


P02.11			 Pag. 1 di 10
Validazione dei metodi di prova			
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17
Giovanni Scognamiglio	Elisabetta Piccirillo	Rocco Abruzzese	Rev. 2 del 16.01.19

Lista di Distribuzione

ente emittente

RSGQA

Enti destinatari

Direzione Generale
Direzione Commerciale
Direzione Tecnica
Responsabile e addetti Ufficio Tecnico
Direzione Amministrativa
Resp. Sistema Gestione Qualità e Ambiente
Responsabile e tecnici di Laboratorio
Responsabile e tecnici Campionamenti e rilievi
Responsabile Amministrazione
Addetto al Magazzino

Questa procedura è sottoposta a distribuzione controllata e quindi ne è assicurato l'aggiornamento in relazione alla suddetta lista di distribuzione.

L'aggiornamento delle altre copie non è assicurato.

Il destinatario del documento deve restituire al resp. SGQ copia di questa pagina datata e firmata per conferma di ricezione e deve distruggere la precedente versione del documento non più valida.


Il presente documento è operativo il 10° giorno di calendario dalla data di emissione.

Storia del Documento

Rev.	Data	Descrizione modifiche
000	07.06.17	Prima emissione
001	15.12.17	Commento Accredia n.13
002	16.01.19	Aggiornamenti

ALLEGATO 1 "VALIDAZIONE METODO DI PROVA"

ALLEGATO 2 "ELENCO LOQ PER ANALITA E MATRICE"

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 2 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

1. SCOPO

Scopo della presente procedura è quello di definire le attività necessarie per la validazione del metodo di prova.

2. APPLICABILITA' E RESPONSABILITA'

Questa procedura si applica a tutti i metodi analitici accreditati e non utilizzati nel laboratorio della Ecosistem. E' di responsabilità del Responsabile di laboratorio insieme al Direttore Tecnico e il RSGQA tenere sotto controllo l'intero processo.

3. RIFERIMENTI

La presente procedura è redatta in conformità al requisito 7.2 “Selezione, verifica e validazione dei metodi di prova” della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 e al documento ACCREDIA RT-08.

I documenti cui si fa riferimento si intendono applicabili nel loro ultimo stato di revisione/aggiornamento.


4. MODALITÀ OPERATIVE

Il laboratorio di prova accreditato, per rispondere alla prescrizione della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, deve essere in grado di porre in evidenza oggettiva le performance specifiche del metodo e mantenerle nel tempo. Questa operazione viene intesa come validazione anche se per i metodi ufficiali e/o normalizzati la validazione si intende effettuata dall'ente che li ha emessi. Si confrontano le specifiche prestazionali trovate con quelle riportate nel metodo, laddove presenti.

La validazione del metodo consiste in una serie di test che permettono di stabilire le caratteristiche prestazionali del metodo, ovvero che il metodo sia realmente adattabile ad un preciso scopo analitico.

La validazione del metodo viene effettuata una volta o a seguito di variazioni in termini strumentali, di matrice, di operatore ecc: essa indica le vere prestazioni sperimentali aspettate dal metodo.

La dimostrazione dei criteri di seguito indicati deve essere posta in evidenza attraverso il foglio elettronico “Allegato 1.

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 3 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

Validazione del metodo

Nella validazione del metodo bisogna intervenire in maniera diversa se si tratta di metodi normalizzati e/o ufficiali con o senza dati prestazionali.

Nei normalizzati e/o ufficiali con dati prestazionali devono essere infatti verificati e trascritti:

- Limite di rivelabilità LOD
- Limite di quantificazione LOQ
- Calibrazione ed Intervallo di linearità
- Incertezza

In quelli normalizzati e/o ufficiali senza dati prestazionali oltre i precedenti parametri devono essere determinati e sottoposti a verifica:

- Precisione e Ripetibilità
- Esattezza

Inoltre devono essere effettuati tutti i controlli previsti nel metodo stesso. Nel caso in cui il metodo abbia requisiti specifici più restrittivi di quelli descritti in questa procedura, devono essere rispettate quelle precise condizioni. Inoltre bisogna confrontarsi con i dati qualità del metodo se riportati.

Qualora il laboratorio avesse la necessità di adottare un metodo non normalizzati e/o ufficiali ovvero metodo interno la validazione avviene seguendo il punto 7.2.2 della 17025:2018 e dell'RT-08.

Di seguito sono elencate definizioni e procedure per la verifica dei parametri richiesti.

Precisione e Ripetibilità

La precisione è la bontà dell'accordo tra i risultati di n prove indipendenti e successive ottenute in condizioni fissate. Di solito è specificato in termini di deviazione standard o di deviazione standard relativa.


Ripetibilità è un tipo di precisione.

Lavorare in condizioni di *ripetibilità* vuol dire rispettare le seguenti condizioni:

- Deve essere mantenuto lo stesso metodo di misurazione;
- devono essere effettuate dallo stesso operatore;
- devono essere effettuate con lo stesso strumento di misura;
- devono essere fatte nel medesimo luogo;
- devono essere effettuate con le medesime condizioni di utilizzo dello strumento e del misurando;
- devono essere effettuate in un breve periodo.

Procedura

Si effettuano 6 repliche di analisi di campioni a concentrazione nota ad almeno 3 distinti livelli di concentrazione rispetto al range operativo, possibilmente equidistanti tra loro nelle condizioni cui

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 4 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

sopra. Tra i livelli di concentrazioni sicuramente si analizza il LOQ che viene fissato come descritto nel paragrafo relativo.

Attraverso l'utilizzo del foglio di calcolo delle incertezze relativo al metodo, allegato 1 P02.09 si ottengono automaticamente una serie dei parametri di seguito elencati:

Scarto (o incertezza) tipo di ripetibilità	Varianza di ripetibilità	Coefficiente di variazione	Limite di ripetibilità
$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$	$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}$	$CV\% = \frac{s}{\bar{X}}$	$r = 2 \cdot \sqrt{2} \cdot s$

Calcolare il CV% ai tre livelli ed evidenziare quello con il valore più alto.

Si calcola r per ogni livello di concentrazione, definito come il parametro con il quale si deve confrontare la differenza tra dati in doppio ottenuti in condizioni di ripetibilità (la definizione vale anche per le condizioni di ripetibilità intermedia o riproducibilità). Il limite di ripetibilità, r , è il valore massimo, prevedibile ad un certo livello di fiducia, della differenza assoluta tra due risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità: se nelle normali condizioni di lavoro la differenza tra due risultati è maggiore di r , i risultati sono sospetti.

Viene calcolato il limite di ripetibilità relativo per ogni livello di concentrazione ne viene fatto il valore medio da considerare per le carte di controllo.

Quindi bisogna sempre verificare che

$$X_1 - X_2 \leq r$$

Verificare, inoltre, all'atto di validazione del metodo anche la relazione

$$A \leq \frac{s}{\sigma} \leq B$$

dove:

s è lo scarto tipo sperimentale ricavato del metodo utilizzato;


σ è lo scarto tipo assegnato dal metodo, o in mancanza di esso, indicato dall'organismo che fornisce la prova interlaboratorio;

A e B sono limiti di fiducia, relativamente, minimi ($p = 0,025$) e massimi ($p = 0,0975$) in funzione dei gradi di libertà $v = n - 1$, dove n è il numero di prove. Poiché usualmente verranno effettuate 6 repliche: $A = 0,408$; $B = 1,602$.

Esattezza

L'esattezza è la concordanza tra un risultato del test e il valore di riferimento accettato della proprietà in misurazione. L'esattezza si afferma quantitativamente in termini di *bias*: quanto più è basso questo parametro, tanto più è alta l'esattezza. Il *bias* è determinato generalmente confrontando la risposta del metodo con i CRM (materiali di riferimento certificati).

Il bias può essere riscontrato a vari livelli di organizzazione in un sistema analitico, per esempio, il bias di batch, bias del laboratorio e il bias del metodo. È importante far sempre riferimento a quale di essi ci si riferisce.

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 5 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

In particolare:

- La media di una serie di analisi di un materiale di riferimento certificato, effettuata interamente all'interno di un singolo batch, fornisce informazioni circa la somma dei bias di metodo, di laboratorio, e l'effetto di esecuzione per quel periodo specifico;
- La media di analisi ripetute di un materiale di riferimento certificato in diversi batch, stima l'effetto combinato del bias di metodo e di laboratorio

I CRM sono materiali conformi a standard internazionali con un'incertezza nota, che possono essere utilizzati per affrontare tutti gli aspetti dei bias (metodo, laboratorio, e intra-laboratorio) simultaneamente, partendo dal presupposto che non vi sia una interferenza prodotta dalla matrice. È importante garantire che il valore di incertezza certificato sia sufficientemente piccolo per consentire il rivelamento di un bias di importante entità.

Procedura

Eeguire un'analisi del bianco di metodo e 6 repliche di un CRM ad una concentrazione tale che lo strumento possa trovarsi in condizioni di leggere valori in un range medio-alto. Calcolare il valore medio del bianco e sottrarlo a quelli delle repliche CRM. Calcolare il valore medio di concentrazione delle repliche CRM X_m , la deviazione standard relativa s , quindi verificare la seguente relazione:

$$t_{calc} = \frac{|C_{CRM} - X_m|}{\sqrt{\frac{s^2}{n} + u_{CRM}^2}} \leq t_{p,v}$$


t_{calc} = valore di Student (tabellato); p = intervallo di confidenza, generalmente fissato a 0,95 e gradi di libertà $v=n-1$, u_{CRM} = incertezza associata al materiale di riferimento certificato; in queste condizioni $t_{calc} = 2,0150$

Se non fosse disponibile un CRM in commercio è possibile utilizzare una matrice esente fortificata con analiti ad un preciso livello di concentrazione.

Limite di rivelabilità LOD e limite di quantificazione LOQ

Il limite di rivelabilità, o minima quantità rivelabile (LOD), è la concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco, ovvero la concentrazione corrispondente al minimo segnale significativo, S_s . S_s è un segnale vicino a quello del bianco (soluzione in cui l'analita è virtualmente assente), ma da esso significativamente differente, e quindi assegnabile all'analita sulla base di un criterio specifico. La definizione del LOD dipenderà dal criterio usato per accertarsi che il segnale sia significativamente diverso da quello del bianco.

Quando un segnale è maggiore del limite di rivelabilità è possibile affermare che l'analita è presente nel campione, ma per stabilire il limite oltre il quale è legittimo eseguire misure quantitative è necessario definire il limite di quantificazione LOQ.

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 6 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

Il presente paragrafo indica la procedura per il calcolo dei limiti LOD e LOQ, basato sulle analisi effettuate allo strumento sotto le stesse condizioni operative riferimento tratto dalla pubblicazione IUPAC su Pure and Applied Chemistry vol. 69, n° 2.

Procedura

Si effettuano 10 repliche di bianco strumentale utilizzando condizioni analitiche operative, quindi si estrapola dalle 10 misure il valore medio X_i e la deviazione standard S_{bi} .

Utilizzando le eguaglianze:

$$X_{bR} = X_i + k_R \cdot S_{bi} \quad \text{e} \quad X_{bQ} = X_i + k_Q \cdot S_{bi} \quad (\text{con } k_R=3 \text{ e } k_Q=10)$$

dove

X_{bR} = valore misurando corrispettivo al LOD

X_{bQ} = valore misurando corrispettivo al LOQ

X_i = valore misurando del bianco

S_{bi} = scarto tipo del bianco

Da cui ottengono i valori in misurando per la Rivelabilità e la Quantificazione. I valori X_i dalle relazioni precedenti devono essere eliminati se durante l'elaborazione dei dati in routine il valore del campione è corretto del bianco, portando così alla forma semplificata:

$$X_{bR} = k_R \cdot S_{bi} \quad \text{e} \quad X_{bQ} = k_Q \cdot S_{bi}$$

Infine, i limiti si ottengono attraverso le relazioni:

$$C_R(\text{LOD}) = (X_{bR}/a) \quad \text{e} \quad C_Q(\text{LOQ}) = (X_{bQ}/a)$$

dove:

a è la *pendenza* della curva di calibrazione misurando Vs Concentrazione.

Il laboratorio, nella persona del Direttore tecnico, decide di dichiarare come LOQ :

- il valore più basso della retta di calibrazione;
- il valore che si ottiene applicando il requisito di prestazione del metodo richiesto dalla Norma o legge di riferimento;
- il valore scelto in base al principio di precauzionalità in funzione dei limiti di legge (questo viene riportato nel relativo MRP). Tale LOQ deve essere comunque maggiore al limite più basso della retta di taratura.


a seconda dell'analita e della matrice purché si verifichi sempre che:

$$LOQ \leq LOQ_{\text{dichiarato}}$$

In caso non si verifichi la condizione allora si lavora sul LOQ sperimentale. I LOQ dichiarati vengono indicati nelle relative procedure di prova e riassunti in allegato 2 e/o nell'MRP relativo.

Rispetto alle sommatorie di analiti il laboratorio determina il valore con l'approccio "upper bound" per i campioni identificati per natura campione alimento. Per tutti gli altri campioni l'approccio è "lower bound".

Upper bound=addendi la cui determinazione ha fornito un risultato superiore al loro limite di quantificazione (sul rapporto di prova compare un numero), ai fini della somma va considerato il

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 7 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

risultato stesso e la somma di ognuno. Gli addendi la cui determinazione ha fornito un risultato inferiore al loro limite di quantificazione (sul RdP compare <LOQ) vengono considerati, ai fini della somma, pari al loro LOQ

Significa che sui rapporti di prova le sommatorie hanno sempre un valore numerico.

Nello spazio riservato al LOQ della sommatoria non compare alcun valore.

Lower bound= gli addendi la cui determinazione ha fornito un risultato superiore al loro limite di quantificazione (sul rapporto di prova compare un numero), ai fini della somma va considerato il risultato stesso e la somma di ognuno. Gli addendi la cui determinazione ha fornito un risultato inferiore al loro limite di quantificazione (sul RdP <LOQ) vengono considerati, ai fini della somma, pari a zero.

Significa che sui rapporti di prova le sommatorie vengono così espresse:

- se tutti i risultati analitici che vengono sommati sono <LOQ, come valore della sommatoria compare la dicitura “< LOQ mettendo il maggiore fra quelli degli analiti del gruppo. Nello spazio riservato al LOQ della sommatoria non compare alcun valore. Non compare alcun valore di incertezza.
- se almeno un risultato analitico è superiore al suo LOQ, come valore della sommatoria compare la somma dei risultati analitici superiori al loro LOQ. Nello spazio riservato LOQ della sommatoria non compare alcun valore. L’incertezza della somma è data dalla propagazione delle incertezze dei valori superiori a LOQ

Calibrazione ed intervallo di linearità

Viene definito range l’intervallo di concentrazione esplorato nel corso delle misurazioni.

Il range *dinamico* è l’intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia con la concentrazione: i limiti inferiore e superiore del range dinamico corrispondono, rispettivamente, al limite di rivelabilità ed alla più alta concentrazione alla quale un incremento di concentrazione produce ancora un incremento di segnale.

Il range *lineare* esprime l’intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia linearmente con la concentrazione.


Sfruttando questi concetti è possibile progettare e costruire, anche a seconda della richiesta del cliente e dello scopo dell’analisi, una regressione lineare per permetta di correlare univocamente il misurando alla concentrazione di analita nel campione.

Procedura

Eeguire la calibrazione dello strumento seguendo i seguenti criteri:

- Analizzare un bianco strumentale;
- Preparare ed analizzare almeno 5 livelli di calibrazione, possibilmente equi-distanziati sul range lineare;
- Ripetere preferibilmente due repliche per livello;
- Coprire un intervallo 0-150% il livello di concentrazione desiderato;

Raccogliere i dati ed effettuare una regressione lineare col metodo dei minimi quadrati, scartando gli eventuali outliers.

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 8 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

Il metodo dei minimi quadrati (in inglese OLS: *Ordinary Least Squares*) è una tecnica di ottimizzazione (o *regressione*) che permette di trovare una funzione, rappresentata da una *curva ottima* (o curva di regressione), che si avvicini il più possibile ad un insieme di dati. In particolare, la funzione trovata deve essere quella che minimizza la somma dei quadrati delle distanze tra i dati osservati e quelli della curva che rappresenta la funzione stessa.

Nella validazione del metodo devono essere riportati il coefficiente di correlazione R^2 , la pendenza, l'intercetta oltre ad un grafico dei dati sperimentali della curva calcolata.

I requisiti minimi richiesti per l'accettazione di una curva di calibrazione sono:

- $R^2 \geq 0,9800$
- RSD % dei fattori di risposta ≤ 10 (per calibrazioni con standard interno)
- Errore relativo percentuale sul primo punto della curva $\leq 30\%$

R^2 è fornito automaticamente dal software di costruzione della retta, o in alternativa è possibile calcolarlo dalla seguente relazione:

$$R^2 = \left(\frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \sqrt{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}} \right)^2$$

Il parametro RSD% invece va ottenuto mediante l'equazione:

$$RSD\% = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n - 2}}$$

L'errore relativo percentuale sul primo punto è:

$${}^1e\% = \frac{|{}^1y - {}^1y_1|}{{}^1x} \cdot 100$$


dove

1y è il misurando associato alla lettura del primo punto della curva di calibrazione;

1y_1 è il misurando ottenuto dalla proiezione dell'intersezione tra la retta verticale corrispondente alla concentrazione del primo punto con la funzione lineare testé costruita.

Incetezza di misura

L'approccio formale alla stima dell'incetezza di misura determina una stima dell'incetezza di misura da un'equazione o modello matematico. Le procedure descritte come validazione del metodo sono progettate per garantire che l'equazione utilizzata per stimare il risultato, tenendo conto degli errori casuali di tutti i tipi, sia un'espressione valida che inglobi tutti gli effetti riconosciuti e significativi nel risultato. Ne consegue che l'equazione o modello sottoposto a convalida può essere utilizzato

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 9 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

direttamente per stimare l'incertezza di misura. Questo viene fatto seguendo principi stabiliti, in base alla "legge di propagazione dell'incertezza", che per gli effetti indipendenti è descritto da:

$$u[y(x_1, x_2, \dots)] = \sqrt{\sum_{i=1, n} (c_i^2 \cdot u(x_i)^2)}$$

dove $y(x_1, x_2, \dots, x_n)$ è una funzione di più variabili indipendenti x_1, x_2, \dots , e c_i è un coefficiente di sensibilità valutato come $c_i = \partial y / \partial x_i$, il differenziale parziale di y rispetto a x_i . $u(x_i)$ e $u(y)$ sono incertezze standard, cioè incertezze di misura espressa sotto forma di deviazioni standard.

$u[y(x_1, x_2, \dots)]$, funzione di diversi stime d'incertezza separate, viene definita come incertezza standard combinata.

Per stimare l'incertezza di misura dall'equazione $y=f(x_1, x_2, \dots)$ utilizzata per calcolare il risultato, è necessario in primo luogo stabilire le incertezze $u(x_i)$ in ciascuno dei termini x_1, x_2 , ecc, e successivamente combinare questi con i termini aggiuntivi richiesti per rappresentare gli effetti random. Nella discussione di precisione di cui sopra, il modello statistico inteso è:

$$y = f(x_1, x_2, \dots) + \delta_{run} + e$$

dove e è l'errore casuale per un particolare risultato. Poiché δ_{run} ed e sono noti dagli esperimenti di precisione, per ottenere le deviazioni standard σ_{run} e σ_e , questi ultimi termini (o più facilmente le loro stime s_{run} and s_e) sono le incertezze associate di questi termini aggiuntivi.


Si noti che, qualora le condizioni di precisione siano diverse al variare dell'analita, la stima dell'incertezza per un determinato risultato deve impiegare il termine precisione adeguato a quell'analita. La base per la stima dell'incertezza segue di conseguenza direttamente il modello statistico assunto e testato in validazione. Infine, l'incertezza standard calcolata viene moltiplicato per un "fattore di copertura", k , per fornire una incertezza estesa, cioè "un intervallo atteso per comprendere una grande frazione della distribuzione dei valori che possono essere attribuiti al misurando". Quando il modello statistico è ben definito, la distribuzione nota per essere di tipo "normale", e il numero di gradi di libertà associati alla stima è alta, k è generalmente è uguale a 2.

L'incertezza estesa, quindi, corrisponde approssimativamente ad una confidenza 95% dell'intervallo.

Procedura

Tutti i dati richiesti devono essere inseriti in modo corretto nel foglio d'incertezza associato al metodo, e posizionato nella cartella P02.09. Il foglio elettronico, compilato nei campi azzurri, restituisce mediante formule testate nelle celle in rosa, i diversi contributi d'incertezza delle varie fasi dell'analisi e l'incertezza estesa massima percentuale che viene utilizzata in fase di produzione del rapporto di prova di uno specifico campione associato ad uno specifico metodo d'analisi.

Si rimanda alla lettura della procedura (P02.09 Determinazione dell'incertezza di misura dei metodi di prova) specificamente creata per la valutazione ed il calcolo dell'incertezza di misura associata al metodo d'analisi

P02.11 Validazione dei metodi di prova			 Pag. 10 di 10
Predisposto da Resp. Laboratorio	Verificato da RSGQA	Approvato da Dir. Tecnica	Ed. 0 del 07.06.17 Rev. 2 del 16.01.19

Rivalidazione del metodo

Il metodo viene rivalidato ogni qual volta si effettua una modifica rilevante come:

- cambio di tipologia di colonna
- solvente
- cambio di strumentazione con stessa tecnica ma più performante
- velocità del flusso

oppure quando il metodo viene messo in revisione dall'ente emittente con variazioni rilevanti.

In attesa della rivalidazione per i vari analiti e le varie matrici del campo di applicazione del metodo il laboratorio utilizza i dati di validazione (ovvero LOQ, ripetibilità e incertezza estesa) ottenuti in precedenza per emettere il risultato e redigere il RDP.