



# RAPPORTI ISTISAN 23|32

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

**Supplementi alla Guida Eurachem  
"Idoneità per lo scopo dei metodi analitici"**

**Pianificazione e presentazione  
di studi di validazione di metodi.**

**Uso dei bianchi nella validazione dei metodi.**

**Traduzione italiana**

a cura di E. Gregori, M. Patriarca



FORMAZIONE  
E INFORMAZIONE



# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Supplementi alla Guida Eurachem  
“Idoneità per lo scopo dei metodi analitici”**

**Pianificazione e presentazione  
di studi di validazione di metodi.**

**Uso dei bianchi nella validazione dei metodi.**

**Traduzione italiana**

a cura di

Emanuela Gregori (a), Marina Patriarca (b)

- (a) *Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*  
(b) *Gruppo di lavoro “Validazione dei metodi”, Eurachem*

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

**Rapporti ISTISAN  
23/32**

Istituto Superiore di Sanità

**Supplementi alla Guida Eurachem “Idoneità per lo scopo dei metodi analitici”: Pianificazione e presentazione di studi di validazione di metodi; Uso dei bianchi nella validazione dei metodi. Traduzione italiana.**

A cura di Emanuela Gregori, Marina Patriarca

2023, iii, 45 p. Rapporti ISTISAN 23/32

I supplementi alla Guida Eurachem “The fitness for purpose of analytical methods” del 2014 (la cui versione italiana è disponibile nel Rapporto ISTISAN 16/39) arricchiscono la guida di indicazioni utili nelle operazioni e nelle registrazioni legate alle varie fasi del processo di validazione dei metodi. In questo volume sono presentate le traduzioni di due diversi supplementi pubblicati nel 2019: “Pianificazione e presentazione di studi di validazione di metodi (*Planning and reporting method validation studies*)” e “Uso dei bianchi nella validazione dei metodi” (*Blanks in method validation*).

*Parole chiave:* Validazione; Metodi analitici; Pianificazione; Chimica; Biologia

Istituto Superiore di Sanità

**Supplements to Eurachem guide “The fitness for purpose of analytical methods”: Planning and reporting method validation studies; Blanks in method validation. Italian translation.**

Edited by Emanuela Gregori and Marina Patriarca

2023, iii, 45 p. Rapporti ISTISAN 23/32 (in Italian)

The supplements to the Eurachem Guide “The fitness for purpose of analytical methods” enrich the guide with useful indications for the operations and registrations related to the various phases of the method validation process. In this document the translation into Italian of the two different supplements published in 2019 (“Planning and reporting method validation studies” and “Blanks in method validation”) is presented.

*Key words:* Validation; Analytical methods; Planning; Chemistry; Biology

Si ringrazia Valeria Patriarca per il supporto editoriale e grafico fornito nella preparazione del manoscritto.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [emanuela.gregori@iss.it](mailto:emanuela.gregori@iss.it)

Titoli originali:

Barwick V (Ed.). *Planning and reporting method validation studies – Supplement to Eurachem Guide on the fitness for purpose of analytical methods 1 st ed.* Eurachem; 2019.

Cantwell H (Ed.). *Blanks in method validation - Supplement to Eurachem Guide The fitness for purpose of analytical methods. 1 st ed.* Eurachem; 2019.

Documenti disponibili da: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).

Per la versione inglese: © 2019 Eurachem project group

Per la versione italiana: © 2023 Istituto Superiore di Sanità

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

Gregori E, Patriarca M (Ed.). *Supplementi alla Guida Eurachem “Idoneità per lo scopo dei metodi analitici”: Pianificazione e presentazione di studi di validazione di metodi; Uso dei bianchi nella validazione dei metodi. Traduzione italiana.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2023. (Rapporti ISTISAN 23/32).

---

Legale rappresentante dell’Istituto Superiore di Sanità: *Rocco Bellantone*

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: *Sandra Salinetti*

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

# INDICE

<b>Prefazione alla traduzione italiana</b> .....	iii
--	-----

## Supplemento Eurachem

### Pianificazione e presentazione di studi di validazione di metodi

Prefazione .....	4
1. Abbreviazioni e simboli.....	5
2. Introduzione.....	6
3. Elementi da considerare quando si pianifica uno studio di validazione.....	7
3.1. Metodo da validare .....	7
3.2. Passaggi critici nel metodo e requisiti per la strumentazione .....	7
3.3. Informazioni di supporto.....	7
3.4. Estensione della validazione .....	7
3.5. Ordine di valutazione delle caratteristiche di prestazione del metodo .....	8
3.6. Materiali da analizzare .....	8
3.7. Disegno sperimentale.....	8
4. Note per la stesura del piano di validazione per ciascuna caratteristica di prestazione .....	10
4.1. Criteri di prestazione.....	10
4.2. Esperimenti .....	10
4.3. Valutazione dei dati .....	10
4.4. Note.....	11
4.5. Conclusioni .....	11
5. Esempio di modello per la pianificazione e il rapporto .....	12
Appendice 1. Lista di riscontro per uno studio di validazione.....	27
Appendice 2. Piano sperimentale – esempio di un disegno sperimentale annidato .....	31
Bibliografia.....	33

## Supplemento Eurachem

### Uso dei bianchi nella validazione dei metodi

Prefazione .....	38
1. Introduzione e scopo.....	39
2. Tipo e utilizzo di “bianchi” nella validazione del metodo.....	40
2.1. Bianco per la taratura.....	40
2.2. Bianco procedurale .....	40
2.3. Bianco reagente.....	40
2.4. Bianco solvente.....	40
2.5. Campione bianco .....	41
2.6. Approcci possibili in situazioni in cui non è disponibile un campione bianco adeguato .....	42
2.6.1. Correzione del bianco .....	42
2.6.2. Uso di fattori di correzione nelle curve di taratura.....	42
2.6.3. Bianco simulato.....	42
2.6.4. Tecniche alternative .....	43
Bibliografia.....	44



## PREFAZIONE ALLA TRADUZIONE ITALIANA

L'Istituto Superiore di Sanità ha il compito di svolgere attività di ricerca, sperimentazione, controllo, consulenza, documentazione e formazione nel campo della salute pubblica, e, in questo ambito, svolge varie attività di tipo metrologico, tra cui misurazioni in qualità di laboratorio di riferimento, produzione e certificazione di materiali di riferimento, realizzazione di schemi di valutazione esterna di qualità (programmi di prove valutative), formazione e produzione di linee guida. In questo contesto si è provveduto nel 2016 alla traduzione della Guida Eurachem *The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics* (1).

Questo rapporto raccoglie la traduzione dei due supplementi alla Guida Eurachem menzionata (1), pubblicati nel 2019 come supporto per affrontare alcuni specifici argomenti.

Il primo supplemento “Pianificazione e presentazione di studi di validazione di metodi” ha lo scopo di aiutare, anche con un esempio pratico di modulo applicabile, nella pianificazione della valutazione delle caratteristiche di prestazione scelte per la validazione del metodo.

Il secondo “Uso dei bianchi nella validazione dei metodi” presenta i diversi tipi di “bianchi” che possono essere utilizzati durante la validazione del metodo e fornisce indicazioni nei casi in cui possa essere difficile ottenere una matrice bianca idonea. La complessità di questi argomenti, unita alla loro indubbia importanza, ha fatto ritenere opportuna la loro traduzione in italiano per favorire la massima comprensione da parte di tutti gli utenti.

È importante sottolineare che tali documenti vanno considerati parte della Guida Eurachem *The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics* (1) per un loro efficace utilizzo.

Le versioni originali dei supplementi della Guida Eurachem sono disponibili, oltre che sul sito web di Eurachem ([www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)), anche nel sito dedicato del gruppo Eurachem-Italia ([www.iss.it/eurachem-chi-siamo](http://www.iss.it/eurachem-chi-siamo)), insieme ad altri documenti su temi affini.

### NOTA

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.

I riferimenti bibliografici a documenti normativi sono stati integrati ove possibile con l'indicazione delle loro versioni ufficiali in lingua italiana e, inoltre, è stata indicata la versione aggiornata.

Per la traduzione dei termini tecnici si è fatto riferimento, ovunque possibile, alle traduzioni ufficiali presenti nelle norme UNI.





**SUPPLEMENTO EURACHEM**  
**Pianificazione e presentazione di studi**  
**di validazione di metodi**

*Ringraziamenti del documento originale*

Questo documento è stato prodotto dai membri del gruppo di lavoro Eurachem “Validazione dei metodi”.  
Quelli che hanno contribuito a questo documento sono indicati di seguito.

La produzione di questo supplemento è stata in parte finanziata dal *UK Government Department for Business, Energy & Industrial Strategy* (BEIS).

**Il Gruppo di lavoro Eurachem è composto da:**

Vicki Barwick (editor)	<i>LGC, Regno Unito</i>
Burçu Biniçi	<i>Ulusal Metroloji Enstitüsü, Turchia</i>
Helen Cantwell	<i>The State Laboratory, Irlanda</i>
John Clancy	<i>Henkel Ireland, Irlanda</i>
Pieter Dehouck	<i>Commissione Europea</i>
Stephen L. R. Ellison	<i>LGC, Regno Unito</i>
Elin L. F. Gjengedal	<i>Norwegian University of Life Sciences, Norvegia</i>
Emanuela Gregori	<i>Istituto Superiore di Sanità, Italia</i>
Nineta Hrastelj	<i>Metrology Institute of the Republic of Slovenia, Slovenia</i>
Anders Karlsson	<i>RISE Research Institute of Sweden, Svezia</i>
Guy Lamon	<i>Société Générale de Surveillance, Belgio</i>
Pedro P. Morillas Bravo	<i>Canal de Isabel II, Spagna</i>
Ulf Örnemark	<i>Emendo Dokumentgranskning, Spagna</i>
Marina Patriarca	<i>Istituto Superiore di Sanità, Italia</i>
Francisco Raposo	<i>Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spagna</i>
Lorens P. Sibbesen	<i>Labquality International, Danimarca</i>
Perihan Yolci Ömeroglu	<i>Bursa Uludağ Üniversitesi, Turchia</i>

**Il gruppo di lavoro per la versione italiana è composto da:**

Curatrici:

Emanuela Gregori<sup>(a)</sup>, Marina Patriarca<sup>(b)</sup>

Traduzione:

Prefazione	Emanuela Gregori <sup>(a)</sup> Marina Patriarca <sup>(b)</sup>
<b>Cap. 1.</b> Abbreviazioni e simboli	Valeria Patriarca <sup>(a)</sup>
<b>Cap. 2.</b> Introduzione <b>Cap. 3.</b> Elementi da considerare quando si pianifica uno studio di validazione <b>Cap. 4.</b> Note per la stesura del piano di validazione per ciascuna caratteristica di prestazione	M. Cesarina Abete <sup>(c)</sup>
<b>Cap. 5.</b> Esempio di modello per la pianificazione e il rapporto Requisito analitico, Selettività, Limite di rivelabilità (LOD), Limite di quantificazione (LOQ)	Enrica Ferretti <sup>(d)</sup>
Intervallo di misura, Scostamento di misura, Precisione: Ripetibilità, Precisione: ripetibilità intermedia	Sabrina Barbizzi <sup>(e)</sup>
Robustezza, Incertezza di misura, Riassunto, Approvazione, Punti di apprendimento derivanti dalla validazione	Valentina Fuscoletti <sup>(f)</sup>
<b>Appendice 1.</b> Lista di riscontro per uno studio di validazione <b>Appendice 2.</b> Piano sperimentale – esempio di un disegno sperimentale annidato	Pasquale Gallo <sup>(g)</sup>
Bibliografia	Valeria Patriarca <sup>(a)</sup>

<sup>(a)</sup> Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e sanità pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma<sup>(b)</sup> Gruppo di lavoro “Validazione dei metodi”, Eurachem<sup>(c)</sup> CREAA – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta, Torino<sup>(d)</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna, sezione di Brescia<sup>(e)</sup> Servizio di metrologia ambientale, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma<sup>(f)</sup> CENSIA - Centro nazionale per la sicurezza delle acque, Istituto Superiore di Sanità, Roma<sup>(g)</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Napoli

## **PREFAZIONE**

La seconda edizione della Guida Eurachem *The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics* (1) è stata pubblicata nel 2014.

Da allora il gruppo di lavoro Eurachem “Validazione dei metodi” ha identificato diverse aree in cui sarebbero opportuni ulteriori approfondimenti e ha preparato indicazioni aggiuntive sotto forma di documenti supplementari, che dovrebbero essere utilizzati insieme alla Guida e non isolatamente.

## 1. ABBREVIAZIONI E SIMBOLI

In questo documento si utilizzano le seguenti abbreviazioni e simboli.

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> Analisi della varianza
CQI	Controllo di Qualità Interno (ICQ, <i>Internal Quality Control</i> )
LOD	<i>Limit Of Detection</i> Limite di rivelabilità
LOQ	<i>Limit Of Quantification</i> Limite di quantificazione
MRC	Materiale di Riferimento Certificato (CRM, <i>Certified Reference Material</i> )
MR	Materiale di Riferimento (RM, <i>Reference Material</i> )
PT	<i>Proficiency Testing</i> prova valutativa inter-laboratorio
%RSD	<i>percent relative standard deviation</i> scarto tipo relativo percentuale
ILC	<i>interlaboratory comparison</i> confronto inter-laboratorio
$k$	<i>coverage factor used to calculate expanded measurement uncertainty</i> fattore di copertura utilizzato per calcolare l'incertezza di misura estesa
$k_Q$	<i>multiplier used in calculating limit of quantification</i> fattore moltiplicativo utilizzato per il calcolo del limite di quantificazione
$r$	<i>repeatability limit</i> limite di ripetibilità
$s$	<i>standard deviation</i> scarto tipo
$s'_0$	<i>standard deviation used for calculating an LOD or LOQ</i> scarto tipo utilizzato per il calcolo del LOD e 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

## 2. INTRODUZIONE

Questo supplemento intende fornire indicazioni per la stesura sia del piano che del rapporto di validazione. L'obiettivo è fornire un piano chiaro per l'intero studio di validazione che comprenda le caratteristiche di prestazione oggetto di indagine, il requisito per ogni caratteristica di prestazione, i materiali che verranno analizzati, il numero di esperimenti replicati e la loro sequenza, le analisi statistiche che verranno utilizzate e come sarà valutata l'idoneità per lo scopo del metodo. Si noti che lo schema di pianificazione e il modello di rapporto contenuti in questo supplemento costituiscono solo degli esempi (si veda il capitolo 5) e non devono essere considerati come dei modelli definitivi. Ogni laboratorio dovrebbe produrre i propri modelli tenendo conto di eventuali specifici requisiti normativi o di accreditamento.

Il modello di pianificazione e di rapporto proposto (capitolo 5) è strutturato in modo tale che, una volta completato il lavoro sperimentale, possa essere facilmente convertito in un rapporto di validazione.

Il modello contiene le seguenti sezioni:

- *Frontespizio*: include il titolo e il riferimento del metodo, un sommario sullo stato del metodo e lo scopo dello studio.
- *Requisiti analitici*: fornisce informazioni sullo scopo e il campo di applicazione del metodo, sull'obiettivo dello studio, sulle caratteristiche di prestazione da studiare, sui requisiti di prestazione del metodo, sui dati di prestazione già esistenti e i materiali disponibili per lo studio.
- *Caratteristiche di prestazione*: per ciascuna caratteristica di prestazione è presente una sezione separata. Queste sezioni dovrebbero includere i dettagli dei rispettivi studi di validazione (criteri di prestazione, materiali da analizzare, numero e sequenza delle misurazioni, modalità per l'analisi dei dati e per la valutazione delle prestazioni).
- *Riassunto*: fornisce una sintesi dei valori e/o delle altre informazioni ottenute per ciascuna caratteristica di prestazione e una dichiarazione conclusiva che indichi se gli obiettivi dello studio sono stati raggiunti e se il metodo è idoneo per lo scopo.
- *Approvazione*: firma del piano di validazione e del rapporto di validazione.
- *Elementi per l'apprendimento*: mette in evidenza eventuali informazioni chiave emerse dalla validazione come, ad esempio, i passaggi critici nel metodo o requisiti per il futuro controllo di qualità.

Questo documento fornisce indicazioni su come completare ogni sezione del piano di validazione e include anche riferimenti alle sezioni pertinenti della Guida Eurachem: *The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics* (1) per i dettagli sul numero di misurazioni richieste e sull'analisi dei dati.

### **3. ELEMENTI DA CONSIDERARE QUANDO SI PIANIFICA UNO STUDIO DI VALIDAZIONE**

L'Appendice 1 fornisce una lista di riscontro per la pianificazione della validazione.

#### **3.1. Metodo da validare**

Prima di iniziare uno studio di validazione dovrebbe essere disponibile una procedura scritta dettagliata (es. una procedura operativa standard) che descriva il metodo oggetto della validazione. La validazione formale dovrebbe essere considerata separatamente da qualsiasi attività di sviluppo del metodo. È la versione "finale" del metodo – dopo il completamento dello sviluppo del metodo – che viene validata.

#### **3.2. Passaggi critici nel metodo e requisiti per la strumentazione**

Prima di iniziare lo studio di validazione, l'analista dovrebbe avere familiarità con il metodo ed essere consapevole di eventuali passaggi critici che richiedono particolare attenzione. Dovrebbero essere presi in considerazione anche eventuali requisiti specifici relativi ad attrezzature e strumenti.

#### **3.3. Informazioni di supporto**

Potrebbero essere disponibili informazioni che possono aiutare a pianificare lo studio di validazione e/o a dimostrare l'idoneità per lo scopo del metodo, inclusi dati ottenuti dalla partecipazione a confronti inter-laboratorio (ILC), ad esempio a schemi di prove valutative inter-laboratorio (PT), o risultati del controllo di qualità interno (CQI) e risultati ottenuti precedentemente impiegando metodi simili nella *routine*.

#### **3.4. Estensione della validazione**

Uno dei principali problemi che i laboratori devono affrontare quando pianificano la validazione di un metodo è decidere quali caratteristiche di prestazione debbano essere studiate ed il numero di esperimenti replicati necessari. La Guida Eurachem (1) fornisce indicazioni su questo argomento.

### 3.5. Ordine di valutazione delle caratteristiche di prestazione del metodo

Con un'attenta pianificazione è possibile ottenere informazioni su una serie di caratteristiche di prestazione da una singola serie di esperimenti (vedere ad esempio il piano sperimentale delineato nell'Appendice 2). Tuttavia, ci sono alcune caratteristiche che dovrebbero idealmente essere valutate prima di effettuare uno studio completo sulla precisione o sullo scostamento. La selettività è generalmente indagata nelle fasi iniziali del processo di validazione poiché, se non si è a conoscenza se la selettività sia accettabile, le altre caratteristiche di prestazione avranno scarso valore. In alcune situazioni può essere vantaggioso condurre uno studio sulla robustezza prima dello studio completo sulla precisione o sullo scostamento, poiché questo permetterà di ottenere informazioni sui quei passaggi critici del processo di misurazione che necessitano di essere controllati.

D'altro canto, in alcuni settori [NdT: come, ad esempio, il controllo dei residui di farmaci veterinari negli alimenti (2)], i requisiti normativi prevedono che uno studio sulla robustezza debba essere condotto come fase finale della validazione.

### 3.6. Materiali da analizzare

Nella sezione relativa a ciascuna caratteristica di prestazione sono fornite indicazioni sui tipi di materiali (es. materiali di riferimento (MR), campioni di prova), che possono essere utilizzati. Quando si pianifica lo studio, è importante tenere presente lo scopo del metodo. L'obiettivo è che la validazione includa una gamma rappresentativa delle tipologie di campioni di prova, in termini di matrice e livello di analita. Questo può richiedere l'analisi di una serie di materiali diversi tra cui materiali di riferimento certificati (MRC), campioni addizionati e campioni di prova. È inoltre importante stabilire la quantità di ciascun materiale che sarà necessaria durante la validazione per garantirne una disponibilità sufficiente.

### 3.7. Disegno sperimentale

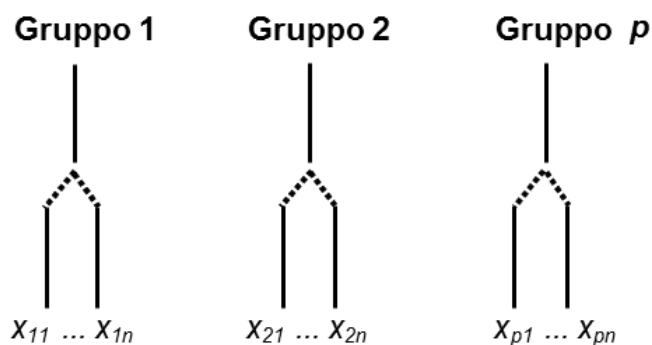
La scelta di disegni sperimentali adatti è un elemento chiave del piano di validazione. Con un'adeguata pianificazione, la quantità di informazioni ottenute da un particolare esperimento può essere ampliata, ad esempio, ottenendo informazioni su più di una caratteristica di prestazione. Esistono numerosi disegni sperimentali che possono essere utilizzati in uno studio di validazione.

Questi includono:

- *Replica semplice*: consiste nell'eseguire una serie di misurazioni su un singolo materiale. È utile per stimare la precisione (in particolare la ripetibilità). Se è disponibile un valore di riferimento (es. se il materiale analizzato è un MRC), i risultati ottenuti con la replica semplice possono essere utilizzati anche per valutare lo scostamento.
- *Taratura lineare*: questo tipo di approccio, che prevede osservazioni in un intervallo di valori (in genere di diverse concentrazioni dell'analita), viene comunemente utilizzato per la taratura dello strumento e per studi dell'intervallo di linearità e dell'intervallo di lavoro.



- *Disegno annidato* (noto anche come disegno gerarchico): si tratta di un disegno sperimentale in cui ogni livello di un dato fattore è presente soltanto in un unico livello di ogni altro fattore. Ad esempio, in uno studio di ripetibilità e precisione intermedia, le misurazioni ripetute ottenute in un breve periodo di tempo sono “nidificate” in giorni o in serie analitiche. La Figura 1 mostra un esempio di un disegno annidato a singolo fattore.



**Figura 1. Esempio di “disegno annidato” per un esperimento a partire dal quale possono essere stimate diverse misure della precisione se i gruppi rappresentano diverse serie analitiche (eseguite idealmente in giorni diversi)**

Questo tipo di approccio è discusso nell’Appendice 2. I risultati di questo tipo di esperimento possono essere analizzati usando l’analisi della varianza ad una via (ANOVA), come descritto nell’Appendice C della Guida Eurachem (1).

- *Disegno fattoriale frazionario*: i disegni fattoriali consentono lo studio di più parametri a due o più livelli. Un disegno fattoriale completo è quello in cui sono studiate tutte le combinazioni tra i livelli. Nel disegno fattoriale frazionario, alcune combinazioni di livelli, selezionate dopo attenta valutazione, vengono rimosse. Ciò riduce il numero totale di misurazioni richieste in uno studio, pur continuando a fornire informazioni utili. Un disegno fattoriale frazionario comunemente usato nella validazione del metodo è un semplice disegno a sette fattori, noto come disegno Plackett-Burman (3).

## **4. NOTE PER LA STESURA DEL PIANO DI VALIDAZIONE PER CIASCUNA CARATTERISTICA DI PRESTAZIONE**

Nell'esempio di modello per la pianificazione e il rapporto (capitolo 5) ogni caratteristica di prestazione ha una sezione separata in cui dovrebbero essere documentate informazioni relative ai criteri di prestazione, esperimenti pianificati e analisi dei dati. Una volta completato lo studio, è possibile utilizzare le stesse sezioni per riepilogare i dati e registrare i risultati della validazione. Le note che seguono forniscono indicazioni sulle informazioni da includere in ciascuna sezione.

### **4.1. Criteri di prestazione**

Specificare i criteri in base ai quali verrà valutata la caratteristica di prestazione (es. requisiti per precisione, scostamento o limite di rilevabilità (LOD)).

### **4.2. Esperimenti**

Descrivere gli esperimenti che verranno effettuati per valutare la caratteristica di prestazione, includendo informazioni su:

- i materiali che verranno analizzati – ad esempio, MR/MRC, campioni di prova, materiali di riferimento per la taratura;
- il disegno sperimentale, includendo:
  - il numero di misurazioni replicate che verranno eseguite su ciascun materiale,
  - le condizioni di misurazione e l'ordine di analisi (es. se le misurazioni devono essere effettuate in giorni diversi e/o da analisti diversi e/o utilizzando strumenti di misura diversi).

### **4.3. Valutazione dei dati**

Descrivere come avverrà la valutazione dei dati, includendo informazioni su:

- tutti i parametri statistici da calcolare a partire dai dati (es. media, scarto tipo);
- come saranno calcolati, a partire dai dati, i valori delle caratteristiche di prestazione;
- tutti i test statistici da utilizzare;
- come sarà valutata l'idoneità per lo scopo della caratteristica di prestazione.

## **4.4. Note**

- Includere qualsiasi altra informazione rilevante per la valutazione della caratteristica di prestazione.
- Includere informazioni sui dati storici di prestazione, eventualmente disponibili.

## **4.5. Conclusioni**

Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, questa sezione dovrebbe includere una dichiarazione sul soddisfacimento o meno dei criteri di prestazione.

## 5. ESEMPIO DI MODELLO PER LA PIANIFICAZIONE E IL RAPPORTO

### **Titolo del metodo**

**La determinazione di A {analita o misurando} in presenza di B {interferente}  
in C {tipo di campione/matrice} utilizzando D {principio}**

**Includere il numero di riferimento del metodo, se applicabile**

*A: Che quantità viene/deve essere misurata?*

*B: Ci sono interferenze conosciute che possono essere gestite dal metodo?*

*C: Quale tipologia di campioni/matrici sarà analizzata con il metodo?*

*D: Quali tecniche di misura/strumenti di misura saranno utilizzati?*

### **Stato del metodo**

Che tipo di metodo è? Ad esempio, un metodo normalizzato, un metodo normalizzato modificato, un metodo interno?

### **Scopo dello studio**

Descrivere lo scopo dello studio, ad esempio, validare un nuovo metodo interno, verificare le prestazioni di un metodo normalizzato, validare l'estensione del campo di applicazione di un metodo.

<b>Requisito analitico</b>	
<b>Analita</b>	Specificare l'analita(i) (es. rame, creatinina, cromo esavalente).
<b>Misurando</b>	Indicare il misurando (la quantità che si intende misurare). Esempio: è la concentrazione "totale" dell'analita(i) presente che è di interesse, la "quantità estratta" in specifiche condizioni, o il risultato ottenuto con una procedura di misura specificata?  Indicare le unità in cui saranno riportati i risultati delle misurazioni.  Indicare l'intervallo richiesto (es. intervallo di concentrazione nei campioni).
<b>Matrice e stato fisico</b>	Indicare la matrice/matrici del campione e il loro stato fisico.
<b>Scopo delle misurazioni</b>	Specificare il motivo per cui le misurazioni sono richieste (es. la verifica della conformità ad un particolare regolamento o ad una specifica di produzione).

<b>Scopo dello studio</b>	Indicare lo scopo dello studio, esempio: <ul style="list-style-type: none"> <li>• validazione completa di un metodo sviluppato internamente;</li> <li>• verifica dell'implementazione di un metodo pubblicato per il quale sono disponibili dati sulle caratteristiche di prestazione;</li> <li>• validazione del campo di applicazione di un metodo;</li> <li>• ri-validazione a seguito di modifica delle condizioni operative;</li> <li>• ri-validazione dopo un periodo di non utilizzo.</li> </ul>
<b>Caratteristiche di prestazione</b>	Elencare le caratteristiche di prestazione (es. selettività, LOD, LOQ, precisione, ecc.) che saranno valutate durante lo studio.  Giustificare qualsiasi omissione (es. se uno studio della robustezza non è pertinente poiché si utilizza un metodo normalizzato).
<b>Requisiti di prestazione</b>	Quali sono le prestazioni richieste affinché il metodo fornisca risultati che siano idonei per lo scopo?  Riassumere i valori obiettivo per le caratteristiche di prestazione da valutare durante lo studio.  Indicare i requisiti di prestazione e giustificare come sono stati definiti. I valori obiettivo di prestazione possono essere: <ul style="list-style-type: none"> <li>• definiti in norme/regolamenti;</li> <li>• indicati in un metodo normalizzato (le prestazioni indicate possono essere raggiunte?);</li> <li>• relativi a specifiche di prodotto nel controllo qualità della produzione;</li> <li>• basati su prestazioni di procedure simili che si ritengono idonee per lo scopo;</li> <li>• definiti in base allo stato dell'arte attuale (quali prestazioni può raggiungere il metodo?).</li> </ul>

<b>Altre considerazioni</b>	<p>Sono disponibili dati storici sulle prestazioni del metodo?</p> <p>È richiesto campionamento/subcampionamento (e questo sarà eseguito all'interno del laboratorio)?</p> <p>Ci sono restrizioni sulla quantità o disponibilità di campione?</p> <p>Nei campioni, l'analita si trova disperso o localizzato?</p> <p>Ci sono interferenze conosciute?</p> <p>Elencare eventuali MRC disponibili in commercio che abbiano matrice e concentrazione degli analiti simili a quelli dei campioni in esame.</p> <p>Identificare ogni altro MR (anche non certificato) che possa essere utilizzato durante lo studio di validazione (es. materiali di riferimento di sostanze pure utilizzati per preparare i campioni addizionati).</p>
	<p>Vedere la Sezione 5.6 della Guida Eurachem (1) per ulteriori informazioni per specificare i requisiti analitici.</p>

<b>Caratteristica di prestazione</b>	<b>Selettività</b>
<b>Descrizione</b>	Capacità del metodo di rispondere solo agli analiti oggetto dello studio in presenza di altri componenti che si presume possano essere presenti.

<b>Criteri di prestazione</b>	Dimostrare che altre sostanze che potrebbero essere presenti nei campioni da analizzare, non influenzano i risultati delle misurazioni.
<b>Esperimenti</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analizzare bianchi reagente e campioni bianchi (es. campioni contenenti la sola matrice senza gli analiti di interesse) (4).</li> <li>• Analizzare campioni di prova e MR con il metodo in esame e con altri metodi indipendenti (metodi di conferma).</li> <li>• Aggiungere una quantità nota di possibili o sospetti interferenti a campioni di prova rappresentativi (ai livelli attesi nei campioni da analizzare). <ul style="list-style-type: none"> <li>– Applicare il metodo ai campioni di prova in presenza e in assenza degli interferenti.</li> </ul> </li> <li>• Nel caso di possibili interferenze multiple, effettuare uno studio di robustezza per considerarne l'effetto. <ul style="list-style-type: none"> <li>– Confrontare i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di prova in presenza e in assenza dell'interferente per stabilire se vi sia un effetto significativo sui risultati.</li> </ul> </li> </ul>
<b>Valutazione dei dati</b>	Per ulteriori informazioni, consultare le seguenti sezioni della Guida Eurachem (1): Sezione 6.1 e Schema di riferimento rapido 1 – Selettività. Sezione 6.8 e Schema di riferimento rapido 8 – Robustezza.

<b>Note</b>	
<b>Conclusioni</b>	Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, dichiarare se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.

<b>Caratteristica di prestazione</b>	<b>Limite di rivelabilità (LOD)</b>
<b>Descrizione</b>	La più bassa concentrazione di analita che può essere rivelata dal metodo ad un livello di fiducia specificato.

<b>Criteri di prestazione</b>	<p>Indicare il LOD richiesto (di solito espresso nella medesima unità di misura dei risultati).</p> <p>Se si prevede che la concentrazione dell'analita nei campioni sia ben oltre il LOD, si deve comunque indicare un valore minimo per confermare che è in effetti così.</p>
<b>Esperimenti</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eseguire misure replicate su un materiale idoneo (lo scopo è ottenere una stima della precisione vicino a zero): <ul style="list-style-type: none"> <li>– se i campioni bianchi danno una risposta, analizzare un campione bianco (campione contenente la sola matrice senza gli analiti di interesse);</li> <li>– se non è disponibile un campione bianco, o se lo scarto tipo delle misure dei bianchi è pari a zero, analizzare un campione di prova a bassa concentrazione o addizionato a bassa concentrazione.</li> </ul> </li> <li>• In entrambi i casi, si deve eseguire l'intera procedura di misura, compresa l'eventuale preparazione del campione, generalmente in condizioni di ripetibilità.</li> </ul> <p>Per indicazioni sul numero delle repliche, vedere la Sezione 6.2 (Limite di rivelabilità e Limite di quantificazione) e lo Schema di riferimento rapido 2 (Limite di rivelabilità) della Guida Eurachem (1).</p>
<b>Valutazione dei dati</b>	Per ulteriori informazioni vedere la Guida Eurachem (1): Sezione 6.2, Schema di riferimento rapido 2 e Appendice B.

<b>Note</b>	<p>Al fine di verificare le potenzialità dello strumento, potrebbe essere necessario fissare il LOD strumentale prima di uno studio completo. In questo caso va analizzato un campione già preparato (ovvero, ripetendo solo la fase di misurazione e non la preparazione del campione).</p> <p>Nel caso di metodi il cui scopo comprenda matrici molto diverse, potrebbe essere necessario determinare lo scarto tipo e calcolare il LOD per ciascuna matrice separatamente.</p> <p>Se il LOD è una caratteristica di prestazione critica, si raccomanda che la stima ottenuta durante lo studio di validazione, sia confermata durante l'utilizzo routinario del metodo.</p>
<b>Conclusioni</b>	Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, dichiarare se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.



Caratteristica di prestazione	Limite di quantificazione (LOQ)
<b>Descrizione</b>	La più piccola concentrazione di analita che può essere quantificata dal metodo con prestazioni accettabili (es. incertezza di misura accettabile).
<b>Criteri di prestazione</b>	Solitamente è il limite inferiore dell'intervallo di misura. Dimostrare che il LOQ è compatibile con l'intervallo di misura specificato nei requisiti analitici.
<b>Esperimenti</b>	Solitamente i calcoli del LOQ sono basati sulla stima dello scarto tipo ottenuto dallo studio del LOD.
<b>Valutazione dei dati</b>	Per ulteriori informazioni, vedere le seguenti sezioni della Guida Eurachem (1): Sezione 6.2 (Limite di rivelabilità e Limite di quantificazione) e lo Schema di riferimento rapido 3 (Limite di quantificazione).
<b>Note</b>	Se il LOQ è una caratteristica di prestazione critica, dovrebbe essere confermato che ogni stima ottenuta mediante calcolo (es. utilizzando $LOQ = k_Q \times s'_0$ come descritto nella Guida Eurachem) (1) è raggiungibile. Questo può essere fatto, utilizzando nello studio di ripetibilità, un campione con una concentrazione vicina al LOQ calcolato.
<b>Conclusioni</b>	Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, dichiarare se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.

<b>Caratteristica di prestazione</b>	<b>Intervallo di misura</b>
<b>Descrizione</b>	L'intervallo all'interno del quale il metodo fornisce risultati con un'incertezza accettabile
<b>Criteri di prestazione</b>	<p>L'intervallo di misura del metodo dovrebbe essere specificato nel campo di applicazione del metodo.</p> <p><b>Intervallo di misura strumentale</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Confermare che il modello di taratura proposto (es. la retta) sia appropriato.</li> <li>• Dimostrare che l'intervallo di misura strumentale sia compatibile con il requisito analitico (ossia l'intervallo atteso delle concentrazioni degli analiti nei campioni di prova).</li> </ul> <p><b>Intervallo di misura del metodo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimostrare che il metodo può essere utilizzato nell'intervallo di misura specificato nel campo di applicazione.</li> <li>• Confermare che la procedura proposta per la taratura dello strumento, specificata nel metodo, sia adeguata.</li> </ul>
<b>Esperimenti</b>	<p><b>Intervallo di misura strumentale</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preparare un campione bianco e una serie di materiali per la taratura con concentrazioni uniformemente distribuite all'interno dell'intervallo di misura richiesto (possibilmente, preparati in modo indipendente).</li> <li>• Se possibile, eseguire le misurazioni almeno in duplicato su ogni materiale per la taratura (ciò consente una valutazione iniziale della ripetibilità).</li> <li>• Se possibile, effettuare le analisi dei materiali per la taratura in ordine casuale.</li> </ul> <p><b>Intervallo di lavoro del metodo</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tarare lo strumento secondo la procedura di taratura proposta.</li> <li>• Analizzare un campione bianco e una serie di materiali di riferimento, o campioni addizionati le cui concentrazioni siano uniformemente distribuite lungo l'intervallo di interesse.</li> <li>• I campioni possono essere di matrice diversa (es. se alcuni tipi di campioni presentano sempre concentrazioni dell'analita basse o alte).</li> <li>• Se possibile, eseguire le misurazioni almeno in duplicato su ciascun campione.</li> <li>• Se possibile, analizzare i campioni in ordine casuale.</li> </ul> <p>Vedere la sezione 6.3 (Intervallo di misura) e lo Schema di riferimento rapido 5 (Intervallo di misura e intervallo di linearità) della Guida Eurachem (1) per avere indicazioni sul numero di materiali e il numero di repliche da effettuare.</p>
<b>Valutazione dei dati</b>	Vedere la Guida Eurachem (1) per ulteriori informazioni: Sezione 6.3 (Intervallo di lavoro) e Schema di riferimento rapido 5 (Intervallo di misura e intervallo di linearità).

<b>Note</b>	<p>Per la valutazione dell'intervallo di misura strumentale, si considerano adeguati materiali per la taratura preparati in un solvente (piuttosto che nella matrice del campione).</p> <p>Qualora siano disponibili i dati derivanti da studi di scostamento di misura e precisione che coprono l'intervallo di interesse, potrebbe non essere richiesto uno studio separato dell'intervallo di misura del metodo.</p> <p>Gli esperimenti per valutare l'intervallo di misura strumentale possono fornire informazioni anche sulla sensibilità analitica (pendenza della curva di taratura).</p>
<b>Conclusioni</b>	<p>Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, dichiarare se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.</p>

<b>Caratteristica di prestazione</b>	<b>Scostamento di misura</b>
<b>Descrizione</b>	Differenza tra il valore medio dei risultati di misurazione e un valore di riferimento.

<b>Criteri di prestazione</b>	Definire lo scostamento di misura accettabile, specificato in termini di scostamento (o scostamento relativo) o di recupero.
<b>Esperimenti</b>	<p>La valutazione dello scostamento di misura richiede il confronto dei risultati di misurazione con un valore di riferimento. Esistono tre approcci principali:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• analisi di materiali di riferimento certificati;</li> <li>• analisi di campioni addizionati <ul style="list-style-type: none"> <li>– analizzare la matrice non addizionata per confermare che è un campione bianco altrimenti determinarne la concentrazione;</li> </ul> </li> <li>• confronto con un metodo alternativo <ul style="list-style-type: none"> <li>– analizzare un MR oppure un campione di prova utilizzando il metodo proposto e il metodo alternativo.</li> </ul> </li> </ul> <p>Potrebbe essere necessario analizzare più di un materiale per coprire in modo rappresentativo lo scopo del metodo.</p> <p>Per la valutazione dello scostamento si utilizzano di solito studi di replica semplici e disegni annidati [NdT: si veda il paragrafo 3.7 – Disegno sperimentale].</p> <p>Vedere la Sezione 6.5 e lo Schema di riferimento rapido 6 (Giustezza) della Guida Eurachem (1) per avere indicazioni sul numero di repliche.</p>
<b>Valutazione dei dati</b>	Vedere la Guida Eurachem (1) per ulteriori informazioni: Sezione 6.5 e Schema di riferimento rapido 6.

<b>Note</b>	<p>In generale, l'analisi di un MRC è l'approccio preferibile se è disponibile un materiale idoneo.</p> <p>Il confronto dei risultati con un metodo alternativo fornisce una misura dello scostamento rispetto a quel metodo. 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. Il metodo alternativo potrebbe essere esso stesso affetto da uno scostamento, in tal caso l'esperimento non fornirà una misura assoluta della giustezza.</p> <p>Nei casi in cui il misurando sia definito dal metodo in studio (ovvero viene validato un metodo empirico), il confronto con un metodo di riferimento non è applicabile.</p>
<b>Conclusioni</b>	Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, dichiarare se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.

<b>Caratteristica di prestazione</b>	<b>Precisione: Ripetibilità</b>
<b>Descrizione</b>	<p>Precisione: grado di concordanza tra risultati di misurazione indipendenti ottenuti in condizioni specificate.</p> <p>Ripetibilità: misura della variabilità dei risultati quando le misurazioni sono eseguite in un singolo laboratorio, da un singolo operatore, utilizzando la stessa strumentazione in un breve periodo di tempo (precisione “intra-serie”).</p>

<b>Criteri di prestazione</b>	Definire il valore obiettivo per la ripetibilità, espresso come scarto tipo $s_r$ o come scarto tipo relativo percentuale (%RSD <sub>r</sub> ).
<b>Esperimenti</b>	<p>I seguenti materiali sono adatti per gli studi di precisione:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• campioni di prova già analizzati;</li> <li>• campioni addizionati;</li> <li>• MR.</li> </ul> <p>Potrebbe essere necessario analizzare più di un materiale per coprire in modo rappresentativo lo scopo del metodo.</p> <p>Quando si valuta la precisione, non è richiesto un valore di riferimento. Gli studi di precisione possono quindi basarsi sull'analisi di campioni di prova residui. Si noti che l'utilizzo di MR per studiare la precisione può portare a sottostimare la precisione ottenuta per i campioni di prova. Questo perché gli MR sono generalmente molto più omogenei rispetto ai campioni di prova di routine. Tuttavia, se nell'ambito di uno studio di precisione vengono utilizzati degli MR o dei campioni addizionati, sarà possibile valutare anche lo scostamento di misura.</p> <p>Per la valutazione della precisione si utilizzano di solito studi di replica semplici e disegni annidati [NdT: si veda il paragrafo 3.7 – Disegno sperimentale]. Uno studio di replica semplice in condizioni di ripetibilità fornirà una stima della ripetibilità per il materiale indagato. Un disegno annidato permetterà anche di valutare la ripetibilità intermedia (si veda la sezione successiva, relativa alla ripetibilità intermedia).</p> <p>Vedere la Sezione 6.6 (Precisione) e lo Schema di riferimento rapido 7 (Ripetibilità, ripetibilità intermedia e riproducibilità) della Guida Eurachem (1) per indicazioni sul numero di repliche.</p> <p>Si veda anche l'Appendice 2 di questo documento.</p>
<b>Valutazione dei dati</b>	Vedere le seguenti sezioni della Guida Eurachem (1) per ulteriori informazioni: Sezione 6.6 (Precisione), Schema di riferimento rapido 7 (Ripetibilità, ripetibilità intermedia e riproducibilità) e Appendice C (Analisi della varianza - ANOVA).

<b>Note</b>	Se non sono disponibili informazioni preliminari sulla precisione del metodo è consigliabile completare uno studio di ripetibilità limitato (replica semplice) prima di eseguire uno studio completo di ripetibilità / ripetibilità intermedia.
<b>Conclusioni</b>	Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, dichiarare se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.

<b>Caratteristica di prestazione</b>	<b>Precisione: Ripetibilità intermedia</b>
<b>Descrizione</b>	<p>Precisione: grado di concordanza tra i risultati di misurazione indipendenti ottenuti in condizioni specificate.</p> <p>Ripetibilità intermedia: misura della variabilità dei risultati quando le misurazioni sono eseguite in un singolo laboratorio, ma in condizioni che variano maggiormente rispetto alle condizioni di ripetibilità (misurazioni effettuate in giorni diversi e, ad esempio, da operatori diversi e/o utilizzando strumentazione diversa).</p>

<b>Criteri di prestazione</b>	Definire il valore “obiettivo” per la ripetibilità intermedia, espressa come scarto tipo $s_1$ o come scarto tipo relativo percentuale (%RSD <sub>1</sub> ).
<b>Esperimenti</b>	<p>Identificare i materiali idonei – campioni di prova già analizzati, campioni addizionati, MR – che coprono lo scopo del metodo (livello di concentrazione dell’analita e matrice del campione).</p> <p>Un approccio efficace per ottenere una stima della ripetibilità intermedia consiste nell’utilizzare un disegno annidato. I dati di tale studio forniranno le informazioni necessarie per valutare sia la ripetibilità sia la ripetibilità intermedia, utilizzando l’ANOVA ad una via.</p> <p><b>Disegno annidato</b></p> <p>Per ogni materiale:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• corse analitiche (eseguite in condizioni di ripetibilità) ripetute in giorni diversi;</li> <li>• se possibile, le corse analitiche vengono eseguite da operatori diversi e utilizzando strumentazione diversa;</li> <li>• sono necessarie almeno 2 repliche per ciascun materiale nell’ambito di ciascuna corsa analitica <ul style="list-style-type: none"> <li>– Il numero di repliche nell’ambito di ciascuna corsa analitica dovrà essere aumentato qualora il numero delle serie analitiche diminuisca (per fornire dati sufficienti per la stima della ripetibilità). Al contrario, 2 repliche sono accettabili se si aumenta il numero delle serie analitiche;</li> </ul> </li> <li>• valutare di preparare nuovamente i reagenti/materiali per la taratura, ecc., tra una serie analitica e l’altra;</li> <li>• se possibile, effettuare l’analisi dei diversi materiali in ordine casuale all’interno della corsa analitica.</li> </ul> <p>Vedere la Sezione 6.6 (Precisione) e lo Schema di riferimento rapido 7 (Ripetibilità, ripetibilità intermedia e riproducibilità) della Guida Eurachem (1) per indicazioni sul numero di repliche.</p> <p>Si veda anche l’Appendice 2 di questo documento.</p>
<b>Valutazione dei dati</b>	<p>Vedere la Guida Eurachem (1) per ulteriori informazioni:</p> <p>Sezione 6.6 (Precisione), Schema di riferimento rapido 7 (Ripetibilità, ripetibilità intermedia e riproducibilità) e Appendice C (Analisi della varianza - ANOVA).</p>

<b>Note</b>	<p>Esistono vari modi per pianificare un disegno annidato (numero di “gruppi” di dati e numero di repliche per gruppo). L’obiettivo è disporre di dati sufficienti (gradi di libertà) per una stima ragionevole della variabilità all’interno dei gruppi e tra i gruppi. Ad esempio, 6 gruppi con 3 repliche per gruppo forniscono 5 gradi di libertà per la stima della varianza tra i gruppi e 12 gradi di libertà per la stima della varianza all’interno del gruppo. D’altronde, 11 gruppi con 2 repliche per gruppo forniscono 10 gradi di libertà per la stima della varianza tra i gruppi e 11 gradi di libertà per la varianza all’interno del gruppo.</p> <p>Se lo studio ha coinvolto diversi laboratori, la stima della precisione ottenuta rappresenterà la riproducibilità piuttosto che la ripetibilità intermedia.</p>
<b>Conclusioni</b>	<p>Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, dichiarare se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.</p>

<b>Caratteristica di prestazione</b>	<b>Robustezza</b>
<b>Descrizione</b>	Misura della capacità di un metodo di non essere influenzato da piccoli cambiamenti delle condizioni operative.

<b>Criteri di prestazione</b>	<p>Identificare quei parametri sperimentali la cui variazione durante l'applicazione del metodo può avere un impatto sui risultati della misurazione. Alcuni dei parametri tipicamente presi in considerazione sono i seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• la quantità di campione analizzato;</li> <li>• il tempo;</li> <li>• la temperatura;</li> <li>• il pH;</li> <li>• la concentrazione/volume dei reagenti.</li> </ul> <p>Determinare se variazioni predefinite di questi parametri hanno un impatto significativo sui risultati di misurazione.</p>
<b>Esperimenti</b>	<p>Gli strumenti di disegno sperimentale offrono una soluzione efficiente per valutare l'effetto di diversi parametri contemporaneamente.</p> <p>Ad esempio, il disegno sperimentale Plackett-Burman (un tipo di disegno fattoriale frazionario) permette lo studio di 7 parametri diversi attraverso 8 esperimenti.</p> <p>Si veda la Sezione 6.8 e lo Schema di riferimento rapido 8 (Robustezza) della Guida Eurachem (1) per indicazioni sulla pianificazione di uno studio della robustezza.</p>
<b>Valutazione dei dati</b>	Si vedano le seguenti sezioni della Guida Eurachem (1) per ulteriori informazioni: Sezione 6.8 e Schema di riferimento rapido 8.

<b>Note</b>	<p>Uno studio di robustezza non è generalmente richiesto per metodi normalizzati o per metodi consolidati.</p> <p>Uno studio di robustezza non richiede l'uso di un MRC (sebbene possa essere utilizzato se disponibile). Dal momento che lo studio di robustezza valuta i cambiamenti nei risultati di misurazione al variare dei parametri del metodo, non è necessario conoscere l'esatto valore di concentrazione dell'analita nel campione. Uno studio di robustezza può dunque essere condotto utilizzando campioni di prova.</p>
<b>Conclusioni</b>	Al termine della valutazione della caratteristica di prestazione, dichiarare se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.



<b>Caratteristica di prestazione</b>	<b>Incertezza di misura*</b>
<b>Descrizione</b>	Parametro associato ad un risultato di misurazione che rappresenta l'intervallo di valori che può essere ragionevolmente attribuito alla grandezza che si sta misurando.

<b>Principali fonti d'incertezza</b>	<b>Origine delle informazioni</b>
<p>Produrre un elenco delle principali fonti d'incertezza:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• grandezze di ingresso che appaiono nell'equazione usata per calcolare il risultato di misurazione;</li> <li>• altri passaggi previsti dalla procedura di misura (esempio: estrazione del campione e purificazione);</li> <li>• condizioni ambientali;</li> <li>• parametri strumentali.</li> </ul>	<p>Utilizzare i seguenti dati dallo studio di validazione e/o dal controllo qualità interno:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• stima della ripetibilità intermedia;</li> <li>• stima dello scostamento e dell'incertezza associata;</li> <li>• per fonti d'incertezza non adeguatamente descritte da dati di precisione o scostamento, ottenere ulteriori informazioni da: <ul style="list-style-type: none"> <li>– informazioni fornite dal produttore,</li> <li>– dati pubblicati,</li> <li>– esperimenti aggiuntivi.</li> </ul> </li> </ul>
<p>Esprimere le valutazioni dell'incertezza come scarti tipo (o scarti tipo relativi).</p> <p>Ottenere l'incertezza tipo composta utilizzando la regola della "radice quadrata della somma dei quadrati".</p> <p>Riportare l'incertezza estesa - moltiplicando l'incertezza tipo composta per il fattore di copertura, <math>k</math>.</p> <p>Tipicamente, <math>k=2</math> per il calcolo dell'incertezza estesa associato ad un livello di fiducia di circa il 95%.</p>	

<b>Note</b>	<p>L'incertezza di misura è trattata nella Sezione 6.7 della Guida Eurachem (1).</p> <p>Per informazioni dettagliate sulla stima dell'incertezza, si veda la Guida Eurachem/CITAC <i>Quantifying uncertainty in analytical measurement</i> (5).</p> <p>* 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 usando quella procedura di misura. [NdT: le indicazioni fornite in questo riquadro si riferiscono soltanto alla valutazione dell'incertezza in base ai dati di studi di validazione.]</p>
<b>Conclusioni</b>	<p>Includere una dichiarazione sull'idoneità per lo scopo dell'incertezza di misura.</p> <p>La Guida Eurachem/CITAC <i>Setting and using target uncertainty in chemical measurement</i> (6) fornisce indicazioni per la definizione di un valore obiettivo per l'incertezza di misura.</p>

## RIASSUNTO

<b>Caratteristiche di prestazione</b>	Inserire un riassunto dei valori e/o delle evidenze ottenute per ogni caratteristica di prestazione e una dichiarazione se i criteri di prestazione sono stati soddisfatti.
<b>Commenti</b>	Inserire ogni altro commento aggiuntivo sullo studio di validazione.
<b>Conclusioni</b>	Inserire una dichiarazione conclusiva che indichi se gli scopi previsti dallo studio sono stati raggiunti e se il metodo può essere considerato idoneo per lo scopo previsto.

## APPROVAZIONE

<b>Firma finale</b>	<p>Il piano di validazione deve essere approvato prima di iniziare qualsiasi attività sperimentale.</p> <p>Una volta completato lo studio, il passaggio finale prevede che la validazione sia dichiarata conclusa e il metodo approvato come idoneo per lo scopo.</p>
---------------------	---

## ELEMENTI DI APPRENDIMENTO DERIVANTI DALLA VALIDAZIONE

	<p>Risulta molto utile documentare ogni specifico elemento di apprendimento identificato nel corso dello studio di validazione. Fra questi:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Informazioni su passaggi critici del metodo.</li> <li>• Requisiti per il controllo di qualità nell'uso routinario del metodo.</li> </ul>
--	---

## APPENDICE 1.

### Lista di riscontro per uno studio di validazione

L'attività di validazione di un metodo deve essere sempre pianificata.

Questo supplemento e la Linea Guida Eurachem associata (1) forniscono indicazioni circa la pianificazione e il completamento degli studi di validazione, con particolare attenzione alla scelta di materiali idonei ed appropriati disegni sperimentali. Oltre queste considerazioni, il processo di pianificazione dovrebbe anche considerare una attenta valutazione dello stato del laboratorio riguardo la propria preparazione per eseguire lo studio. Ciò include la valutazione della disponibilità di personale con idonee conoscenze ed esperienza, la disponibilità della strumentazione adeguata e la comprensione della complessità del compito da realizzare. I laboratori sono responsabili dei propri studi di validazione e dello sviluppo di protocolli che soddisfino i requisiti di un particolare studio.

La seguente lista di riscontro ha lo scopo di aiutare i laboratori a garantire che tutti gli aspetti essenziali siano stati considerati durante il processo di pianificazione, e ad identificare ogni attività che è necessario intraprendere.

A. Requisiti analitici			
A.1	L'analita è specificato?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.2	Il misurando è indicato?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.3	La matrice e lo stato fisico dei campioni sono definiti?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.4	I livelli previsti / l'intervallo di misura richiesto sono definiti?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.5	La finalità del metodo è ben compresa?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.6	L'uso dei risultati è chiaramente indicato?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.7	Sono previsti specifici requisiti normativi?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.8	I risultati sono utilizzati per decisioni critiche?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.9	Le caratteristiche di prestazione da studiare sono identificate?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.10	I valori obiettivo per le caratteristiche di prestazione sono dichiarati?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.11	È noto quanto sarà utilizzato il metodo in <i>routine</i> ?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
A.12	È previsto un termine per iniziare ad usare il metodo in <i>routine</i> ?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			

<b>B. Obiettivi dello studio di validazione</b>			
B.1	Gli obiettivi del piano di validazione sono dichiarati?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
B.2	Il metodo deve essere validato per l'uso in un altro laboratorio?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			
<b>C. Conoscenza del metodo selezionato</b>			
C.1	Il metodo o metodi simili sono già ben noti nel laboratorio?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
C.2	È disponibile una descrizione chiara e non ambigua del metodo (es. una procedura operativa)?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
C.3	Sono noti/previsti passaggi critici?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
C.4	Sono necessarie procedure operative supplementari?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
C.5	Sono necessarie misure sanitarie / di sicurezza?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			
<b>D. Requisiti specifici per l'esecuzione del metodo</b>			
D.1	Sono previsti requisiti specifici per manipolare / conservare il campione?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
D.2	Sono previsti requisiti specifici per la preparazione del campione?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
D.3	Sono previsti requisiti specifici per la taratura delle apparecchiature?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
D.4	Sono previsti requisiti specifici per il monitoraggio delle condizioni ambientali?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			
<b>E. Competenze per la validazione</b>			
E.1	È stata nominata una persona responsabile dello studio?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
E.2	Gli analisti che eseguono la validazione hanno esperienza del metodo?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
E.3	È necessario un addestramento supplementare?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
E.4	È richiesta una supervisione durante la validazione?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			

<b>F. Apparecchiature e strutture</b>			
F.1	Sono richieste apparecchiature particolari per la preparazione del campione?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
F.2	Sono disponibili gli strumenti di misura necessari?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
F.3	Gli strumenti di misura sono correttamente tarati?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
F.4	Gli strumenti di misura sono adeguatamente mantenuti?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
F.5	Le strutture sono adeguate per l'esecuzione del metodo?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
F.6	Le condizioni ambientali sono sotto controllo?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			
<b>G. Risorse disponibili per la validazione</b>			
G.1	Sono disponibili campioni bianchi adatti?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
G.2	Sono disponibili MR/MRC?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
G.3	È possibile / necessario utilizzare campioni addizionati?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
G.4	Sono disponibili campioni di prova residui?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
G.5	La stabilità dei materiali per la validazione è sotto controllo?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
G.6	Sono disponibili metodi di riferimento?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			
<b>H. Valutazione di singole caratteristiche di prestazione</b>			
H.1	Gli obiettivi di prestazione sono specificati?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
H.2	Sono indicati i materiali da analizzare e sono disponibili in quantità sufficiente?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
H.3	Il piano sperimentale è stato definito (numero di replicati, ordine delle analisi)?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
H.4	Sono definite le modalità di analisi dei dati (inclusi i test statistici)?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
H.5	I criteri per valutare l'idoneità per lo scopo sono definiti?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			

<b>I. Ulteriori informazioni a supporto della valutazione delle prestazioni del metodo</b>			
I.1	Sono disponibili dati storici (es. di CQI o risultati della applicazione routinaria del metodo)?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
I.2	È possibile partecipare a PT durante la validazione?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
I.3	È possibile partecipare a/organizzare altri ILC?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			
<b>J. Approvazione del piano di validazione</b>			
J.1	Il piano di validazione è approvato da una funzione idonea?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			
<b>K. Al termine dello studio</b>			
K.1	La valutazione di idoneità per lo scopo è stata effettuata per ciascuna caratteristica di prestazione e per il metodo nel suo insieme?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
K.2	Il rapporto di validazione è firmato?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
K.3	La documentazione finale per il metodo (es. procedure operative) è pronta e firmata?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
K.4	Sono stati stabiliti i requisiti per il controllo di qualità su base continuativa?	<input type="checkbox"/> Sì <input type="checkbox"/> No	Attività:
Altri commenti / attività			

## APPENDICE 2.

### Piano sperimentale – esempio di un disegno sperimentale annidato

Ci sono molti modi in cui gli esperimenti possono essere progettati per fornire i dati necessari per uno studio di validazione. Con una attenta pianificazione, è possibile ottenere dati per diverse caratteristiche di prestazione con un singolo set di esperimenti. Il piano illustrato in Tabella 1 è un esempio di un disegno sperimentale annidato. Le misurazioni replicate per ciascun materiale sono raggruppate per sessioni analitiche (da 1 a  $p$ ) e sono eseguite in condizioni di ripetibilità (con  $n$  replicati per sessione). Se le sessioni analitiche sono effettuate in giorni differenti (e da analisti differenti, utilizzando diversi strumenti, se possibile) si possono ottenere stime sia della ripetibilità che della ripetibilità intermedia. Se nell'esperimento si includono dei MRC (da 1 a  $q$ ) e/o campioni addizionati (da 1 a  $z$ ), è anche possibile ottenere una stima dello scostamento dal valore di riferimento. I materiali inclusi nello studio saranno funzione dello scopo del metodo, degli obiettivi della validazione e dei materiali disponibili. Materiali tipici sono inclusi come esempi. L'obiettivo dovrebbe essere coprire lo scopo del metodo in termini di livello di analita e matrice del campione.

#### Legenda alla Tabella 1

$p$	numero di sessioni analitiche
$n$	numero di replicati durante ogni sessione analitica
Campione bianco	campione che non contiene l'analita/i di interesse
Campione 1 Campione $m$ precisione	campioni di prova residui utilizzati per valutare la
MRC 1... MRC $q$	materiali di riferimento certificati utilizzati per stimare lo scostamento. Possono essere anche usati per valutare la precisione
Campione addizionato a basso livello	campione addizionato ad un livello prossimo al LOQ atteso/precedentemente stimato per confermare che può essere misurato
Campione addizionato 1..., Campione addizionato $z$	campioni addizionati utilizzati per valutare il recupero (si noti che sarà necessario analizzare anche i campioni prima della aggiunta). Possono essere usati anche per valutare la precisione.

La pianificazione prevede un certo numero di differenti sessioni analitiche ( $p$ ) con dei replicati ( $n$ ) durante ciascuna sessione. Le sessioni analitiche dovrebbero essere effettuate in diversi giorni, ma non devono essere eseguite tutte in giorni differenti. Ad esempio, se sono pianificate 10 sessioni analitiche, è accettabile completare lo studio in 5 giorni effettuando due sessioni al giorno.

Tuttavia, i fattori che sono variati tra ogni sessione analitica (analista, strumento di misura, ecc.) devono essere valutati per garantire una stima affidabile della ripetibilità intermedia ottenuta.

**Tabella 1. Esempio di un disegno sperimentale annidato**

Materiale/Caratteristica di prestazione									
Sessione analitica	Replicato	Bianco campione	Campione 1	Campione $m$	MRC 1	MRC $q$	Campione addizionato a basso livello	Campione addizionato 1	Campione addizionato $z$
		• LOD • LOQ	• Ripetibilità • Ripetibilità intermedia	• Ripetibilità • Ripetibilità intermedia	• Scostamento • Ripetibilità • Ripetibilità intermedia	• Scostamento • Ripetibilità • Ripetibilità intermedia	• Conferma del LOQ	• Recupero • Ripetibilità • Ripetibilità intermedia	• Recupero • Ripetibilità • Ripetibilità intermedia
1	1	Campione bianco	Campione 1	Campione $m$	MRC 1	MRC $q$	Campione addizionato a basso livello	Campione addizionato 1	Campione addizionato $z$
1	...	Campione bianco	Campione 1	Campione $m$	MRC 1	MRC $q$	Campione addizionato a basso livello	Campione addizionato 1	Campione addizionato $z$
1	$n$	Campione bianco	Campione 1	Campione $m$	MRC 1	MRC $q$	Campione addizionato a basso livello	Campione addizionato 1	Campione addizionato $z$
...									
$p$	1	Campione bianco	Campione 1	Campione $m$	MRC 1	MRC $q$	Campione addizionato a basso livello	Campione addizionato 1	Campione addizionato $z$
$p$	...	Campione bianco	Campione 1	Campione $m$	MRC 1	MRC $q$	Campione addizionato a basso livello	Campione addizionato 1	Campione addizionato $z$
$p$	$n$	Campione bianco	Campione 1	Campione $m$	MRC 1	MRC $q$	Campione addizionato a basso livello	Campione addizionato 1	Campione addizionato $z$

Per ottenere valutazioni affidabili delle caratteristiche di prestazione, è opportuno considerare da 5 a 14 gradi di libertà per le stime della variabilità durante la sessione e tra le sessioni analitiche. I dati del piano sperimentale mostrato in precedenza possono essere analizzati mediante un test ANOVA ad una via (si veda l'Appendice C della Guida Eurachem (1)). Applicando il test ANOVA, i gradi di libertà sono  $p(n-1)$  per il termine relativo alla variabilità nella sessione (assumendo lo stesso numero di replicati in ogni gruppo), e  $p-1$  per il termine relativo alla variabilità tra le sessioni. Pertanto, ci sono un numero di combinazioni del numero di sessioni analitiche e dei replicati nella stessa sessione che forniranno dati sufficienti.



## BIBLIOGRAFIA

Un elenco aggiornato di riferimenti bibliografici relativi alla qualità nelle misurazioni analitiche (*Eurachem Reading List*) è disponibile sul sito Eurachem ([www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)), sezione *Publications*.

1. 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 all'indirizzo: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>; ultima consultazione: 24/08/2023. [Traduzione italiana: 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)].
2. Europa. Regolamento di esecuzione (UE) 2021/808 della Commissione del 22 marzo 2021 sul rendimento dei metodi analitici in relazione ai residui di sostanze farmacologicamente attive impiegate negli animali destinati alla produzione di alimenti, sull'interpretazione dei risultati e sui metodi da utilizzare per il campionamento e che abroga le decisioni 2002/657/CE e 98/179/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 180 del 21 maggio 2021.
3. Youden WJ, Steiner EH. *Statistical Manual of the AOAC (Association of Official Analytical Chemists)*. Rockville, MD: AOAC International; 1975.
4. Cantwell H (Ed.). *Blanks in method validation – Supplement to Eurachem Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. 1st edition.* Eurachem; 2019. Disponibile all'indirizzo: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/blanks-in-method-validation>; ultima consultazione: 24/08/2023.
5. Ellison SLR, Williams V (Ed.). *Eurachem/CITAC Guide CG4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3rd edition.* Eurachem; 2012. Disponibile all'indirizzo: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/quam>; ultima consultazione 24/08/2023.
6. Bettencourt da Silva R, Williams A (Ed.). *Eurachem/CITAC Guide: Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement. 1st edition.* Eurachem; 2015. Disponibile all'indirizzo: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/gd-stmu>; ultima consultazione 24/08/2023.



**SUPPLEMENTO EURACHEM**  
**Uso dei bianchi**  
**nella validazione dei metodi**

*Ringraziamenti del documento originale*

Questo documento è stato prodotto dai membri del gruppo di lavoro Eurachem “Validazione dei metodi”.  
Quelli che hanno contribuito a questo documento sono indicati di seguito.

**Il Gruppo di lavoro Eurachem è composto da:**

Vicki Barwick	<i>LGC, Regno Unito</i>
Burçu Biniçi	<i>Ulusal Metroloji Enstitüsü, Turchia</i>
Helen Cantwell (editor)	<i>The State Laboratory, Irlanda</i>
John Clancy	<i>Henkel Ireland, Irlanda</i>
Pieter Dehouck	<i>Commissione Europea</i>
Elin L. F. Gjengedal	<i>Norwegian University of Life Sciences, Norvegia</i>
Emanuela Gregori	<i>Istituto Superiore di Sanità, Italia</i>
Anders Karlsson	<i>RISE Research Institute of Sweden, Svezia</i>
Guy Lamon	<i>Société Générale de Surveillance, Belgio</i>
Pedro P. Morillas Bravo	<i>Canal de Isabel II, Spagna</i>
Ulf Örnemark	<i>Emendo Dokumentgranskning, Svezia</i>
Marina Patriarca	<i>Istituto Superiore di Sanità, Italia</i>
Francisco Raposo	<i>Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Spagna</i>
Lorens P. Sibbesen	<i>Labquality International, Danimarca</i>
Isabelle Vercauteren	<i>BELAB, Belgio</i>
Perihan Yolci Ömeroglu	<i>Bursa Uludağ Üniversitesi, Turchia</i>

**Il gruppo di lavoro per la versione italiana è composto da:**

Curatrici:

Emanuela Gregori<sup>(a)</sup>, Marina Patriarca<sup>(b)</sup>

Traduzione:

Prefazione	Emanuela Gregori <sup>(a)</sup> Marina Patriarca <sup>(b)</sup>
<b>Cap. 1.</b> Introduzione e scopo <b>Cap. 2.</b> Tipo e utilizzo dei bianchi nella validazione del metodo 2.1. Bianco di taratura	Veruscka Mannoni <sup>(c)</sup>
2.2. Bianco procedurale 2.3. Bianco reagente 2.4. Bianco solvente 2.5. Campione bianco 2.6. Approcci quando non è disponibile un campione bianco adeguato	Federica Aureli <sup>(d)</sup>
Bibliografia	Valeria Patriarca <sup>(a)</sup>

<sup>(a)</sup> Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma<sup>(b)</sup> Gruppo di lavoro "Validazione dei metodi", Eurachem<sup>(c)</sup> Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma<sup>(d)</sup> Centro Nazionale Controllo e Valutazione dei Farmaci, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## PREFAZIONE

La seconda edizione della Guida Eurachem *The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics* (1) è stata pubblicata nel 2014.

Da allora il gruppo di lavoro Eurachem “Validazione dei metodi” ha identificato diverse aree in cui sarebbero opportuni ulteriori approfondimenti e ha preparato indicazioni aggiuntive sotto forma di documenti supplementari, che dovrebbero essere utilizzati insieme alla Guida e non isolatamente.

# 1. INTRODUZIONE E SCOPO

I “bianchi” sono uno strumento importante, utilizzato nella determinazione della maggior parte delle caratteristiche di prestazione durante il processo di validazione di un metodo (si veda la sezione 5.4.1 della Guida Eurachem) (1). Inoltre, spesso, i “bianchi” sono inclusi in ogni ciclo analitico durante le analisi di *routine*. Esistono diversi tipi di “bianchi” e l’analista deve considerare quali siano i “bianchi” da includere durante la progettazione del piano di validazione del metodo. L’obiettivo di questo documento è descrivere i diversi tipi di “bianchi” che possono essere utilizzati durante la validazione del metodo e fornire indicazioni per le situazioni in cui può essere difficile ottenere una matrice bianca adeguata. Non tutti i “bianchi” discussi in questo documento sono necessari in ogni validazione, mentre i “bianchi” utilizzati durante l’uso routinario del metodo, come ad esempio quelli utilizzati per la correzione della linea di base, non rientrano nello scopo di questo documento. È opportuno sottolineare che alcune tecniche, come la cromatografia, si basano sul rilevamento di un picco al di sopra del rumore di fondo. Quindi, per la determinazione di alcune caratteristiche di prestazione, ad esempio il limite di rivelabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ), è necessario utilizzare un campione contenente un basso livello di analita anziché un “bianco”. Ulteriori indicazioni al riguardo sono fornite nella sezione 6.2.2 della Guida Eurachem (1). La Figura 1 mostra i diversi tipi di “bianchi” classificati in base all’uso previsto (bianchi per la taratura, bianchi procedurali) o in base alla composizione (reagente, solvente o campione) insieme ai loro possibili utilizzi nella validazione del metodo. Queste tipologie di “bianchi” sono discusse nel capitolo seguente.

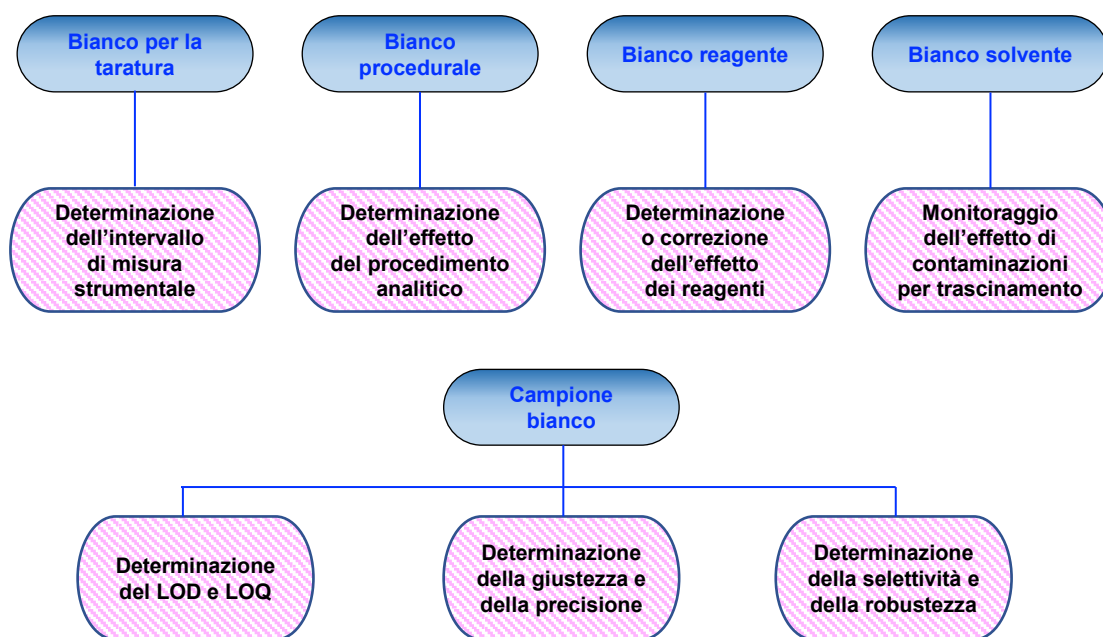


Figura 1. Tipo e utilizzo dei “bianchi” nella validazione del metodo

## **2. TIPO E UTILIZZO DI “BIANCHI” NELLA VALIDAZIONE DEL METODO**

### **2.1. Bianco per la taratura**

La sezione 6.3 della Guida Eurachem (1) tratta la caratteristica di prestazione “intervallo di misura”. Quando si determina l’intervallo di misura dello strumento (ovvero l’intervallo di concentrazioni nei campioni processati [NdT: ad esempio, mineralizzati o estratti] che possono essere presentati allo strumento per la misurazione) è necessario preparare ed analizzare MR per la taratura, incluso un bianco, cioè un materiale che non contiene gli analiti di interesse ad un livello rilevabile. È necessario determinare qualsiasi segnale rilevato dallo strumento che non sia dovuto alla presenza dell’analita (o degli analiti). Questo segnale è noto come segnale del bianco. Per determinare l’intervallo di misura del metodo, è necessario utilizzare MR o campioni addizionati che siano stati sottoposti all’intera procedura di misura. In questo caso, il bianco utilizzato dovrebbe essere un campione bianco (si veda il paragrafo 2.5).

### **2.2. Bianco procedurale**

Un bianco procedurale è un campione che non contiene la matrice, che viene sottoposto all’intera procedura di misura e analizzato nelle stesse condizioni di un campione di prova (2). Nella preparazione di bianchi procedurali spesso si usa acqua in sostituzione della matrice. I bianchi procedurali possono essere utilizzati per valutare eventuali contaminazioni o interferenze causate, ad esempio, da reagenti o contenitori, oppure introdotte in una qualsiasi fase della procedura di misura.

### **2.3. Bianco reagente**

Un bianco reagente è una miscela di tutti quei solventi e/o reagenti che verrebbero presentati al rivelatore durante l’analisi di un campione di prova, e viene analizzata per determinare se contribuisca al segnale di misura. I bianchi reagente vengono spesso utilizzati in tecniche, quali la spettrofotometria, per azzerare lo strumento prima di analizzare campioni di prova e altri bianchi. Si dovrebbe analizzare un bianco reagente anche nei casi in cui, prima dell’analisi, sia necessaria una reazione (derivatizzazione, complessazione) con l’analita nei campione di prova. Questo bianco reagente può essere usato per determinare ogni interferenza causata dalla procedura di reazione e dovrebbe essere incluso sia nel processo di validazione sia durante l’utilizzo routinario del metodo. Un bianco reagente non contiene la matrice.

### **2.4. Bianco solvente**

Un bianco solvente è costituito dal(i) solvente(i) contenuto(i) nella soluzione presentata allo strumento. Può essere usato durante la validazione per stimare ogni interferenza potenzialmente



presente nel solvente. L'analisi dei bianchi solvente effettuata direttamente dopo i MR per la taratura, altri MR o campioni bianchi addizionati può essere utilizzata per dimostrare l'eventuale trasferimento di analita da un campione a quello successivo (*carry over*). I bianchi solvente vengono spesso utilizzati nei metodi cromatografici.

## 2.5. Campione bianco

La Guida Eurachem (1) introduce il concetto di campioni bianchi nella Sezione 5.4.1, in cui si afferma: *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.*

I campioni bianchi, anche chiamati bianchi matrice, possono essere:

- inclusi negli esperimenti per determinare la selettività del metodo. L'analisi di campioni bianchi può essere utilizzata per determinare la presenza di componenti della matrice che potrebbero interferire con la capacità del metodo di prova di misurare l'analita di interesse (3) (la selettività è discussa nella Sezione 6.1 della Guida Eurachem) (1);
- inclusi negli esperimenti per la stima di LOD e LOQ del metodo (per metodi dove si ottiene un segnale misurabile del bianco, ad esempio, spettroscopia atomica (si veda la Sezione 6.2 della Guida Eurachem) (1);
- inclusi negli esperimenti per la valutazione dell'intervallo di misura del metodo (si veda la Sezione 6.3.5 della Guida Eurachem) (1);
- utilizzati nella preparazione di campioni addizionati (quando non sono disponibili materiali di riferimento) negli esperimenti per la stima della giustezza, della precisione e della robustezza del metodo (si vedano le Sezioni 6.5, 6.6 e 6.8 della Guida Eurachem) (1).

I campioni bianchi possono anche essere inclusi nelle procedure per il controllo di qualità interno, che devono essere messe in atto per dimostrare che la procedura di misura mantenga l'idoneità per lo scopo durante il suo utilizzo routinario.

Tuttavia esistono situazioni in cui un laboratorio non può ottenere un campione bianco. Ad esempio, l'analisi di residui di pesticidi in alimenti e mangimi implica spesso l'uso di metodi multi-analita per verificare la presenza di centinaia di analiti. Se una matrice contenente quantità non misurabili di tutti questi analiti non fosse disponibile, i laboratori potrebbero dover utilizzare una data matrice anche se contenente bassi livelli di alcuni degli analiti. Altre sostanze hanno utilizzi ed applicazioni talmente diffuse da essere presenti ovunque nell'ambiente e, pertanto, matrici bianche semplicemente non esistono (4, 5).

In alcune applicazioni analitiche, i componenti della matrice influenzano il segnale del rivelatore (6-8). Per prendere in considerazione questi effetti matrice, la curva di taratura è solitamente preparata in bianchi matrice. Quando la matrice è di natura variabile sopraggiungono delle difficoltà – ad esempio, alimenti trasformati, dove i componenti della matrice differiscono da campione a campione.

Quando non esiste un campione bianco può essere necessario un approccio alternativo.

## 2.6. Approcci possibili in situazioni in cui non è disponibile un campione bianco adeguato

### 2.6.1. Correzione del bianco

Si consideri il caso, sopracitato nel paragrafo 2.5, di un metodo multi-analita per l'analisi di pesticidi. Un laboratorio che desideri dimostrare la selettività del metodo deve farlo con un campione che conterrà almeno alcuni analiti, poiché la difficoltà di acquisire un campione bianco privo di tutti gli analiti è ben nota. Un ente di accreditamento ha descritto il campione bianco come “la matrice (corrispondente) pura o un campione naturale con il minor contenuto noto possibile” (9). Se il contenuto dell'analita è noto, allora, ciascuna misurazione condotta durante il processo di validazione può essere corretta per la presenza dell'analita nel campione usato al posto del bianco. Il laboratorio deve quindi poter determinare il contenuto dell'analita nel campione che si propone di usare in sostituzione di un campione bianco per ottenere “un campione naturale con il minor contenuto noto possibile” (9). Le opzioni disponibili per il laboratorio comprendono:

- la ripetizione dell'analisi del campione da utilizzare in sostituzione di un bianco, inserito nel disegno sperimentale per la dimostrazione della selettività. Può quindi essere valutato il contenuto di analita in questo campione;
- la determinazione con il metodo delle aggiunte standard, se appropriato;
- l'analisi con un metodo alternativo, validato (con un LOQ inferiore);
- l'analisi con un metodo validato (con un LOQ inferiore) in un altro laboratorio.

Indipendentemente dall'approccio usato, il laboratorio deve assicurarsi che esso consenta di dimostrare l'idoneità per lo scopo del proprio metodo.

### 2.6.2. Uso di fattori di correzione nelle curve di taratura

L'utilizzo di curve di taratura preparate in bianchi procedurali, anziché in matrice, seguito dall'applicazione di un fattore di correzione alla risultante curva di taratura, è stato impiegato nei casi in cui non sia possibile reperire campioni bianchi (5).

Per poter applicare questo metodo è necessario dimostrare che:

- entrambe le curve di taratura (con e senza matrice) siano lineari;
- la relazione esistente tra le curve di taratura senza matrice e quelle in matrice sia costante per un periodo di tempo/sequenza di iniezioni (7).

In questo caso, è possibile calcolare un fattore di correzione ed eseguire le analisi utilizzando curve di taratura in solvente anziché in matrice (10). Tale fattore di correzione deve essere monitorato durante le applicazioni routinarie del metodo per assicurarsi che rimanga appropriato.

### 2.6.3. Bianco simulato

In alcuni casi, qualora non si possa ottenere campione bianco, è possibile simulare una matrice. Per matrici quali l'acqua di mare, ad esempio, è possibile produrre un bianco simulato dissolvendo opportuni sali minerali in acqua (11, 12). La carta da filtro priva di ceneri può essere adatta per l'utilizzo come bianco quando vengono analizzati materiali di origine vegetale (2).

### 2.6.4. Tecniche alternative

Se gli approcci sopra descritti non sono adatti, il laboratorio potrebbe dover riesaminare il tipo di taratura usata nel metodo e considerare una tecnica alternativa come quella delle aggiunte standard (13).

Il procedimento per la scelta di un campione bianco, o di un approccio alternativo adatto, è indicato in Figura 2.

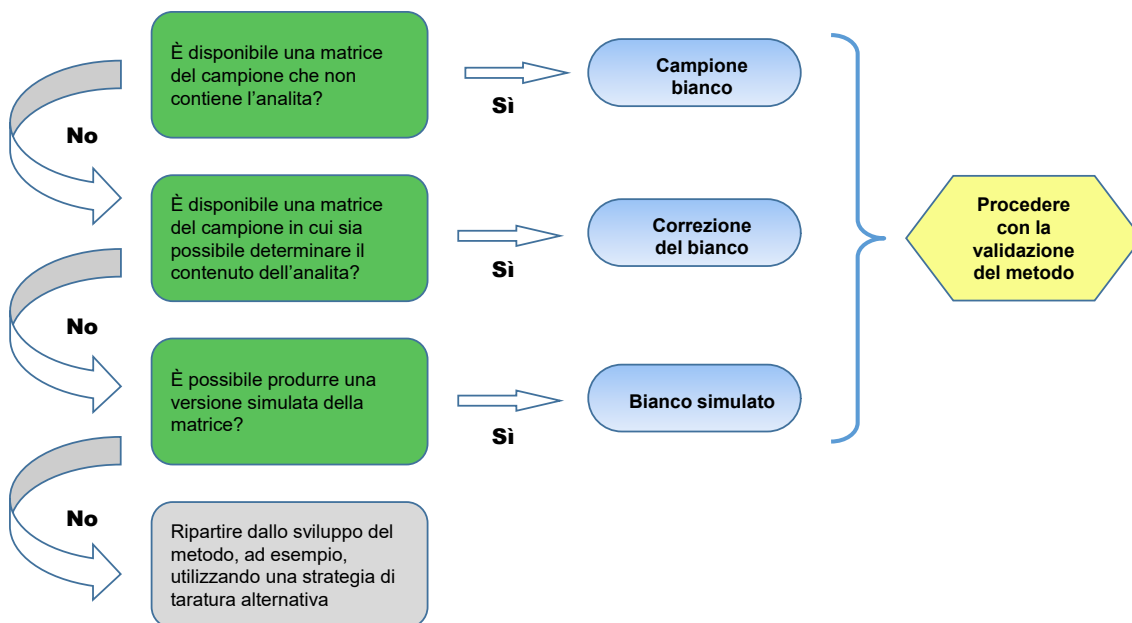


Figura 2. Scelta del campione bianco per la validazione di un metodo

## BIBLIOGRAFIA

Un elenco aggiornato di riferimenti bibliografici relativi alla qualità nelle misurazioni analitiche (*Eurachem Reading List*) è disponibile sul sito Eurachem ([www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)), sezione *Publications*.

1. 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 all'indirizzo: <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>; ultima consultazione: 24/08/2023. [Traduzione italiana: 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].
2. IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry. *Analytical Chemistry Division, Compendium of analytical nomenclature. 3rd Edition*, IUPAC Orange Book, prepared for publication by Inczedy J, Lengyel T, Ure AM. Blackwell Science, Ltd., Oxford, UK 1998. Disponibile all'indirizzo: <https://iupac.org/what-we-do/books/orangebook/>; ultima consultazione 24/08/2023.
3. Europa. Regolamento di esecuzione (UE) 2021/808 della Commissione del 22 marzo 2021 sul rendimento dei metodi analitici in relazione ai residui di sostanze farmacologicamente attive impiegate negli animali destinati alla produzione di alimenti, sull'interpretazione dei risultati e sui metodi da utilizzare per il campionamento e che abroga le decisioni 2002/657/CE e 98/179/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 180 del 21 maggio 2021.
4. Net S, Delmont A, Sempéré R, Paluselli A, Ouddane B. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): a review. *Sci Total Environ* 2015 May 15;515-516:162-80. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.02.013. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25723871.
5. Vavrouš A, Pavloušková J, Ševčík V, Vrbík K, Čabala R. Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2016 Jul 22;1456:196-204. doi: 10.1016/j.chroma.2016.06.014. Epub 2016 Jun 4. PMID: 27318508.
6. Gardner MJ, Gunn AM. Approaches in GFAAS: direct or standard additions. *Fresenius J Anal Chem* 1988;330:103-6.
7. Poole CF. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J Chromatogr A* 2007 Jul 27;1158(1-2):241-50. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.018. Epub 2007 Jan 11. PMID: 17241638.
8. Hoff RB, Rübensam G, Jank L, Barreto F, Peralba M CR, Pizzolato TM, Díaz-Cruz S, Barceló D. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. *Talanta* 2015;132:443-50.
9. INAB Irish National Accreditation Board. *Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories (ISO 17025)*. INAB Guide PS15, Issue 4, February 2016. Disponibile all'indirizzo: <https://www.inab.ie/inab-documents/mandatory-policy/guide-to-method-validation-for-quantitative-analysis-in-chemical-testing-laboratories-iso-17025-.pdf>; ultima consultazione 24/08/2023.
10. Egea González FJ, Hernández Torres ME, Almansa López E, Cuadros-Rodríguez L, Martínez Vidal JL. Matrix-Effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. *J Chrom A* 2002;966:155-65.

11. ASTM International. *Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water*. ASTM D1141-98(2013). Versione aggiornata al 2021 disponibile all'indirizzo: <https://www.astm.org/d1141-98r21.html>; ultima consultazione 24/08/2023.
12. Kester DR, Duedall IW, Connors DN, Pytkowicz RM. Preparation of Artificial Seawater. *Limnology & Oceanography* 1967;12:176-9.
13. Ellison SLR, Thompson M, Standard additions: myth and reality. *Analyst* 2008;133:992-7.



*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di dicembre 2023, 10° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, dicembre 2023*