dell'‘analisi della varianza’ (ANOVA) è che quando è possibile raggruppare in un qualche modo una serie di dati ottenuti da misurazioni ripetute, ad esempio per operatore, strumento, giorno, laboratorio, metodo di misura, ecc., la variabilità complessiva dell'intera serie di dati può essere rappresentata attraverso la combinazione delle varianze (s^2) tra i gruppi e interna ai gruppi. L'ANOVA può essere utilizzata per valutare i risultati che derivano da tipologie di studio sperimentali come quella mostrata nella Figura C1. In questo ‘disegno annidato’, le misurazioni ripetute (generalmente ottenute in condizioni di ripetibilità) vengono eseguite in diverse serie analitiche al fine di avere un numero p di gruppi di dati. Per calcolare la ripetibilità intermedia a partire da questo tipo di studio, la variabilità delle condizioni di misura tra le serie analitiche dovrebbe essere la più ampia possibile (giorni differenti, operatori, ecc.).

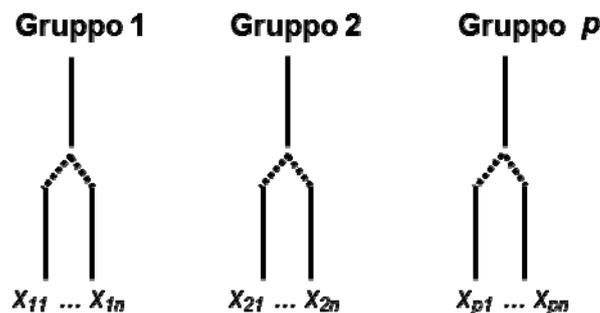


Figura C1. Esempio di ‘disegno annidato’ per un esperimento a partire dal quale possono essere calcolate diverse misure della precisione utilizzando l'ANOVA.

Nella Figura C2 viene mostrata la struttura generale di una tabella esito di una ANOVA ad una via, per un totale di N risultati suddivisi in p gruppi ciascuno con n osservazioni, e con v gradi di libertà. Ciascuna riga della tabella si riferisce ad una differente sorgente di variabilità. La prima riga si riferisce alla variabilità tra le medie dei gruppi; la seconda riga si riferisce alla variabilità interna ai gruppi e la terza riga descrive la variabilità della serie di dati nella loro totalità. I fogli di calcolo e i programmi statistici forniscono anche il valore del test F , il valore critico per il test F , e il corrispondente valore P (probabilità del test).

Sorgente di variabilità	Devianza (Sum of squares, SS)	v	Varianza (Mean square, MS)	F	P	F_{crit}
Tra gruppi	SS_b	$p-1$	$MS_b = SS_b/(p-1)$	MS_b/MS_w		
Entro i gruppi (residui)	SS_w	$N-p$	$MS_w = SS_w/(N-p)$			
Totale	$SS_{tot} = SS_b + SS_w$	$N-1$				

Figura C2. Struttura di una tabella esito per una ANOVA ad una via

I valori che si riferiscono alla variabilità tra gruppi sono quasi sempre indicati o con il termine ‘tra-gruppi’, oppure identificati in base al fattore di raggruppamento (es. operatore, giorno o laboratorio). Per descrivere la variabilità entro i gruppi, nei programmi statistici, manuali, ecc., vengono utilizzati numerosi termini diversi tra cui ‘variabilità intra gruppo’, ‘variabilità residua’, ‘errore’ oppure ‘variabilità della misurazione’ sono tra i più comuni.

Assumendo che il disegno annidato mostrato nella Figura C1, sia stato eseguito in un unico laboratorio, che le misurazioni ripetute entro ciascun gruppo siano state eseguite in condizioni di ripetibilità, e che le condizioni analitiche tra i gruppi siano state variate, la ripetibilità e la ripetibilità intermedia possono essere calcolate come segue.

1. Lo scarto tipo di ripetibilità, s_r , è ottenuto calcolando la radice quadrata della varianza all'interno dei gruppi:

$$s_r = \sqrt{MS_w} \quad (\text{Eq. C1})$$

2. Il contributo alla variabilità totale da parte del fattore di raggruppamento, s_{between} , è anch'esso calcolato a partire dalla tabella ANOVA:

$$s_{\text{between}} = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}} \quad (\text{Eq. C2})$$

3. La ripetibilità intermedia, s_l , può essere calcolata combinando la varianza tra gruppi e la varianza all'interno dei gruppi sopra descritte:

$$s_l = \sqrt{s_r^2 + s_{\text{between}}^2} \quad (\text{Eq. C3})$$

L'esperimento riportato nel paragrafo 6.6.4 può essere descritto come segue. Nell'ambito di un piano per la validazione di un metodo di prova da parte di un laboratorio, sono state eseguite una serie di misurazioni in duplicato nell'arco di otto giorni (Tabella C1). Le misurazioni effettuate in ciascun giorno sono state eseguite in condizioni di ripetibilità ma, nei diversi giorni, da operatori distinti, con strumenti differenti, ecc., allo scopo di simulare le condizioni nelle quali il metodo di prova verrà eseguito nell'uso di routine.

Tabella C1. Esempio di disegno sperimentale che consente di valutare la ripetibilità e la ripetibilità intermedia mediante l'applicazione dell'ANOVA ad una via con un numero accettabile di gradi di libertà

Giorno:	1		2		3		4		5		6		7		8	
Risultato:	$x_{1,1}$	$x_{1,2}$	$x_{2,1}$	$x_{2,2}$	$x_{3,1}$	$x_{3,2}$	$x_{4,1}$	$x_{4,2}$	$x_{5,1}$	$x_{5,2}$	$x_{6,1}$	$x_{6,2}$	$x_{7,1}$	$x_{7,2}$	$x_{8,1}$	$x_{8,2}$

L'ANOVA ad una via può essere utilizzata per separare la variabilità intrinseca al metodo di analisi (ripetibilità) e la variabilità associata alle differenze nelle condizioni di misura, ad esempio, operatori differenti, strumenti diversi, periodi di tempo lunghi (ripetibilità intermedia). È da notare che con questo approccio non è possibile formulare conclusioni inerenti a quale parametro - operatore, strumento, tempo - contribuisca maggiormente alla ripetibilità intermedia ma, in genere, queste informazioni non sono l'obiettivo di un piano per la validazione di un metodo di prova.

Applicando l'ANOVA ad una via ai risultati indicati nella Tabella C1 si otterrà una tabella simile a quella riportata nella Figura C2. Il test F , il valore critico di F e il valore di P permettono di capire immediatamente se la variabilità tra i risultati ottenuti in giorni differenti è significativamente più grande della variabilità dei risultati ottenuti nel medesimo giorno. I valori corrispondenti alle due misure di precisione (s_r e s_l) possono essere calcolati facilmente tramite le equazioni Eq. C1 – Eq. C3 sopra riportate. Il numero di gradi di libertà associato (v) sarà $N-p = 16-8 = 8$ per s_r . Il valore di v per la ripetibilità intermedia è più complesso tuttavia non sarà inferiore a $p-1$, cioè 7 in questo esempio (si veda la Figura C2). Questo rappresenta un ragionevole compromesso tra il carico di lavoro e l'incertezza delle stime della precisione.

Appendice D. Note sull'analisi qualitativa

L'analisi qualitativa segue i principi di base dell'analisi quantitativa, tuttavia si debbono applicare dei concetti specifici quando si descrivono le proprietà del metodo qualitativo e nell'ambito dell'interpretazione dei risultati. Questa Appendice fornisce una breve introduzione all'analisi qualitativa e indica i documenti utili per l'approfondimento di questo argomento.

L'analisi qualitativa è definita dalla IUPAC come segue: “analisi nell'ambito della quale le sostanze sono identificate o classificate sulla base delle loro proprietà chimiche o fisiche, come ad esempio la reattività chimica, la solubilità, il peso molecolare, il punto di fusione, le proprietà radiative (emissione, assorbimento), spettri di massa, emivita nucleare, ecc.” (17). Ciò significa che i risultati sono espressi rispetto ad una scala nominale, con un valore limitato in confronto all'espressione di risultati rispetto ad una scala di rapporti [NdT: con un riferimento accettato]. Perciò l'analisi qualitativa, al posto di quella quantitativa, è consigliata soprattutto per indagini preliminari [NdT: di screening] eseguite con metodi a basso costo oppure quando le concentrazioni degli analiti sono prossime al limite di rivelabilità (LOD).

Un 'metodo qualitativo' di fatto fornisce come risultato un risposta dicotomica 'presente/assente' ad una data concentrazione soglia (*cut-off*) per un analita (55). La validazione dei metodi qualitativi include l'identificazione della concentrazione soglia al fine di 'classificare/diagnosticare una condizione', ad esempio, la presenza o l'assenza di un agente inquinante in un campione di acqua laddove esista una direttiva, una legge, ecc., che definisca la concentrazione soglia da applicare.

Il modo ottimale per la caratterizzazione delle proprietà di un metodo qualitativo è il confronto con i risultati di un metodo quantitativo, con proprietà metrologiche superiori (metodo di conferma), ad esempio un LOD più basso, al fine di determinare lo stato effettivo di presenza/assenza della condizione. Le proprietà di un metodo qualitativo dovrebbero essere determinate ad un certo numero di concentrazioni, al di sotto e al di sopra della concentrazione soglia. L'utilizzo di un metodo quantitativo di conferma è preferibile all'impiego di campioni bianchi addizionati o meno con la sostanza in esame.

Per i metodi qualitativi, la precisione non può essere espressa in termini di scarto tipo o di scarto tipo relativo ma potrebbe essere rappresentata dai tassi di risultati, rispettivamente, veri e falsi positivi e veri e falsi negativi (55, 85-87) [NdT: per la definizione, si veda il paragrafo 6.2.6]. Questo concetto viene illustrato nella Figura D1.

	Campioni con concentrazioni effettivamente superiori al valore soglia	Campioni con concentrazioni effettivamente inferiori al valore soglia	
Risultati positivi	Risultati 'veri positivi'	Risultati 'falsi positivi' (errore tipo I)	Numero totale di risultati positivi
Risultati negativi	Risultati 'falsi negativi' (errore tipo II)	Risultati 'veri negativi'	Numero totale di risultati negativi
	Numero totale di campioni con concentrazioni superiori al valore soglia	Numero totale di campioni con concentrazioni inferiori al valore soglia	

Figura D1. Tabella 2 × 2 utile come base per calcolare i tassi di risultati, rispettivamente, veri e falsi positivi e veri e falsi negativi

La ‘sensibilità diagnostica’ [NdT: tasso di risultati veri positivi] è la proporzione di campioni affetti da una condizione, ad esempio la concentrazione al di sopra del valore soglia, che fornisce un risultato positivo del test qualitativo. La sensibilità diagnostica è una caratteristica fondamentale di un metodo qualitativo che esprime la capacità del metodo di rivelare piccole quantità di analita in un campione al fine di indicare la risposta dicotomica presente/assente ad un livello di probabilità predefinito.

$$\text{Sensibilità diagnostica} = \frac{\text{numero di risultati veri positivi}}{\text{numero totale dei campioni con condizione}} \quad (\text{Eq. D1})$$

La ‘specificità diagnostica’ [NdT: tasso di risultati veri negativi] è la proporzione di campioni senza una condizione, ad esempio con una concentrazione di analita al di sotto del valore soglia, che fornisce un risultato negativo del test qualitativo.

$$\text{Specificità diagnostica} = \frac{\text{numero dei risultati veri negativi}}{\text{numero totale dei campioni senza condizione}} \quad (\text{Eq. D2})$$

Anche in questo caso, si dovrebbe utilizzare il confronto con i dati di un metodo quantitativo di conferma, se disponibile. Altrimenti, possono essere utilizzati campioni bianchi addizionati o meno con la sostanza in esame.

I parametri fondamentali per la qualità delle misurazioni in un metodo qualitativo sono il LOD e il valore soglia (Figura D2). Il LOD è definito in modo simile a quanto viene riportato nell’ambito delle analisi quantitative: la concentrazione di un analita che fornisce un segnale che può essere statisticamente distinto dalla media dei segnali ottenuti da appropriati campioni bianchi. Il valore limite di soglia, se correttamente determinato, è quello in cui i tassi di risultati falsi negativi concentrazioni superiori al limite sono bassi – rispetto ad una probabilità stabilita. Nell’ambito della validazione viene valutato il limite di soglia proposto, riportato nella procedura.

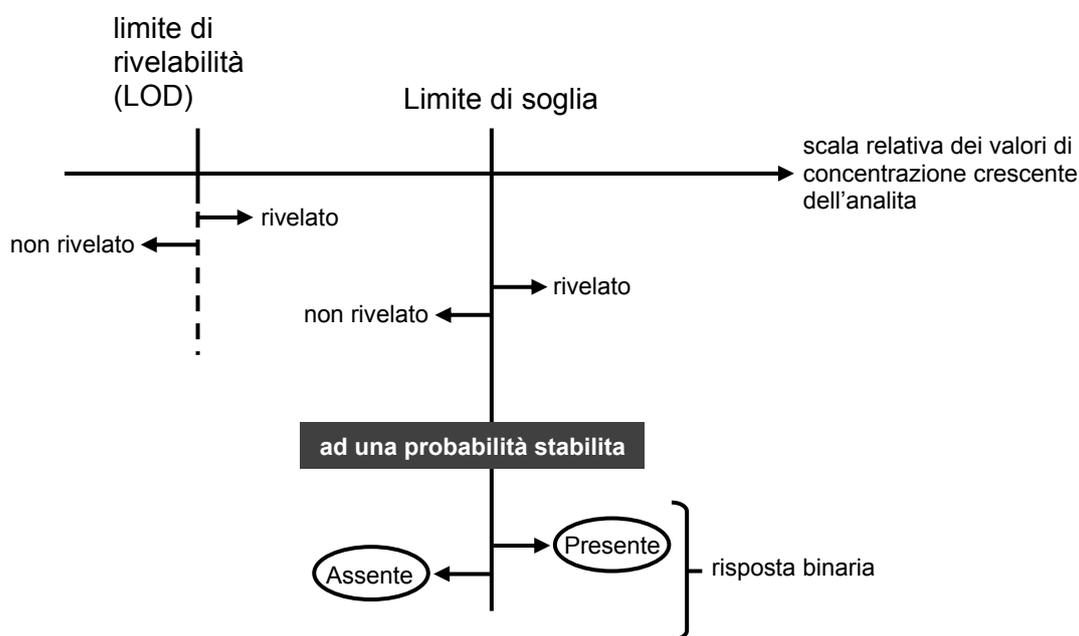


Figura D2. Due riferimenti quantitativi determinano la risposta dicotomica nell’ambito della qualificazione/classificazione dei campioni sottoposti ad un’analisi qualitativa: 1. Il limite di rivelabilità (LOD) che è intrinseco al metodo; 2. il limite di soglia indicato nella procedura documentata. Essi sono posti in una scala immaginaria a concentrazione crescente. Nella zona di rivelabilità, al di sopra del LOD, il limite di soglia permette di distinguere zone di concentrazione per quell’analita in cui la risposta binaria è fornita correttamente, cioè ‘assente’ al di sotto del limite e ‘presente’ al di sopra di esso

Ci sono molti altri concetti utilizzati nell'ambito dell'analisi qualitativa (Tabella D1). I 'valori predittivi' dei risultati possono essere incrementati aumentando la prevalenza di concentrazioni superiori al valore di soglia nei campioni analizzati tramite il metodo qualitativo, ad esempio per mezzo di altre sorgenti di informazioni rispetto a quelle del metodo chimico qualitativo. Questo migliorerà sostanzialmente il valore pratico del metodo di misura qualitativo.

La 'selettività' di un metodo qualitativo è un concetto ordinale che descrive la misura in cui analiti diversi da quello incluso nella specifica interferiscono con l'analisi. Questa caratteristica fondamentale del metodo può essere anche definita come la capacità del metodo di produrre risultati che non sono influenzati dall'effetto matrice. Migliore è la selettività, maggiore è la certezza nell'identificazione e classificazione del campione.

Tabella D1. Definizioni dei concetti che descrivono le proprietà diagnostiche di metodi di misura, inclusi quelli qualitativi, e relative modalità di calcolo

Concetto (simbolo)	Descrizione	Formula
Rapporto di probabilità positivo (<i>positive Likelihood Ratio, LR+</i>)	Rapporto tra il tasso di risultati veri positivi e quello di risultati falsi positivi.	$LR+ = \frac{\text{sensibilità diagnostica}}{1 - \text{specificità diagnostica}}$
Rapporto di probabilità negativo (<i>negative Likelihood Ratio, LR-</i>)	Rapporto tra il tasso di risultati falsi negativi e quello di risultati veri negativi.	$LR- = \frac{1 - \text{sensibilità diagnostica}}{\text{specificità diagnostica}}$
Odds Ratio diagnostico (<i>Diagnostic Odds Ratio, DOR</i>)	Questo concetto combina i concetti di sensibilità, di specificità, e di rapporto di probabilità in un solo numero.	$DOR = \frac{LR+}{LR-}$
Valore predittivo positivo (<i>Positive Predictive Value, PPV</i>)	La proporzione di campioni con un risultato positivo al test qualitativo che presentano la condizione. Tiene in considerazione la prevalenza della condizione nella popolazione di campioni oggetto del test.	$PPV = \frac{\text{numero di risultati veri positivi}}{\text{numero totale di risultati positivi}}$
Valore predittivo negativo (<i>Negative Predictive Value, NPV</i>)	La proporzione di campioni con un risultato negativo al test qualitativo che non presentano la condizione. Tiene in considerazione la prevalenza della condizione nella popolazione di campioni oggetto del test.	$NPV = \frac{\text{numero di risultati veri negativi}}{\text{numero totale di risultati negativi}}$

Bibliografia

1. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 2005. (Traduzione italiana: UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005).
2. ISO 15189. Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence. Geneva: International Organization for Standardization; 2012. (Adottata in Italia come: UNI EN ISO 15189. Laboratori medici - Requisiti riguardanti la qualità e la competenza. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2013).
3. ISO 15195. *Laboratory medicine – Requirements for reference measurement laboratories*. Geneva: International Organization for Standardization; 2003. (Adottata in Italia come: UNI EN ISO 15195. Medicina di laboratorio - Requisiti per i laboratori che eseguono misure di riferimento. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004).
4. Miller JN. Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review. *Analyst* 1991;116:3-14.
5. Miller JC, Miller JN. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 6th edition. Harlow: Pearson; 2010.
6. Ellison SLR, Barwick VJ, Duguid Farrant TJ. Practical statistics for the analytical scientist. A bench guide. 2nd edition. Cambridge: RSC Publishing; 2009.
7. JCGM 200:2012. *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM 3rd edition)*. Paris: Joint Committee for Guides in Metrology; 2012. Disponibile all'indirizzo www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html; ultima consultazione 14/09/2016. Adottata come ISO/IEC Guide 99. Geneva: International Organization for Standardization /International Electrotechnical Commission; 2007. (Traduzione italiana: UNI CEI 70099. Vocabolario Internazionale di Metrologia - Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM). Milano, Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.)
8. Barwick VJ, Prichard E (Ed.). *Eurachem Guide. Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3*. Eurachem; 2011. Disponibile all'indirizzo www.eurachem.org; ultima consultazione 14/09/2016. (Traduzione italiana: Belli M, Patriarca M, Sega M (Ed.). Guida Eurachem. Terminologia per le misurazioni analitiche – Introduzione al VIM 3. Traduzione italiana. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. Rapporti ISTISAN 13/41). Disponibile all'indirizzo: http://www.iss.it/binary/publ/cont/13_41_web.pdf; ultima consultazione 14/09/2016
9. ISO 9000:2005. *Quality management systems – Fundamentals and vocabulary*. Geneva: International Organization for Standardization; 2005. (Traduzione italiana: UNI EN ISO 9000. Sistemi di gestione per la qualità - Fondamenti e vocabolario. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005).
10. ISO 9001:2008. *Quality management systems – Requirements*. Geneva: International Organization for Standardization; 2008. (Traduzione italiana: UNI EN ISO 9001. Sistemi di gestione per la qualità - Requisiti. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008).
11. ISO Online Browsing Platform (OBP). Disponibile all'indirizzo: <https://www.iso.org/obp/ui/>; ultima consultazione 14/09/2016.
12. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report) *Pure Appl Chem* 2002;74(5):835.
13. ICH Guideline. *Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2(R1)*. Geneva: International Council for Harmonisation; 2005. Disponibile all'indirizzo: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
14. ISO 80000-1:2009 *Quantities and units – Part 1: General*. Geneva: International Organization for Standardization; 2009.
15. Ramsey MH and Ellison SLR (Ed.) *Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide. Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches*. Eurachem; 2007. Disponibile all'indirizzo www.eurachem.org/index.php/publications/; ultima consultazione 14/09/2016.

16. Thompson M. (Ed.) *Terminology – the key to understanding analytical science. Part 2: Sampling and sample preparation*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2005. (Analytical Methods Committee Technical Brief, AMCTB No. 19). Disponibile all'indirizzo: http://www.rsc.org/images/sampling-sample-preparation-technical-brief-19_tcm18-214856.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
17. International Union of Pure and Applied Chemistry. *Compendium of chemical terminology (Gold Book)*. Version 2.3.3. Durham, NC: IUPAC; 2014. Disponibile all'indirizzo: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>; ultima consultazione 14/09/2016.
18. International Union of Pure and Applied Chemistry. *Compendium of analytical nomenclature (Orange Book)*. Durham, NC: IUPAC; 2002. Disponibile all'indirizzo: http://media.iupac.org/publications/analytical_compendium/; ultima consultazione 14/09/2016.
19. The FEM Microbiology Action Team. *Method validation of U.S. Environmental Protection Agency microbiological methods of analysis*. The EPA Forum on Environmental Measurements (FEM); 2009. (FEM Document Number 2009-01). Disponibile all'indirizzo https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-01/documents/final_microbiology_method_guidance_110409.pdf; ultima consultazione 14/09/2016
20. ISO 10012:2003 *Measurement management systems - Requirements for measurement processes and measuring equipment*. Geneva: International Organization for Standardization; 2003. (Traduzione italiana: UNI EN ISO 10012. Sistemi di gestione della misurazione - Requisiti per i processi e le apparecchiature di misurazione. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004).
21. JCGM 100:2008. *Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)* (1st edition 2008; corrected version 2010). Joint Committee for Guides in Metrology; 2008. Disponibile all'indirizzo http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf; ultima consultazione 14/09/2016. Adottata come ISO/IEC Guide 98-3:2008. Geneva: International Organization for Standardization; 2008. (Traduzione italiana: UNI CEI 70098-3. Incertezza di misura – Parte 3: Guida all'espressione dell'incertezza di misura. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2016).
22. Ellison SLR, Williams V (Ed.). *Eurachem/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3rd edition. Eurachem; 2012. Disponibile all'indirizzo: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
23. Irish National Accreditation Board. *Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories (ISO 17025)*. Dublin: INAB; 2012. (INAB Guide PS15). Disponibile all'indirizzo: <http://www.inab.ie/Documents-Forms/Policy/Guide-to-Method-Validation-for-Quantitative-Analysis-in-Chemical-Testing-Laboratories-17025-PDF-36-Pages-349KB-.pdf>; ultima consultazione 14/09/2016.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. *User verification of performance for precision and trueness; Approved guideline – 2nd edition. CLSI document EP15-A2*. Wayne, PA: CLSI; 2005.
25. Interlaboratory Collaborative Study. *Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*. Rockville, MD: Association Of Analytical Communities-AOAC International; 2002. Disponibile all'indirizzo: http://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/Collaborative_Study_Validation_Guidelines.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
26. Horwitz W (Ed.). Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 1995;67(2):331-43.
27. ASTM International. *E1601-12: Standard practice for conducting an interlaboratory study to evaluate the performance of an analytical method*. West Conshohocken, PA: ASTM; 2012.
28. CEN/TR 10345:2013. *Guideline for statistical data treatment of inter laboratory tests for validation of analytical methods*. Brussels: European Committee for Standardization (CEN: Comité Européen de Normalisation), 2013.
29. ISO 5725:1994. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parts 1-6*. Geneva: International Organization for Standardization; 1994. (Traduzione italiana: UNI ISO 5725. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione. Parti 1-6. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004)
30. ISO Guide 30:1992/Amd 1:2008. *Terms and definitions used in connection with reference materials*. Geneva: International Organization for Standardization; 1992.

31. Thompson M, Lowthian P J. *Notes on statistics and data quality for analytical chemists*. Imperial College Press. London, 2011.
32. Mullins E. *Statistics for the quality control chemistry laboratory*. Cambridge: RSC Publishing; 2003.
33. Funk W, Dammann V, Donnevert G. *Quality assurance in analytical chemistry: Applications in environmental, food, and materials analysis, biotechnology, and medical engineering*. 2nd edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
34. Kallner A. *Laboratory statistics. Handbook of formulas and terms* (1st edition). Elsevier; 2013.
35. FAO/WHO. *Codex Alimentarius Commission - Procedural Manual*. 21st edition. Rome: Joint FAO/WHO Food Standards Programme; 2013. Disponibile all'indirizzo: www.codexalimentarius.org/procedures-strategies/procedural-manual/it/; ultima consultazione 14/09/2016.
36. Europa. Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 330 del 5 dicembre 1998
37. Europa. Direttiva 2009/90/CE della Commissione del 31 luglio 2009 che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 201 del 1° agosto 2009.
38. Europa. Decisione 2002/657/CE della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 221 del 17 agosto 2002.
39. European Commission. *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed*. Brussels: European Commission; 2013. (SANCO/12571/2013).
40. Thompson M (Ed). *The amazing Horwitz function*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2004. (Analytical Methods Committee Technical Brief, AMCTB No. 17). Disponibile all'indirizzo: http://www.rsc.org/images/horwitz-function-technical-brief-17_tcm18-214859.pdf; ultima consultazione 7/12/2016.
41. Vessman J, Stefan RI, van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Thorburn Burns D, Fajgelj A, Müller H. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl Chem* 2001;73(8):1381.
42. National Association of Testing Authorities. *Technical Note 17 – Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative methods*. Sydney: NATA; 2012. Disponibile alla pagina: www.nata.com.au/nata/phocadownload/publications/Guidance_information/tech-notes-information-papers/; ultima consultazione 14/09/2016.
43. Theodorsson E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis* 2012;4(3):305.
44. Thompson M (Ed). *Standard additions: myth and reality*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2009. (Analytical Methods Committee Technical Brief, AMCTB No. 37). Disponibile all'indirizzo: http://www.rsc.org/images/myth-reality-technical-brief-37_tcm18-214868.pdf; ultima consultazione 7/12/2016.
45. ISO 11843-1:1997/Cor 1:2003. *Capability of detection – Part 1: Terms and definitions*. Geneva: International Organization for Standardization; 1997. (Adottata come UNI ISO 11843-1, Capacità di rivelazione - Parte 1: Termini e definizioni. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2009).
46. ISO 11843-2:2000. *Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case*. Geneva: International Organization for Standardization; 2000. (Adottata come UNI ISO 11843-2, Capacità di rivelazione - Parte 2: Metodologia nel caso di taratura lineare. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2009).
47. ISO 11843-3:2003. *Capability of detection – Part 3: Methodology for determination of the critical value for the response variable when no calibration data are used*. Geneva: International Organization for Standardization (ISO); 2003. (Adottata come UNI ISO 11843-3, Capacità di rivelazione - Parte 3: Metodologia per la determinazione del valore critico della variabile dipendente quando non si utilizzano dati di taratura. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2009).
48. ISO 3534. *Statistics – Vocabulary and symbols – Part 1: General statistical terms and terms used in probability (2006); Parts 2: Design of experiments (2006); Parts 3: Design of experiments (2013)*, Geneva: International Organization for Standardization. (Adottata come UNI ISO 3534, Statistica -

- Vocabolario e simboli - Parte 1: Termini statistici generali e termini utilizzati nel calcolo delle probabilità; Parte 2: Statistica applicata; parte 3: Progettazione di esperimenti. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2014).
49. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Appl Chem* 1995;67(10):1699.
50. Currie LA. *Detection in analytical chemistry – Importance, theory, and practice*. ACS Symposium Series 361. Washington, DC: American Chemical Society; 1988.
51. Analytical Methods Committee. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst* 1987;112:199.
52. Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* 2011;2(1):21.
53. United States Pharmacopeia. *Validation of compendial methods, 26th revision. National Formulary, 21st edition*. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention Inc.; 2003.
54. Europa. Regolamento (CE) 333/2007 della Commissione del 28 marzo relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* L 88;29/03/2007:29-38.
55. Valcárcel M, Cárdenas S, Barceló D, Buydens L, Heydorn K, Karlberg B, Klemm K, Lendl B, Milman B, Neidhart B, Ríos Á, Stephany R, Townshend A, Zschunke A. *Metrology of qualitative chemical analysis: Project Report EUR 20605*. Luxembourg: European Commission; 2002.
56. Sahai H, Singh RP. The use of R² as a measure of goodness of fit: An overview. *Virginia Journal of Science* 1989;40(1):5.
57. Analytical Methods Committee. Uses (proper and improper) of correlation coefficients. *Analyst* 1988;113:1469.
58. ISO 11732:2005. *Water quality – Determination of ammonium nitrogen – Method by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection*. Geneva: International Organization for Standardization; 2005. (Adottata come: UNI EN ISO 11732. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'azoto ammoniacale - Metodo per analisi in flusso (CFA e FIA) e rivelazione spettrometrica. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005).
59. Menditto A, Patriarca M, Magnusson B. Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accred Qual Assur* 2007;12:45.
60. Burns DT, Danzer K, Townshend A. Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002). *Pure Appl Chem* 2002;4(11):2201.
61. Ellison SLR, King B, Rösslein M, Salit M, Williams A (Ed.). *Eurachem/CITAC Guide. Traceability in chemical measurement – A guide to achieving comparable results in chemical measurement*. Eurachem; 2003. Disponibile all'indirizzo: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/EC_Trace_2003.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
62. De Bièvre P, Dybkaer R, Fajgelj A, Brynn Hibbert D. Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2011;83(10): 1873.
63. Thompson M (Ed). *The estimation and use of recovery factors*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2008. (Analytical Methods Committee Technical Brief, AMCTB No. 21A). Disponibile all'indirizzo: http://www.rsc.org/images/recovery-factors-technical-brief-21A_tcm18-214880.pdf; ultima consultazione 7/12/2016.
64. ISO Guide 33:2000. *Uses of certified reference materials*. Geneva: International Organization for Standardization; 2000.
65. Linsinger T. *Comparison of a measurement result with the certified value*. European. Geel: European Commission - Joint Research Centre Institute for Reference Materials and Measurements; 2010. (Application note 1; ERM). Disponibile all'indirizzo: http://www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/application_note_1/Documents/erm_application_note_1_english_rev3.pdf; ultima consultazione: 14/09/2016.
66. Magnusson B, Näykki T, Hovind H, Krysell M. *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*. Oslo: Nordic Innovation; 2012. (Nordtest Technical Report TR 537 (ed. 3.1).

2012. Disponibile all'indirizzo: http://www.nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/nt_tr_537_ed3_1_English_Handbook%20for%20Calculation%20of%20Measurement%20uncertainty%20in%20environmental%20laboratories.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
67. ISO 21748:2010. *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation*. Geneva: International Organization for Standardization; 2010.
68. Eurolab. *Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation*. Brussels: Eurolab; 2007. (Eurolab Technical Report 1/2007). Disponibile all'indirizzo: http://www.eurolab.org/documents/Technical_Report_Measurement_Uncertainty_2007.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
69. Ellison SLR, Williams A. Measurement uncertainty: the key to the use of recovery factors? In: Parkany M (Ed.). *The use of recovery factors in trace analysis*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1996, p. 30-7.
70. Barwick VJ, Ellison SLR. Measurement uncertainty: approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery. *Analyst* 1999;124:981.
71. Ellison SLR, Barwick VJ. Estimating measurement uncertainty: Reconciliation using a cause and effect approach. *Accred Qual Assur* 1998;3:101-5.
72. O'Donnell GE, Hibbert DB. Treatment of bias in estimating measurement uncertainty. *Analyst* 2005;130:721.
73. Magnusson B, Ellison SLR. Treatment of uncorrected measurement bias in uncertainty estimation for chemical measurements. *Anal Bioanal Chem* 2008;390:201.
74. Youden WJ, Steiner EH. *Statistical Manual of the AOAC (Association of Official Analytical Chemists)*. Rockville, MD: AOAC International; 1975.
75. Thompson M, Wood R. Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. IUPAC Technical Report. *Pure Appl Chem* 1995;67(4):649.
76. Hovind H, Magnusson B, Krysell M, Lund U, Mäkinen I. *Internal quality control – Handbook for chemical laboratories*. Oslo: Nordic Innovation; 2011. (Nordtest Technical Report TR 5694th ed.). Disponibile all'indirizzo: http://www.nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/nt%20tr%20569_ed4_en%20internal%20quality%20control%20%20handbook%20for%20chemical%20laboratories.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
77. ISO 7870:2014. *Control charts – Parts 1-5*. Geneva: International Organization for Standardization; 2014. (Adottata come: UNI ISO 7870. Carte di controllo – Parti 1-5. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2014).
78. Analytical Methods Committee. *A simple fitness-for-purpose control chart based on duplicate results obtained from routine test materials*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2002. (AMC Technical Brief No. 9). Disponibile all'indirizzo: www.rsc.org/M http://www.rsc.org/images/duplicate-results-technical-brief-9_tcm18-214876.pdf; ultima consultazione 7/12/2016.
79. ISO/IEC 17011:2004. *Conformity assessment – General requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies*. Geneva: International Organization for Standardization; 2004. (Traduzione italiana: UNI CEI EN ISO/IEC 17011. Valutazione della conformità - Requisiti generali per gli organismi di accreditamento che accreditano organismi di valutazione della conformità. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005).
80. ISO/IEC 17043:2010. *Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*. Geneva: International Organization for Standardization; 2010. (Traduzione italiana: UNI CEI EN ISO/IEC 17043. Valutazione della conformità - Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2010).
81. Mann I, Brookman B (Ed.). *Eurachem Guide. Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories. 2nd edition 2011*. Eurachem; 2011. Disponibile all'indirizzo: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Eurachem_PT_Guide_2011.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
82. EA-4/18:2010. *Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation*. Paris: European cooperation for Accreditation; 2010. Disponibile all'indirizzo: http://www.accredia.it/UploadDocs/327_EA_4_18.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.

83. ISO 78-2:1999. *Chemistry – Layouts for standards - Part 2: Methods of chemical analysis*. Geneva: International Organization for Standardization; 1999.
84. Ellison SLR, Williams A (Ed.). *Eurachem/CITAC Guide. Use of uncertainty information in compliance assessment*. Eurachem; 2007. Disponibile all'indirizzo: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Interpretation_with_expanded_uncertainty_2007_v1.pdf; ultima consultazione 14/09/2016.
85. Galen RR, Gambino SR. *Beyond normality: The predictive value and efficiency of medical diagnoses*. John Wiley, New York, 1975.
86. Pepe MS. *The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction*. Oxford: Oxford University Press; 2003.
87. Zhou X-H, Obuchowski NA, Mcclish DK. *Statistical methods in diagnostic medicine*. 2nd edition. New York: Wiley-Interscience, 2011.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre, 9° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, dicembre 2016