

Argomenti lezione 2

- Assicurazione di qualità
- Validazione metodi analitici
- Caratteristiche prestazionali di un metodo (Parte 1)

Fonti:

Rapporti ISTISAN 16/39: «Guida Eurachem. **Idoneità per lo scopo dei metodi analitici**. *Guida per i laboratori sulla validazione dei metodi e argomenti correlati*. Seconda edizione 2014»

(Traduzione di: «Eurachem Guide. **The fitness for purpose of analytical methods**. *A laboratory guide to method validation and related topics*. Second edition 2014»)

« Assicurazione di qualità nel laboratorio chimico: validazione dei metodi di analisi» di E. Desimoni, B. Brunetti. Ed. CLUEB 2003

Assicurazione di qualità

‘Assicurazione di Qualità’ (AQ) e ‘Controllo di Qualità’ (CQ) sono termini il cui significato spesso varia a seconda del contesto. Secondo la ISO 9000, 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*.

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.

Validazione

La necessità di dimostrare che i metodi sono **idonei** allo scopo è sottolineata al punto 7.2.1 della ISO/IEC 17025:2017

«Il laboratorio deve utilizzare metodi e procedure **appropriati** per tutte le attività di laboratorio e, ove opportuno, per la valutazione dell'incertezza di misura, così come tecniche statistiche per l'analisi dei dati [...]

Quando il cliente non specifica il metodo da utilizzare, il laboratorio deve scegliere un metodo appropriato ed informare il cliente circa il metodo scelto. Si raccomanda di utilizzare metodi pubblicati in norme internazionali, regionali o nazionali, o da organizzazioni tecniche autorevoli, o in testi e riviste di rilevanza scientifica, indicati dal costruttore delle apparecchiature. Possono essere utilizzati anche metodi sviluppati o modificati dal laboratorio. Il laboratorio deve **verificare** di essere in grado di eseguire correttamente i metodi prima di metterli in opera, assicurando di poter conseguire le **prestazioni richieste...»**.

Validazione

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.

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"

Validazione

Un metodo deve essere **validato** quando è necessario dimostrare che le sue caratteristiche di prestazione sono adeguate all'uso per un particolare scopo. Al punto 7.2.2 della ISO/IEC 17025:2017 è scritto 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.

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 «... 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.

Validazione

Generalmente si considera la validazione del metodo strettamente collegata al suo sviluppo. Molte delle **caratteristiche di prestazione** che sono associate alla validazione del metodo vengono in genere valutate, almeno approssimativamente, durante lo sviluppo 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.

Validazione

Una volta terminato lo sviluppo del metodo il laboratorio deve descrivere dettagliatamente l'intera procedura di misura. Quest'ultima sarà la **procedura che verrà formalmente validata**. Due approcci per la validazione di un metodo:

- confronto inter-laboratorio

Se si sta sviluppando un metodo che si prevede avrà un ampio bacino di utenza (es. procedura che verrà pubblicata come norma) è opportuno effettuare uno **studio collaborativo** che coinvolga un gruppo di laboratori. Le informazioni che vengono normalmente pubblicate sono: la precisione (ripetibilità, riproducibilità e/o corrispondenti limiti di precisione) e, talvolta, la stima dello scostamento.

- validazione interna con uno studio di laboratorio singolo

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.

Validazione

Il laboratorio deve decidere quali caratteristiche di prestazione devono essere determinate ai fini della validazione del metodo e, in alcuni casi, quanto debba essere dettagliato lo studio relativo ad ogni singola caratteristica

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...

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.

Validazione

La validazione implica:

- la stesura di una SOP per guidare operativamente la validazione
- la definizione di scopi e applicazioni del metodo
- la definizione dei parametri di qualità da valutare
- la definizione degli esperimenti da eseguire
- la verifica delle specifiche degli strumenti a disposizione
- la descrizione della qualità necessaria di standard e reagenti
- l'esecuzione di esperimenti di pre-validazione
- la revisione, se necessaria, dei parametri di qualità e dei criteri di accettazione dei risultati
- l'esecuzione di tutti gli esperimenti necessari (intra-laboratorio ed eventualmente inter-laboratori)
- la stesura di una SOP (Standard Operating Procedure) per guidare il lavoro di routine
- la definizione dei criteri di rivalidazione
- la definizione del tipo e frequenza delle prove di verifica dell'idoneità qualitativa del sistema analitico
- la stesura del rapporto di validazione

Validazione

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. Laddove tali requisiti esistano, si raccomanda di seguirli.

Validazione

Modello semplice di protocollo di validazione:

Introduzione ('Title'): identificato il metodo, il personale responsabile della validazione e i tempi previsti per il suo completamento. 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, 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: 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: 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: 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.**

Validazione

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. Alcuni regolamenti legislativi possono prescrivere l'uso di un metodo specifico.

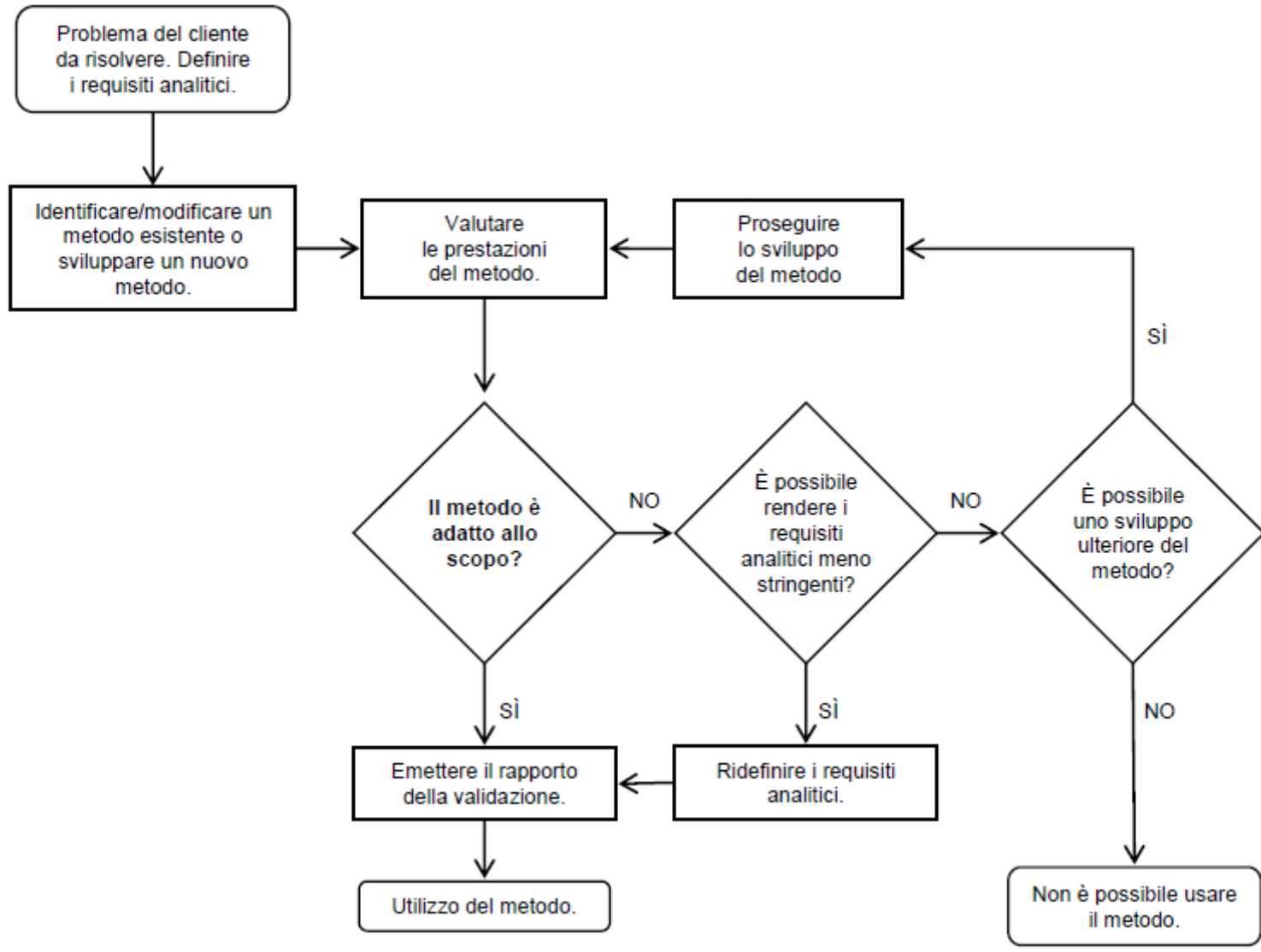
Nella realtà i requisiti analitici sono di rado concordati formalmente in anticipo con il cliente. I clienti generalmente definiscono le loro necessità in termini di costi e/o tempi e raramente conoscono il livello di prestazione analitica necessario, anche se i requisiti di prestazione per i metodi possono essere comunque specificati nel caso di analisi eseguite per rispondere ad un **requisito legislativo** o verificare la conformità con una specifica. 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).

Validazione

DECRETO 14 giugno 2017: Recepimento della direttiva (UE) 2015/1787.

Modifica degli decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 (Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano). Vengono fornite caratteristiche prestazionali.

Validazione



Validazione

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.

Quesito	Caratteristica di prestazione		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		
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		
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		
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		b)
Quali sono le specie che si prevede possano interferire con l'analita/gli analiti?	Selettività		
Sono stati stabiliti limiti di tolleranza per tutti i parametri critici per lo svolgimento delle analisi (es. tempo di estrazione, temperatura d'incubazione)?	Robustezza		c)
I risultati devono essere confrontati con quelli ottenuti da altri laboratori?	Incertezza di misura		b)
I risultati devono essere confrontati con specifiche esterne?	Incertezza di misura		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.

Caratteristiche prestazionali: selettività

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) che dipenda dalla concentrazione dell'analita in esame → curva di taratura.

La **selettività/specificità** è la capacità di un metodo analitico di non risentire della presenza d'interferenti o d'altri componenti diversi dall'analita in esame.

Essa può essere valutata analizzando campioni reali e, se possibile, materiali di riferimento (aventi una composizione il più possibile simile a quella dei campioni reali) con il metodo in esame e con un altro metodo indipendente.

Caratteristiche prestazionali: selettività

Possibili procedure:

- studiare la capacità di un metodo 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). Le misure vengono fatte prima e dopo l'aggiunta degli interferenti per valutare se i risultati ottenuti sono o meno statisticamente differenti.
- analizzare almeno una volta campioni e materiali di riferimento mediante il metodo in esame e mediante un metodo basato su di un **principio fisico indipendente**: confrontando i risultati, valutare la capacità del metodo in esame di identificare l'analita e la sua abilità nel determinarlo in presenza di interferenti.

Caratteristiche prestazionali: limite di rilevabilità

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.

Il minimo segnale significativo 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.

Caratteristiche prestazionali: limite di rilevabilità

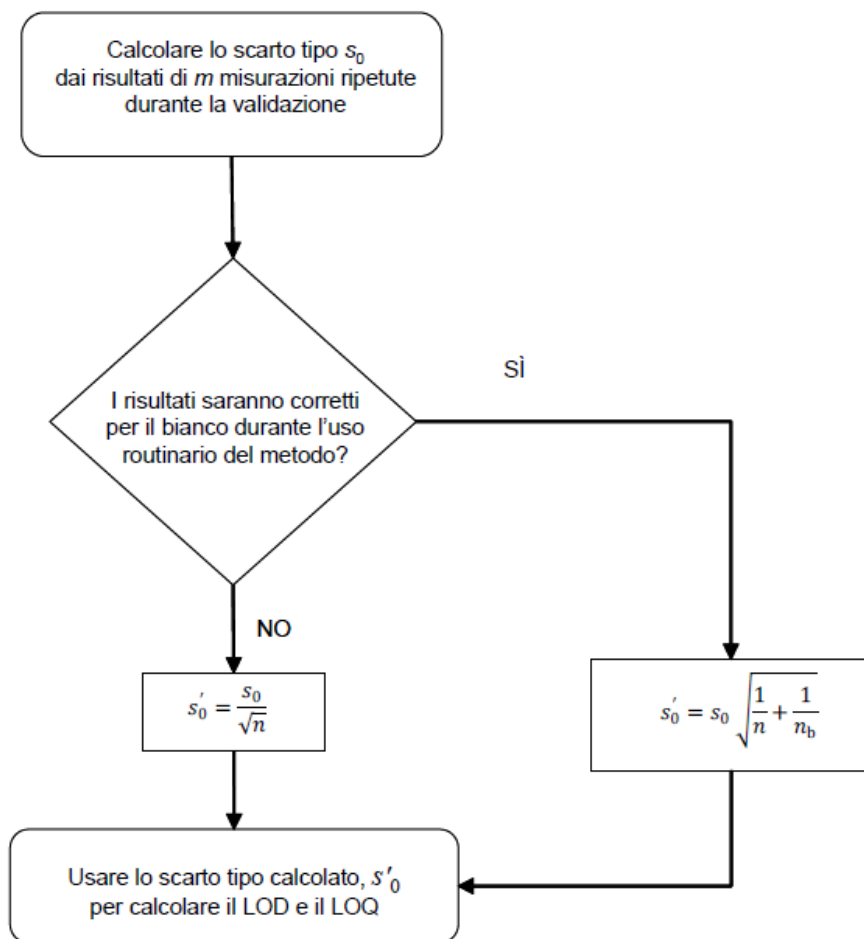
Procedura:

- Misurazioni ripetute di campioni bianchi, cioè matrici che non contengano quantità rivelabili di analita o di campioni di prova con basse concentrazioni di analita.

- Calcolare lo scarto tipo s_0 dei risultati di concentrazione ottenuti

- Calcolare s'_0 da s_0

- Calcolare $\text{LOD} = 3 \times s'_0$



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

Caratteristiche prestazionali: limite di quantificazione

Il limite di quantificazione, **LOQ**, è il più basso livello di analita che può essere determinato con una prestazione accettabile.

Mentre il limite di rivelabilità riguarda la capacità di affermare la presenza o l'assenza dell'analita, il limite di quantificazione riguarda la capacità di eseguire una misurazione quantitativa.

Caratteristiche prestazionali: limite di quantificazione

Procedura:

- Misurazioni ripetute di campioni bianchi, cioè matrici che non contengano quantità rivelabili di analita o di campioni di prova con basse concentrazioni di analita.
- Calcolare lo scarto tipo s_0 dei risultati di concentrazione ottenuti
- Calcolare s'_0 da s_0
- Calcolare $LOQ = k_Q \times s'_0$

k_Q è un fattore moltiplicativo e tipicamente corrisponde a 10
(ma anche 5 o 6)



$LOQ > LOD$

Caratteristiche prestazionali: intervallo di misura

L'intervallo di misura è l'intervallo all'interno del quale il metodo «funziona correttamente». 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 (incremento di concentrazione non produce più un incremento di segnale). Es. l'effetto di appiattimento che si osserva nella spettroscopia UV/VIS per alti valori di assorbanza.

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.

L'intervallo di linearità è l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia linearmente con la concentrazione.

Caratteristiche prestazionali: intervallo di misura

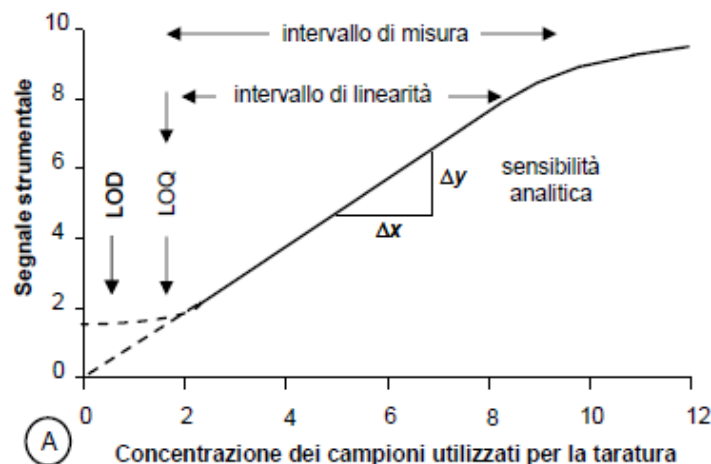
Durante la validazione è necessario:

- confermare tale relazione
- dimostrare che l'intervallo di misura strumentale sia compatibile con l'intervallo dichiarato nel campo di applicazione del metodo
- verificare che la procedura di taratura strumentale proposta sia adeguata

Caratteristiche prestazionali: intervallo di misura

Procedura:

- 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. Le concentrazioni scelte dovrebbero essere distribuite in maniera approssimativamente equidistante all'interno dell'intervallo di misura.
- Si eseguono più **repliche** per ogni concentrazione per ricavare media e scarto tipo



Caratteristiche prestazionali: intervallo di misura

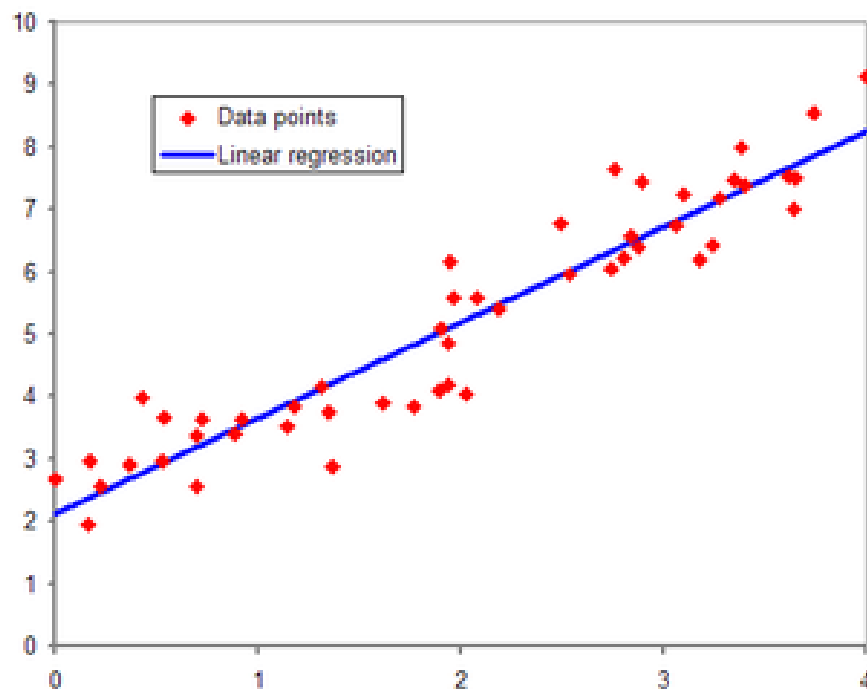
- La costruzione del diagramma di **calibrazione** implica l'adozione di un metodo di regressione. Quello più generalmente adottato è il metodo di regressione lineare ordinaria dei minimi quadrati (OLLSR).

Condizioni necessarie per poter eseguire una OLLSR:

- Gli errori sperimentali associati alla variabile indipendente (concentrazione, quantità) devono essere **trascurabili** rispetto a quelli associati alla variabile dipendente (segnale)
- Gli errori associati alla variabile dipendente devono essere **distribuiti normalmente** (test di Shapiro-Wilk)

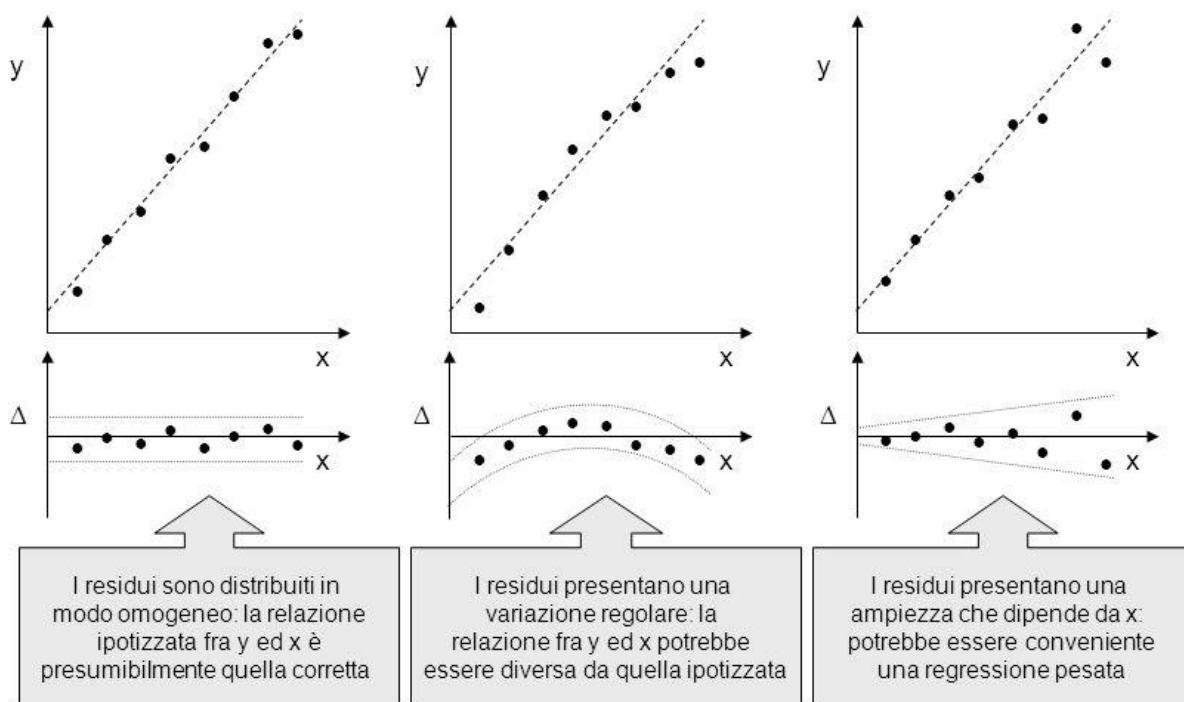
Caratteristiche prestazionali: intervallo di misura

- Il sistema analitico deve essere **omoschedastico**, ovvero la precisione non deve cambiare significativamente al variare della concentrazione (test F)



Caratteristiche prestazionali: intervallo di misura

- Il segnale deve essere funzione lineare della concentrazione (analisi grafica dei **residui**)



Caratteristiche prestazionali: intervallo di misura

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.

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.