



**Seminario**  
**Stato ecologico dei fiumi**  
**ai sensi della Direttiva 2000/60/CE:**  
**valutazione della qualità del dato**



**ISPRA**

# **Esperienza di accreditamento dei metodi di valutazione dello stato ecologico per la componente diatomica**

**Camilla Puccinelli e Laura Mancini**  
**[camilla.puccinelli@iss.it](mailto:camilla.puccinelli@iss.it); [laura.mancini@iss.it](mailto:laura.mancini@iss.it)**

**Roma, 30 Novembre 2015**



# Prove accreditate riguardanti le comunità diatomiche

Denominazione della prova	Norma/metodo di prova
Valutazione dello stato ecologico: classificazione di campioni di diatomee bentoniche e calcolo dell'indice multimetrico di intercalibrazione	UNI EN 13946: 2005 + UNI EN 14407:2004 + ISTISAN 09/19
Valutazione dello stato ecologico: classificazione di campioni di diatomee bentoniche e calcolo dell'indice EPI-L	UNI EN 13946: 2005 + UNI EN 14407:2004 + CNR-ISE Report 2/13



# Accreditamento?

## Accreditamento:

procedimento con cui un organismo riconosciuto attesta formalmente la **competenza** di un organismo o persona a svolgere funzioni specifiche”

## UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005

Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura (Settembre 2005)

E' una norma per l'accreditamento, non per la certificazione (“competenza”)

**Condurre prove tecniche di laboratorio in conformità alla UNI conformità alla UNI EN ISO 17025 EN ISO 17025 (richiesta del D.Lgs. 152/2006 e smi).**



# Requisiti per l'accreditamento di un laboratorio di prova

- **REQUISITI GESTIONALI**
- **REQUISITI TECNICI**

# Requisiti Gestionali

- Organizzazione
- Sistema di gestione
- Tenuta sotto controllo della documentazione
- Riesame delle richieste, delle offerte e dei contratti
- Subappalto delle prove
- Approvvigionamento di servizi e di forniture
- Servizi al cliente
- Reclami
- Tenuta sotto controllo delle attività di prova non conformi
- Miglioramento
- Azioni correttive
- Azioni preventive
- Tenuta sotto controllo delle registrazioni
- Audit interni
- Riesami da parte della direzione



*UNI CEI EN ISO/IEC 17025, 2005. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura (paragrafo 4)*



# Requisiti Tecnici

- Metodi e/o Norme di riferimento
- Gestione del campione
- Luogo di lavoro e condizioni ambientali
- Apparecchiature
- Metodi di prova e validazione dei metodi
- Personale
- Presentazione dei risultati
  
- Assicurazione della qualità dei risultati di prova



## Requisiti tecnici per l'accreditamento del Valutazione dello stato ecologico: classificazione di campioni di diatomee bentoniche e calcolo dell'indice multimetrico di intercalibrazione

Metodo «non interno» o «normato» un metodo di prova che è stato emesso da un ente di normazione, come ad es. UNI, ISO, CEN, ASTM, ecc. o da altre organizzazioni riconosciute aventi come finalità quello di definire metodi di prova, come ad es. l'EPA, l'AOAC, il CNR-IRSA, l'ISTISAN

### Norme di Riferimento :

UNI EN 13946: 2005 + UNI EN 14407:2004 + ISTISAN 09/19,

### Normativa Cogente:

Decreto 260/2010.« Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali»



# Processo di Accreditemento

- Istruzioni Operative
- Luogo di lavoro e condizioni ambientali
- Apparecchiature
- Stima della ripetibilità e incertezza del metodo
- Personale
- Assicurazione controllo qualità





# Istruzioni Operative

- Istruzione Operativa –Campionamento diatomee
- Istruzione Operativa-Analisi delle Comunità diatomiche
- Istruzione operativa gestione del campione dall'arrivo in laboratorio sino alla fine della prova
- Modulo di lavoro diatomee bentoniche
- Foglio di Calcolo- ICMi
- Rapporto di Prova

# Gestione dei campioni

Sono state definite le modalità di gestione del campione dall'arrivo in laboratorio sino alla fine della prova:

- registrazione;
- identificazione;
- ispezione al ricevimento;
- criteri per l'accettazione/rifiuto;
- le modalità di immagazzinamento;
- conservazione ed eliminazione/restituzione dei campioni.

## Luogo di lavoro e condizioni ambientali

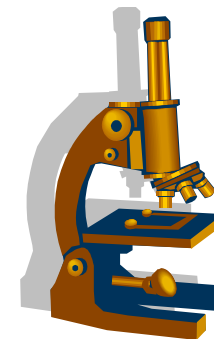
- Le condizioni ambientali che influenzano la qualità dei risultati, secondo quanto specificato dai singoli metodi di prova, dal costruttore delle apparecchiature, dal produttore dei materiali di riferimento e dei reattivi, vengono controllate e registrate. In particolare, allo stato attuale sono controllati e registrati:
  - temperatura degli apparecchi di conservazione dei campioni, dei materiali di riferimento e dei reattivi (frigo/ freezer);
  - temperatura del locale ove sono collocate le strumentazioni che richiedono particolari temperature durante il loro funzionamento (es. spettrometro di massa ad alta risoluzione, cromatografo liquido massa).
  
- Eventuali scostamenti dalle condizioni previste e impostate comportano il riesame documentato dell'eventuale effetto sui risultati delle prove ed è responsabilità del Direttore di Reparto far interrompere l'esecuzione delle prove qualora le condizioni ambientali siano tali da compromettere i risultati delle stesse.



# Apparecchiature

La scheda del Microscopio contiene:

- Codice dello strumento;
- il nome del costruttore;
- l'identificazione del tipo, il numero di serie o altra identificazione univoca attribuita dal costruttore;
- la data di acquisto ed attivazione e lo stato al momento del ricevimento;
- la collocazione, ove appropriato;
- il nome della persona del Reparto a cui è stata affidata l'apparecchiatura;
- le istruzioni del costruttore (manuali d'uso) o i riferimenti della loro collocazione;
- le verifiche di conformità alle specifiche (verifiche preliminari e accettazione iniziale prima della messa in servizio);
- lo stato aggiornato delle manutenzioni;
- e date, i risultati e le copie dei rapporti e dei certificati di tutte le tarature, le regolazioni, i criteri di accettazione e la data di scadenza della prossima taratura.





## Taratura del sistema di acquisizioni immagini del microscopio

- Materiale di riferimento: vetrino micrometrico certificato
- Il sistema viene tarato su diverse lunghezze utilizzando due obiettivi ( 40x; 100x)
- Viene effettuata una volta l'anno
- Rapporto di taratura



# Rapporto di taratura



<b>ISS</b> Dipartimento AMPP	MODULO	MO_IOT-QA-01_02
	<b>RAPPORTO TARATURA ACQUISITORE IMMAGINI</b>	Rev. 1
	<i>Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria</i>	Pag. 1/1

Rapporto n. \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_

Strumento soggetto a taratura Misuratore di lunghezza del software di acquisizione immagini mat. QA-02

Procedura seguita: IOT-QA-01 rev. 1

Vetrino micrometrico: C-14 tarata il: /// certificato n. C1120DD3B0 emesso da: ACCREDIA N. 051

Incertezza taratura vetrino ( $\mu\text{m}$ )

1,0

		Obiettivo 40X		Obiettivo 100X	
		L <sub>ref.</sub> ( $\mu\text{m}$ )	L <sub>ref.</sub> ( $\mu\text{m}$ )	L <sub>ref.</sub> ( $\mu\text{m}$ )	L <sub>ref.</sub> ( $\mu\text{m}$ )
		Risoluzione	50,0	100,0	30,0
		0,01	0,1	0,001	0,01
		50,26	100,8	30,000	48,92
		50,52	99,5	30,300	50,10
		50,78	100,5	30,870	49,90
		50,30	100,3	30,230	51,10
		50,20	101,0	30,500	50,90
<b>Media</b>	$\mu\text{m}$	50,41	100,42	30,380	50,18
<b>Scarto tipo</b>	$\mu\text{m}$	0,24	0,58	0,327	0,87
<b>errore (E)</b>	$\mu\text{m}$	0,41	0,42	0,380	0,18
<b>errore relativo (E%)</b>	%	0,8%	0,4%	1,3%	0,4%

#### INCERTEZZA DI TARATURA

<b>u ripetibilità</b>	$\mu\text{m}$	0,05	0,12	0,07	0,17
<b>u risoluzione</b>	$\mu\text{m}$	0,01	0,06	0,00	0,01
<b>u riferimento</b>	$\mu\text{m}$	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>u composta</b>	$\mu\text{m}$	0,50	0,52	0,50	0,53
<b>U taratura</b>	$\mu\text{m}$	1,00	1,03	1,01	1,06

#### INCERTEZZA D'USO

$\mu\text{m}$	1,42	1,45	1,39	1,24
%	2,8%	1,5%	4,6%	2,5%

Limiti di accettazione:

<b>INCERTEZZA D'USO MAX</b>	%	3,0%	3,0%	5,0%	3,0%
-----------------------------	---	------	------	------	------



## Verifica del metodo: Stima della ripetibilità e dell'incertezza del metodo



- Lo studio è stato progettato in modo tale da poter ricavare la variabilità del metodo, sia relativamente alla fase di campionamento che di laboratorio.
- Lo studio è stato effettuato su tre livelli di stato ecologico: elevato, sufficiente e cattivo
- La ripetibilità e l'incertezza sono state stimate osservando il grado di concordanza dei risultati di prove ripetute (10) effettuate sullo stesso campione.



# Verifica del metodo: Stima della ripetibilità e dell'incertezza del metodo



- Approccio “step-by-step” previsto dalla norma UNI CEI ENV 13005;
- Approccio “globale” previsto dalla norma ISO 21748, basato sull'uso della ripetibilità, riproducibilità e accuratezza.

norma UNI CEI ENV 13005:2000 Guida all'espressione dell'incertezza di misura

ISO 21748: 2010 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation





## Verifica del metodo:

# Stima della ripetibilità e dell'incertezza del metodo



Fasi incluse nello studio	Campionamento escluso			Camp. incluso
Stato ecologico del corso d'acqua	Cattivo ICMi	Sufficiente ICMi	Elevato ICMi	Sufficiente ICMi
1	0.218	0.549	1.079	0.606
2	0.247	0.582	0.953	0.504
3	0.251	0.552	0.972	0.521
4	0.231	0.541	1.021	0.544
5	0.220	0.561	1.098	0.586
6	0.233	0.520	1.008	0.591
7	0.236	0.541	0.989	0.520
8	0.227	0.551	0.987	0.602
9	0.248	<del>0.503</del>	0.974	0.561
10	0.243	0.555	0.951	0.555
Media	0.235	0.550	1.003	0.559
Scarto tipo (s)	0.012	0.017	0.050	0.037

Il test di Shapiro-Whilks, per verificare che tutte e quattro serie di dati mostrano una distribuzione normale.

Il test di Huber è stato utilizzato per la ricerca dei dati anomali, E' stato riscontrato un solo dato anomalo, nella serie "Campionamento escluso - Sufficiente"

# Verifica del metodo: Stima della ripetibilità e dell'incertezza del metodo

E' stato effettuato un F-test, per stabilire se la variabilità delle prove ottenute includendo il campionamento è significativamente superiore alla variabilità delle prove senza il campionamento. Si è osservato che il campionamento contribuisce in modo significativo sulla ripetibilità:

$$F_{\text{Obs}} = \frac{S_{\text{MAX}}^2}{S_{\text{MIN}}^2} = \frac{0,037^2}{0,017^2} = 4,79 \qquad F_{\text{Tab}(gl=9; gl=8; p=0,05)} = 3,39$$

E' stato calcolato quindi il contributo dovuto alla sola fase di campionamento, utilizzando la seguente relazione:

da cui

$$S_{\text{Tot}}^2 = S_{\text{Camp}}^2 + S_{\text{Lab}}^2 \quad \Rightarrow \quad S_{\text{Camp}}^2 = S_{\text{Tot}}^2 - S_{\text{Lab}}^2$$

$$S_{\text{Camp}} = \sqrt{S_{\text{Tot}}^2 - S_{\text{Lab}}^2} = \sqrt{0,037^2 - 0,017^2} = 0,033$$



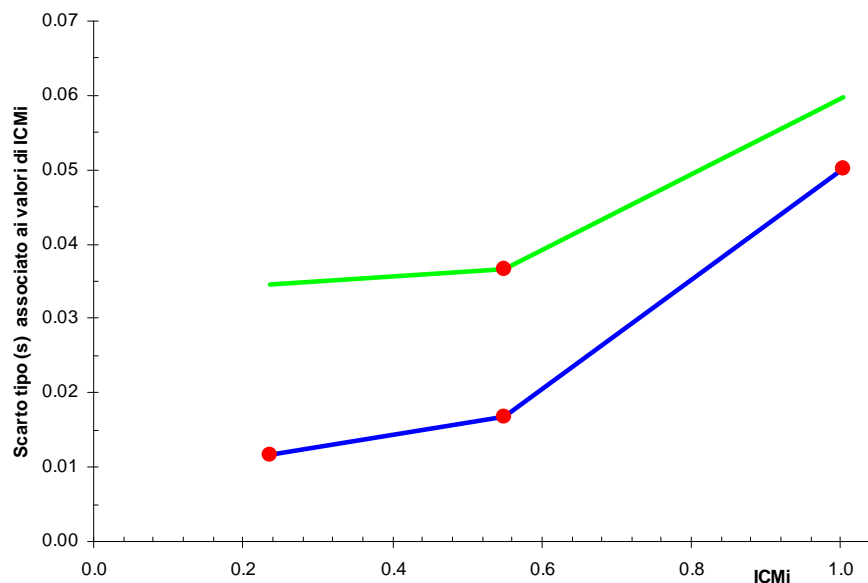
# Verifica del metodo: Stima della ripetibilità e dell'incertezza del metodo



	ICMi = 0.23	ICMi = 0.55	ICMi = 1.0
<b>Campionamento escluso</b>			
Scarto tipo (s)	<b>0.012</b>	<b>0.017</b>	<b>0.050</b>
Scarto tipo relativo (CV%)	5.0%	3.0%	5.0%
t-Student	2.23	2.26	2.23
Limite di ripetibilità (r)	<b>0.037</b>	<b>0.054</b>	<b>0.16</b>
<b>Campionamento incluso</b>			
Scarto tipo (s)	<b>0.035</b>	<b>0.037</b>	<b>0.060</b>
Scarto tipo relativo (CV%)	15%	6.6%	6.0%
t-Student	1.96	1.96	1.96
Limite di ripetibilità (r)	<b>0.10</b>	<b>0.10</b>	<b>0.17</b>

Il limite di ripetibilità (r), calcolato secondo la seguente ,  
 $r=t*s*\sqrt{2}$  relazione , rappresenta la massima differenza tra  
due determinazioni di ICMi, ad un livello di probabilità del  
95%.

# Verifica del metodo: Stima della ripetibilità e dell'incertezza del metodo Risultati



Incetezza (U) = 2s

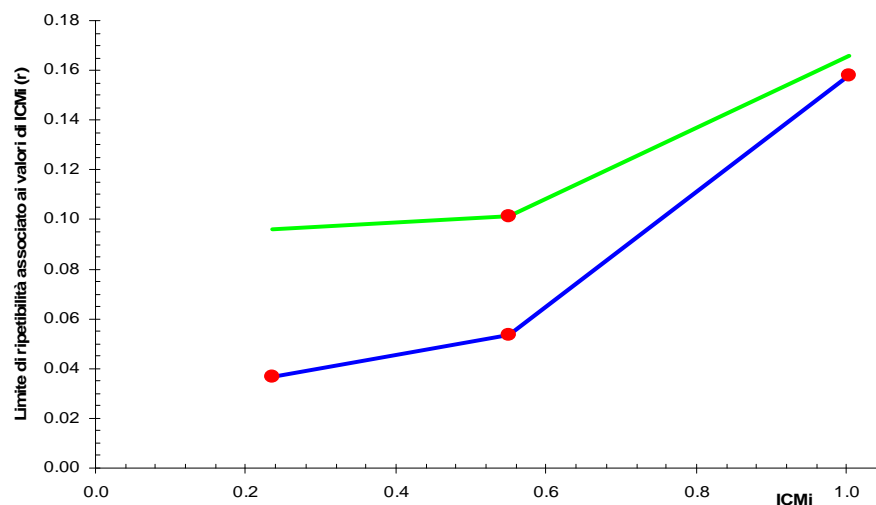
$$0 < ICMi < 0,55 \quad s = 0,023 * ICMi_{ottenuto} + 0,007$$

$$0,55 < ICMi < 1 \quad s = 0,073 * ICMi_{ottenuto} - 0,023$$

# Verifica del metodo: Stima della ripetibilità e dell'incertezza del metodo

## Risultati

Profilo del limite di ripetibilità (r)



$$0 < ICMi < 0,55 \quad r = 0,077 * ICMi_{ottenuto} + 0,019$$

$$0,55 < ICMi < 1 \quad r = 0,235 * ICMi_{ottenuto} - 0,075$$

Il limite di ripetibilità (r), calcolato secondo la seguente relazione,  $r = t * s / \sqrt{2}$  rappresenta la massima differenza tra due determinazioni di ICMi, ad un livello di probabilità del 95%.



## Personale: Requisiti dell' Addetto alla Prova

- **Scolarità**

- **Conoscenze**

Metodo e procedure standard (UNI EN 13946: 2005 + UNI EN 14407:2004) metodo di taratura e principio di funzionamento delle apparecchiature, concetti statistici fondamentali utilizzati per la valutazione della qualità delle misure, stima incertezza da associare ai risultati delle misurazioni, progettazione e sviluppo di metodi di prova.

- **Esperienza**

- **Abilità**

Campagne di indagine ambientale, identificazione delle specie diatomiche e analisi delle comunità diatomiche (Esperienza minima di un anno).



## Autorizzazione del personale addetto alla prova

*«Al fine di garantire che le attività critiche siano effettuate esclusivamente da personale qualificato, cioè in possesso dei requisiti precedentemente descritti solo specifico personale è autorizzato all'esecuzione» (ISO 17025, 2005)*

L' autorizzazione per la prova «Valutazione dello stato ecologico: classificazione di campioni di diatomee bentoniche e calcolo dell'indice multimetrico di intercalibrazione» viene effettuata una volta l'anno ed è divisa in due parti:

- 1) Autorizzazione al campionamento
- 2) Autorizzazione alla valutazione dello stato ecologico

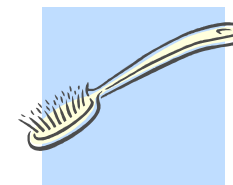
La competenza dell' addetto è stata valutata sui seguenti aspetti:

➤ Preparazione attrezzatura da campo



➤ Scelta del sito di campionamento

➤ Prelievo diatomee



➤ Compilazione scheda di campo

➤ Etichettatura, Conservazione e trasporto campione



# Scheda di valutazione

Preparazione attrezzatura da campo	Indicatore	Valutazione						Punteggio
Stivali	10	5					0	
Provetta	10	5					0	
spazzolino	10	5					0	
vaschetta	1	5					0	
Matita	1	5					0	
Guanti	3	5					0	
Pennarello indelebile	1	5					0	
Gps	1	5					0	
<b>Scelta del sito di campionamento</b>								
Adeguate Distanza da scarichi	10	5					0	
Assenza o ridotta ombreggiatura	10	5					0	
<b>Prelievo diatomee</b>								
Selezionare substrato idoneo	10	5	4	3	2	1	0	
Prelevare le diatomee sui substrati procedendo da valle a monte	10	5	4	3	2	1	0	
Prelevare le diatomee sulla superficie dei substrati esposta alla luce	10	5	4	3	2	1	0	
Riempire la provetta con 10-20 mL di acqua di fiume	10	5	4	3	2	1	0	
Sciacquare correttamente lo spazzolino all'interno della provetta	10	5	4	3	2	1	0	
<b>Compilazione scheda di campo</b>								
Nome del sito	10	5					0	
Data e ora	10	5					0	
Altre informazioni	1	5	4	3	2	1	0	
<b>Etichettatura, Conservazione e trasporto campione</b>								
Etichettare campione	10	5					0	
Trasporto campione	2	5					0	
							totale	<input type="text"/>
							%	<input type="text"/>

Requisito : l' addetto deve ottenere un punteggio maggiore dell' 80 %



## **Autorizzazione alla valutazione dello stato ecologico**

### ➤ **Preparazione ed Identificazione delle specie diatomiche presenti in un campione di riferimento:**

Come campione di riferimento è stato scelto il campione di diatomee utilizzato nell'esercizio di Interconfronto tra gli operatori coinvolti nel monitoraggio dei corsi d'acqua Italiani «Diatomee dei corsi d'acqua italiani» (12-13 gennaio 2011)

**Requisito: l' addetto deve identificare almeno l' 80 % delle specie**

### **Lettura in doppio del vetrino di riferimento, calcolo dell' ICMi e valutazione dello stato ecologico:**

Deve essere preparato un rapporto di prova che riporti le specie, le abbondanze e i valori dell' Icmi delle due letture dello stesso vetrino.

**Requisito: lo scostamento tra le due letture deve essere inferiore al limite di ripetibilità**



# Controllo Qualità

*«Evidenza oggettiva che il laboratorio è competente ad eseguire la prova»  
(ISO, 17025:2005)*

## **Viene effettuata semestralmente e prevede:**

1. Campionamento, analisi in doppio del campione:

Deve essere preparato un rapporto di prova che riporti le specie, le abbondanze valori dell' ICMi delle due letture dello stesso vetrino

**Requisito : lo scostamento tra le due letture deve essere inferiore al limite di ripetibilità**

2. Analisi in doppio di tre campioni a diversi stati ecologici: cattivo, sufficiente ed elevato.

Devono essere preparati rapporto di prova che riportino le specie, le abbondanze valori dell' Icmi delle due letture dello stesso vetrino.

**Requisito: lo scostamento tra le due letture deve essere inferiore al limite di ripetibilità**



## Presentazione dei risultati

I risultati di ogni prova effettuata su un campione sono comunicati al cliente mediante un documento identificato dalla scritta *“Rapporto di prova”* contenente tutte le informazioni necessarie per l’interpretazione corretta dei risultati.

- Descrizione del campione
- Identificativo del Campione al Prelievo
- Prova richiesta
- Metodo di prova
- Campionamento effettuato da
- Data di esecuzione della prova



## Assicurazione della qualità dei risultati di prova



Vengono realizzati controlli attraverso:

- **Audit interni**
- **Audit esterni**
- **Confronti interlaboratorio**



Grazie per l'attenzione