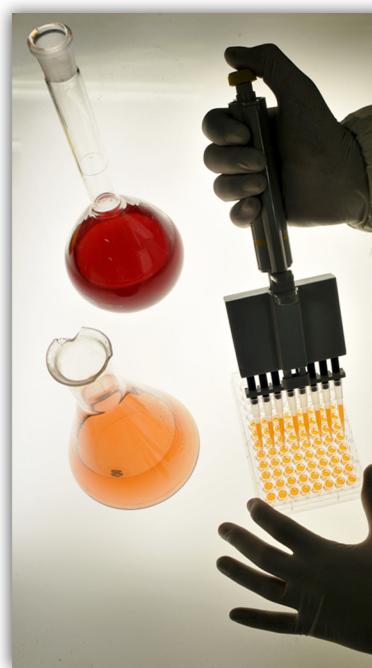




Criticità nel percorso di accreditamento dei saggi ecotossicologici



I Manuali di Ecotossicologia



MANUALI E LINEE GUIDA



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Criticità nel percorso di accreditamento dei saggi ecotossicologici

I Manuali di Ecotossicologia

L’Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), le Agenzie Regionali per la Protezione dell’Ambiente (ARPA), le Agenzie Provinciali per la Protezione dell’Ambiente (APPA) e le persone che agiscono per loro conto non sono responsabili per l’uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 121/2015
ISBN 978-88-448-0699-6

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica
ISPRA

Grafica di copertina: Sonia Poponessi
Foto di copertina: Archivio ISMAR-CNR

Coordinamento editoriale:

Daria Mazzella
ISPRA – Settore Editoria

Febbraio 2015

Autori

Renato Baudo, CNR - ISE

Fulvio Onorati, ISPRA

Cristian Mugnai, ISPRA

David Pellegrini, ISPRA

Marco Faimali, CNR – ISMAR

Veronica Piazza, CNR – ISMAR

Mario Aragno, ARPA PIEMONTE Dip. CUNEO

Tristano Leoni, Biologo Dirigente ARPAM, Dipartimento di Macerata

Stanislao Ziantoni, ANGQ

Ringraziamenti

Gli Autori desiderano ringraziare Giuseppe Mangialavori e Maurizio Carnevale del Servizio Garanzia di Qualità ISPRA per il loro prezioso supporto.

INDICE

PREMESSA	5
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	6
1.1 Scopo e campo di applicazione	7
1.2 Definizioni.....	8
CAPITOLO 2: METODI DI PROVA.....	12
2.1 Classificazione dei metodi di prova	12
2.2 Metodo di prova ufficiale e/o normalizzato	13
2.3 Metodi interni (non normalizzati e/o sviluppati dal laboratorio)	14
CAPITOLO 3: VALIDAZIONE PRIMARIA DEI METODI DI PROVA INTERNI (NON NORMALIZZATI E/O SVILUPPATI DAL LABORATORIO).....	17
3.1 Definizione	17
3.2 Progettazione e pianificazione della sperimentazione.....	19
3.2.1 <i>Prima valutazione dei parametri di validazione</i>	19
3.2.2 <i>Identificazione delle fonti di incertezza</i>	23
3.2.3 <i>Quantificazione delle incertezze</i>	24
3.3 Stima definitiva dei parametri di validazione.....	30
3.3.1 <i>Stima della ripetibilità</i>	30
3.3.2 <i>Stima della robustezza</i>	31
CAPITOLO 4: VALIDAZIONE SECONDARIA DEI METODI DI PROVA NORMALIZZATI	35
4.1 Determinazione della ripetibilità	35
4.2 Assicurazione della Qualità dei dati	40
4.2.1 <i>Procedure di controllo</i>	41
4.3 Partecipazione a confronti interlaboratorio	41
4.3.1 <i>Livello di rischio</i>	43
4.3.2 <i>Tipo di prove valutative interlaboratorio disponibili</i>	43
4.3.3 <i>Prescrizioni legislative</i>	44
4.3.4 <i>Ulteriori elementi per la programmazione della frequenza di partecipazione a confronti interlaboratorio</i>	44
4.4 Carte di controllo.....	44
4.5 Qualifica degli operatori e mantenimento della loro competenza	46
CAPITOLO 5: CONFRONTO DEL RISULTATO CON I LIMITI DI LEGGE O DI SPECIFICA	49
CAPITOLO 6: CONCLUSIONI.....	52
BIBLIOGRAFIA	53

PREMESSA

Il crescente livello di internazionalizzazione delle normative e dei regolamenti europei, tra cui il REACH (regolamento CEE nr. 1907 del 2006), la MSFD (Marine Strategy Framework Directive), nonché la Direttiva Quadro sulle acque (2000/60/CE), vincola sempre più l'adempimento delle stesse e la trasmissione dei dati in sede comunitaria (e non solo) alle procedure di accreditamento, principalmente in accordo alla Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 (*"Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura"*), quale garanzia di qualità e standardizzazione dei dati da parte del soggetto produttore delle informazioni.

Tuttavia, sebbene i percorsi e le procedure di certificazione e accreditamento siano abbastanza definite e consolidate nel campo della chimica analitica classica, nulla è attualmente disponibile per le prove ecotossicologiche, sebbene esse siano ormai parte integrante di normative nazionali e comunitarie.

Considerato il ruolo svolto da ISPRA nello sviluppo, standardizzazione e applicazione di saggi biologici a matrici ambientali, la necessità di allinearsi ai requisiti delle normative europee come strategica, quanto strumentale, esigenza di partecipazione ai tavoli tecnici nazionali e internazionali, la crescente domanda di regole nel settore ecotossicologico da parte di soggetti pubblici e privati, ha indotto l'ISPRA ad intraprendere questa iniziativa, avviando con il presente documento, un percorso che possa inquadrare la problematica dell'accreditamento delle prove eseguite mediante i saggi biologici su matrici ambientali.

Nel febbraio del 2011 si è costituito un Gruppo di Lavoro, composto da esperti provenienti dal mondo industriale (Associazione Nazionale Garanzia della Qualità –ANGQ), scientifico accademico (CNR-ISMAR) e dal settore pubblico (ISPRA, ARPA Piemonte, ARPA Marche), con l'obiettivo di proporre una discussione sui problemi di accreditamento per i saggi ecotossicologici, da pubblicare sul sito di ISPRA nella collana *"I manuali di ecotossicologia"*.

La convergenza di punti di vista ed esperienze assai diverse, dal mondo della ricerca, a quella del laboratorio analitico, a quella dei soggetti istituzionali deputati al controllo, ha consentito di elaborare un primo contributo, sulla base del quale poter sviluppare regole specifiche per l'accreditamento delle prove ecotossicologiche, che tengano conto delle peculiarità e delle caratteristiche intrinseche di queste tipologie di analisi di laboratorio che, utilizzando modelli biologici, si distinguono profondamente e necessariamente dai metodi chimici. Non possiamo, infatti, non evidenziare le difficoltà riscontrate nel tentativo di mutuare l'approccio chimico delle procedure di accreditamento a quello prevalentemente biologico dei metodi ecotossicologici, a partire dalle stesse definizioni. In tal senso occorre infatti sottolineare, considerata la crescente necessità di valutare gli effetti di matrici ambientali sugli organismi viventi nel contesto nazionale, la valenza ecologica del saggio biologico (bioassay), così come tradizionalmente utilizzato, rispetto a quella meramente tossicologica della prova.

Questo documento, frutto dell'attività finora svolta, costituisce un primo passo con un obiettivo minimale di inquadramento della problematica e si rivolge alle figure (addetti e consulenti) che operano presso i laboratori di analisi e di ricerca del mondo pubblico e privato, fornendo elementi utili ai fini della predisposizione della documentazione necessaria a richiedere l'accreditamento di saggi ecotossicologici.

La proposta deve essere considerata uno strumento di lavoro; per una stesura più ampia e completa in merito alla tematica dell'accreditamento, infatti, viene richiesto un contributo alla comunità scientifica nazionale e a tutti gli utilizzatori che vorranno usufruirne.

GLI AUTORI

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

L'accreditamento è stato fortemente voluto dall'Unione Europea per assicurare che i prodotti che beneficiano della libera circolazione dei beni all'interno della Comunità soddisfino requisiti che offrano un grado elevato di protezione di interessi pubblici come la salute e la sicurezza in generale, la salute e la sicurezza sul luogo di lavoro, nonché la protezione dei consumatori, la protezione dell'ambiente e la sicurezza pubblica, assicurando che la libera circolazione dei prodotti non sia limitata in misura maggiore di quanto consentito ai sensi della normativa comunitaria di armonizzazione o altre norme comunitarie in materia.

Pertanto è stato emesso il Regolamento (CE) n. 765/2008 che definisce l'accreditamento come: *“attestazione da parte di un organismo nazionale di accreditamento che certifica che un determinato organismo di valutazione della conformità soddisfa i criteri stabiliti da norme armonizzate e, ove appropriato, ogni altro requisito supplementare, compresi quelli definiti nei rilevanti programmi settoriali, per svolgere una specifica attività di valutazione della conformità”*.

I Laboratori che si vogliono accreditare devono dimostrare di essere conformi alla UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, norma internazionale che specifica i requisiti generali di competenza per eseguire prove e/o tarature, compreso il campionamento attraverso qualunque metodo di prova (normalizzato, non normalizzato o sviluppato dai laboratori stessi). Tale dimostrazione deve essere fornita attraverso una valutazione di conformità svolta da una parte terza (Organismo di accreditamento), per garantire credibilità e fiducia a tutte le parti interessate della competenza e dell'imparzialità dei laboratori di prova. ACCREDIA è l'Ente unico nazionale di accreditamento designato dal Governo italiano, ossia l'unico ente riconosciuto in Italia ad attestare che gli organismi di certificazione ed ispezione, i laboratori di prova, anche per la sicurezza alimentare, e quelli di taratura abbiano le competenze per valutare la conformità dei prodotti, dei processi e dei sistemi agli standard di riferimento. Pertanto, l'accreditamento dimostra la competenza tecnica del laboratorio ad effettuare le prove indicate nello scopo dell'accreditamento.

I requisiti che un laboratorio di prova deve rispettare per dimostrare che opera secondo un sistema di gestione, che è tecnicamente competente ed è in grado di generare risultati tecnicamente validi sono stabiliti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. Questa norma incorpora tutti quei requisiti della norma ISO 9001 che sono significativi per lo scopo e campo di applicazione dei servizi di prova coperti dal sistema di gestione del laboratorio. Tuttavia, i laboratori di prova conformi alla Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 non necessariamente soddisfano tutti i requisiti della Norma ISO 9001 e al tempo stesso, la certificazione al sistema di gestione ISO 9001 non dimostra necessariamente la competenza del laboratorio a produrre dati tecnicamente validi.

ACCREDIA nel suo ruolo istituzionale di accreditamento ha emesso diversi documenti (regolamenti, rapporti tecnici procedure e moduli e guide di applicazione). In particolare tra questi si cita il Rapporto Tecnico RT-08 che stabilisce i requisiti per l'accreditamento dei laboratori di prova. In questo documento sono riportate prescrizioni integrative, non in contrasto con quelle della UNI CEI EN ISO/IEC 17025, ma utili per la sua applicazione e che, per lo scopo dell'accreditamento, hanno priorità sulla norma stessa (cfr. 2.2. RT-08).

1.1 Scopo e campo di applicazione

Il presente documento è rivolto ai laboratori di prova che intendono accreditare metodi di prova sui saggi ecotossicologici in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005.

Fatte salve le disposizioni generali di tale Norma, si intende approfondire la problematica dell'accreditamento nel caso specifico dei saggi ecotossicologici (**bioassay**), cioè dei saggi utilizzati per valutare se qualche componente (anche ignoto) del campione di prova determina un **effetto** biologico misurabile. Se tale effetto comporta una conseguenza negativa e/o indesiderata per gli organismi utilizzati nel saggio, l'effetto indica una **tossicità** del campione ed il saggio viene denominato **saggio di tossicità**.

Questi saggi presentano caratteristiche peculiari che li differenziano dai saggi chimici e microbiologici, in quanto l'effetto biologico, cioè il **determinando**, è interamente dipendente dal metodo utilizzato. Per questo, saggi biologici diversi, che stimano la tossicità utilizzando modelli biologici e procedure diverse, ottengono risultati ampiamente variabili. Secondo le definizione della EURACHEM/CITAC CG 4:2012, i saggi ecotossicologici possono essere considerati **metodi empirici**, con risultati espressi con riferimento al metodo, non corretti per qualsiasi **bias** intrinseco al metodo stesso.

I saggi ecotossicologici vengono applicati a campioni di composizione chimica nota (soluzioni di uno o più composti chimici), campioni di composizione chimica solo parzialmente nota (ad esempio, per composti chimici commerciali), oppure a campioni naturali (di composizione spesso sconosciuta o solo parzialmente caratterizzati) e solitamente prevedono di osservare, sui **modelli biologici** (biomolecole, frazioni subcellulari, cellule, tessuti, organi, organismi, popolazioni, comunità) esposti al campione di prova, eventuali differenze rispetto a modelli biologici del tutto simili, esposti però ad un **controllo negativo**. Le differenze possono essere di vario tipo, alcune di tipo quantale (es. mortalità: alla fine del saggio gli organismi sono vivi o morti), altre di tipo continuo (es. densità cellulare, bioluminescenza, ecc.).

Il saggio può prevedere il semplice confronto tra campione di prova e controllo negativo, nel qual caso i risultati possono essere espressi come valori relativi al controllo negativo. Sia campione di prova che controllo negativo vengono saggiati con più repliche, ed è quindi possibile calcolare media e scarto tipo sia per il campione, sia per il controllo.

Più frequentemente, il saggio viene effettuato, oltre che sul campione ambientale tal quale e sul controllo negativo, su opportune diluizioni del campione, in modo tale da consentire di calcolare la relazione concentrazione – effetto. Si procede quindi al calcolo della concentrazione efficace (EC_x) per la percentuale (x) voluta rispetto al modello biologico saggiato (es.: EC₅₀ – concentrazione efficace per il 50 % degli organismi saggiati), con gli associati limiti fiduciali della stima di EC_x.

Per l'accreditamento di un saggio ecotossicologico è di fondamentale importanza la disponibilità di una documentazione comprovante la regolare esecuzione del saggio in tutte le sue fasi, incluse la preparazione di campioni di prova e dei modelli biologici da utilizzare per il saggio, nonché la redazione del rapporto di prova finale.

Si ricorda che, se il metodo di prova da accreditare non prevede esplicitamente un trattamento sequenziale nella preparazione/esecuzione/lettura dei campioni, la statistica richiede che tutte queste operazioni vengano effettuate in modo randomizzato.

Nel seguito verranno descritti alcuni elementi utili al percorso di accreditamento di un saggio di prova. Per una loro corretta applicazione, si precisa che è indispensabile una approfondita conoscenza della Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, nonché dei documenti esplicativi prodotti da ACCREDIA.

1.2 Definizioni

Nei documenti ai quali si fa riferimento spesso compaiono termini che si possono prestare ad interpretazioni differenti. Pertanto, si ritiene opportuno riportare in questa sezione le definizioni dei termini utilizzati, precisando che tali definizioni sono in gran parte tratte dal sito <https://cdb.iso.org/cdb/search.action>. Poiché tale sito può a volte riportare, per lo stesso termine, definizioni diverse, di volta in volta è stata preferita quella più consona all'argomento trattato, citando peraltro il documento ISO di origine.

Alcuni termini, che necessitano di una trattazione più approfondita, sono invece definiti direttamente nel testo ove vengono richiamati per la prima volta.

Accuratezza (ISO3534-2: 2006): *grado di concordanza tra un risultato di una prova o di una misurazione ed il suo valore convenzionalmente vero.*

Note: Il termine "accuratezza", quando applicato ad un insieme di risultati di una prova o di una misurazione, implica una combinazione di elementi casuali e un errore sistematico comune o un componente di bias. Il termine "accuratezza" si riferisce ad una combinazione di giustezza e precisione.

Esprime un concetto qualitativo. Essendo le prove ecotossicologiche di natura empirica, i risultati ottenuti sono riferibili solo al protocollo del metodo impiegato e non a riferimenti “esterni”. Quindi, non è possibile valutare questo parametro.

Bias (scostamento) (ISO 3534-2:2006): *differenza tra un risultato atteso di una prova o di una misura e un valore vero.*

Bioassay (Biotoesting) (ISO 6107-2:2006): *(saggio biologico) tecnica per la valutazione qualitativa o quantitativa di un effetto biologico di sostanze in acqua tramite i cambiamenti di una attività biologica specificata.*

Campione di prova: *matrice ambientale da sottoporre a saggio biologico.*

Concentrazione (ISO/TS 20281:2006): *quantità del materiale di prova nell'ambiente di prova.*

Essa può essere espressa, per esempio, come milligrammi per litro in acqua e come milligrammi per chilogrammo per suolo, sedimento e cibo. La concentrazione e dose si riferiscono entrambe alla quantità del materiale di prova alla quale è sottoposto l'organismo di prova.

Concentrazione efficace continua (ISO/TS 20281:2006): *concentrazione del materiale di prova nell'acqua, suolo, o sedimento che induce una variazione x % nella dimensione dell'endpoint durante uno specificato intervallo di tempo.*

Essa può essere espressa, ad esempio, in milligrammi per litro o milligrammi per chilogrammo. Questo parametro viene stimato anche sulla base di modelli dose – risposta.

Concentrazione efficace quantale (ISO/TS 20281:2006): *concentrazione del materiale di prova nell'acqua, suolo, o sedimento che induce una variazione x% nella risposta durante uno specificato intervallo di tempo.*

Essa può essere espressa, ad esempio, in milligrammi per litro o milligrammi per chilogrammo. Il cambiamento x % nella risposta corrisponde all'effetto previsto sul x % di organismi di prova per una data concentrazione. Questo parametro viene stimato con modelli concentrazione – risposta.

Concentrazione con il più basso effetto osservato (LOEC) (ISO/TS 20281:2006): *la concentrazione minore tra quelle saggiate per la quale viene osservata una differenza statisticamente significativa rispetto al gruppo di controllo.*

La LOEC viene ottenuta tramite test delle ipotesi.

Concentrazione con nessun effetto osservato (NOEC) (ISO/TS 20281:2006): *la concentrazione saggidata immediatamente inferiore alla LOEC.*

La NOEC viene ottenuta tramite test delle ipotesi.

Concentrazione di non effetto (NEC) (ISO/TS 20281:2006): parametro che, quando usato nei modelli concentrazione - risposta, viene interpretato come *la più alta concentrazione per la quale il materiale in prova non influenza l'endpoint*, anche dopo un tempo molto lungo di esposizione.

Il valore di NEC (*No Observed Concentration*) equivale a EC₀ a tempo infinito.

Controllo negativo (ISO 5667-16:1998): *qualsiasi materiale o sostanza, ben caratterizzato, che, quando saggiano con una specifica procedura, dimostra l'affidabilità della procedura per fornire risposte riproducibili, appropriatamente negative, non reattive o minime nel sistema di prova.*

In pratica si tratta dell'acqua di diluizione senza campione di prova (ISO, 2004).

Controllo positivo (ISO 5667-16:1998): *qualsiasi materiale o sostanza, ben caratterizzato, che, quando saggiano con una specifica procedura, dimostra l'affidabilità della procedura per fornire risposte riproducibili, appropriatamente positive o reattive nel sistema di prova.*

Dati quantali o binari (ISO/TS 20281:2006): *dati generati quando si registra una particolare proprietà presente od assente in ciascun individuo.*

Un individuo presenta l'effetto o non lo presenta. Pertanto, questi dati possono esibire solo due stati. Tipicamente i dati quantali vengono presentati come il numero di individui che presentano la proprietà (ad es. mortalità) sul totale di individui osservati in ciascuna unità sperimentale. Sebbene questo possa essere espresso come frazione, va ricordato che non può essere omesso il numero totale di individui.

Dati continui (ISO/TS 20281:2006): *dati che (teoricamente) possono assumere qualsiasi valore in un intervallo aperto, ad esempio qualsiasi numero positivo* (es: misura della lunghezza o della massa corporea).

Per ragioni pratiche, la risoluzione della misura dipende dalla qualità dello strumento di misura. Ad esempio, se le unità di prova vengono osservate una volta al giorno, allora il "tempo alla schiusa" può essere registrato solo per giorni interi; tuttavia, la distribuzione sottesa del "tempo di schiusa" è continua.

Tipicamente, i dati continui hanno una dimensione (ad es., grammi, moli/litro).

Dati discreti (ISO/TS 20281:2006): *dati che hanno un numero finito o enumerabile di valori.*

Ci sono tre classi di dati discreti: nominali, ordinali e per intervalli. I dati nominali esprimono attributi qualitativi che non seguono un ordine naturale (ad es., colori). I dati ordinali riflettono la grandezza relativa dal minore al maggiore (ad es., un individuo può presentare nessun effetto, effetto minimo, effetto moderato o effetto elevato). Questi dati non possono essere interpretati con riferimento ad una scala relativa (ad es., una variabile ordinale con un valore pari a 4 può essere interpretata come maggiore di un valore di 2, ma non come pari al doppio). I dati ordinali possono spesso essere ridotti a dati quantali. Dati per intervalli (ad es., numero di uova o neonati per genitore) permettono un ordinamento per ranghi delle caratteristiche misurate e le differenze tra individui e gruppi possono essere quantificate. Spesso i dati per intervalli possono essere analizzati come se i dati fossero continui.

Effetto (ISO/TS 20281:2006): *cambiamento della risposta della variabile (endpoint) in considerazione nel campione di prova, confrontata con la risposta per la stessa variabile nel controllo negativo.*

Per endpoint quantali, un effetto è solitamente descritto come cambiamento della percentuale di individui interessati, mentre per endpoint continui, esso è tipicamente descritto come cambiamento

percentuale del valore medio dell'endpoint, ma può essere descritto anche come cambiamento assoluto.

Endpoint (o Risposta della variabile) (ISO/TS 20281:2006): *parametro biologico osservato* (es., sopravvivenza, numero di uova, dimensioni o crescita, livello enzimatico).

Un saggio ecotossicologico può avere uno o più endpoint.

Errore casuale (UNI CEI ENV 13005:2000): *risultato di una misurazione meno la media che risulterebbe da un numero infinito di misurazioni dello stesso misurando effettuate sotto condizioni di ripetibilità. Sono errori in genere imprevedibili e di modesta entità, che determinano una dispersione in più e in meno dei valori misurati attorno al valore medio (imprecisione della misura).*

Errore sistematico (UNI CEI ENV 13005:2000): *media che risulterebbe da un numero infinito di misurazioni dello stesso misurando, effettuate sotto condizioni di ripetibilità, meno un valore vero del misurando. Comportano uno scostamento (bias) del valore misurato rispetto al valore vero nel senso di un suo aumento o di una sua diminuzione (inaccuratezza della misura).*

Giustezza (UNI ISO5725:2004): *grado di concordanza tra il valore medio di un grande numero di risultati di prova ed un valore di riferimento accettato.*

La misura della giustezza è solitamente espressa in termini di *bias*. La giustezza è stata citata come “*accuratezza della media*”. Questo uso non è raccomandato.

Spesso il termine esatezza è stato utilizzato impropriamente in luogo di giustezza.

Incertezza di misura (UNI CEI ENV 13005:2000): *parametro associato al risultato di una misurazione che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando.*

Incertezza tipo (UNI CEI ENV 13005:2000): *incertezza del risultato di una misurazione espressa come scarto tipo.*

Incertezza tipo composta (UNI CEI ENV 13005:2000): *incertezza tipo del risultato di una misurazione allorquando il risultato è ottenuto mediante i valori di un certo numero di altre grandezze. Essa è uguale alla radice quadrata positiva di una somma di termini, che sono le varianze o le covarianze di quelle grandezze, pesate secondo la variazione del risultato della misurazione al variare di esse;*

Incertezza estesa (UNI CEI ENV 13005:2000): *grandezza che definisce, intorno al risultato di una misurazione, un intervallo che ci si aspetta comprendere una frazione rilevante della distribuzione di valori ragionevolmente attribuibili al misurando.*

Modello biologico: *entità biologica* (es., biomolecole, frazioni subcellulari, cellule, tessuti, organi, organismi, popolazioni, comunità) *che viene esposta al campione di prova in un saggio di tossicità.*

Ormesi (ISO/TS 20281:2006): *effetto dove la sostanza di prova è stimolante a basse concentrazioni, ma inibitrice alle alte concentrazioni, risultante in una relazione concentrazione – risposta di tipo bifasico (o ad U).*

L'effetto stimolante osservato può essere dovuto alla sostanza di prova, ma anche ad un artefatto sperimentale (ad es., effetto del solvente, attribuzione non casuale dei trattamenti tra le unità sperimentali, errore sperimentale).

Precisione (ISO3534-2:2006): *grado di concordanza tra risultati di prova o di misurazione indipendenti ottenuti in condizioni prestabilite.*

La precisione dipende solo dalla distribuzione casuale degli errori e non è in relazione con il valore vero o specificato. La misura della precisione è solitamente espressa in termini di imprecisione e calcolata come scarto tipo dei risultati della prova o della misurazione. Una precisione minore rispecchia uno scarto tipo maggiore. Le misure quantitative di precisione dipendono criticamente dalle

condizioni prestabilite. Le condizioni di *ripetibilità* e *riproducibilità* costituiscono insiemi particolari delle condizioni prestabilite estreme.

I "Risultati indipendenti del saggio" sono ottenuti in modo tale da non essere influenzati da nessun risultato precedente sullo stesso o simile oggetto della prova.

Prova di tossicità (ISO 6107-3:1993/Amd 1:2001): *prova nella quale una sostanza con una concentrazione prefissata viene portata a contatto con organismi specificati per stimarne gli effetti tossici su quegli organismi.*

Ai fini di questo documento, il termine "organismi" viene ampliato per includere loro parti o associazioni ed è quindi sostituito da "modello biologico".

Ripetibilità (ISO3534-2:2006): *precisione sotto la condizione di ripetibilità.*

La ripetibilità può essere espressa quantitativamente in termini di caratteristiche di dispersione dei risultati.

Condizioni di ripetibilità (ISO3534-2:2006): *Condizioni osservate quando i risultati indipendenti di una prova o di una misurazione sono ottenuti con lo stesso metodo sugli stessi oggetti di misura/prova, dallo stesso operatore, con le stesse apparecchiature entro un breve intervallo di tempo.*

Le condizioni di ripetibilità comprendono:

- la stessa procedura di misura o prova;
- lo stesso operatore;
- le stesse apparecchiature di prova o di misura utilizzate nelle stesse condizioni;
- lo stesso luogo;
- ripetizioni in un breve intervallo di tempo.

Riproducibilità (ISO3534-2:2006): *precisione sotto condizioni di riproducibilità*

La riproducibilità può essere espressa in termini di caratteristiche di dispersione dei risultati.

Condizioni di riproducibilità (ISO3534-2:2006): *Condizioni osservate quando i risultati indipendenti di una prova o di una misurazione sono ottenuti con lo stesso metodo sugli stessi oggetti di prova con diversi operatori usando diverse apparecchiature.*

Risposta (ISO/TS 20281:2006): *valore osservato di un dato endpoint.*

Robustezza (ISO/TS 20281:2006): *insensibilità di un metodo analitico a piccoli cambiamenti nella procedura.*

Saggio biologico: nel testo, utilizzato come traduzione del termine inglese bioassay (ISO 6107-2:2006).

CAPITOLO 2: METODI DI PROVA

2.1 Classificazione dei metodi di prova

I criteri di scelta del metodo da accreditare sono precisati dalla Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, al paragrafo 5.4.2 e dal documento ACCREDIA RT-08 Rev. 02, al corrispondente paragrafo. Il documento ACCREDIA stabilisce che *“Il laboratorio deve, ove possibile, utilizzare metodi ufficiali in vigore, metodi definiti da regole tecniche¹ o norme²”*.

Lo stesso documento ACCREDIA specifica che *“...è applicabile a tutti i laboratori che effettuano un servizio di prova. Vengono presi in considerazione sia i laboratori indipendenti sul piano organizzativo e commerciale, sia quelli dipendenti da una organizzazione più vasta (come aziende manifatturiere, organizzazioni pubbliche o private, centri di ricerca, ecc.)”* e che *“...i requisiti riportati in questo documento (i.e. RT-08) sono validi per qualunque settore e tipo di prove”*.

La scelta del metodo di prova deve essere ovviamente effettuata dal laboratorio, tenendo conto delle esigenze del cliente/utente, della finalità delle analisi, della disponibilità di strumentazione, materiali e modelli biologici, delle competenze degli operatori e di eventuali considerazioni economiche.

Se il cliente non specifica il metodo da utilizzare, la scelta è responsabilità del laboratorio, che deve motivare tale scelta ed informarne il cliente, assicurandone l'applicabilità e la rispondenza con le esigenze del cliente stesso. Al contrario, quando il metodo richiesto dal cliente viene ritenuto inappropriato o obsoleto, il laboratorio è tenuto a comunicarlo al cliente, eventualmente proponendo e motivando una scelta alternativa. In ogni caso, ai fini dell'accreditamento in funzione dei requisiti della ISO/IEC 17025 e delle definizioni ACCREDIA, si distinguono quattro tipologie di metodi di prova:

1. **ufficiali**, ovvero riportati o richiamati in documenti normativi cogenti e/o pubblicati su Gazzetta Ufficiale Italiana (GU) o dell'Unione Europea (GUCE), o comunque richiamati o riportati in un documento emesso da una autorità quale Regione, Provincia, ecc. La qualifica “ufficiale” è una proprietà trasversale, indipendente dal grado di esaustività dei contenuti. Un metodo ufficiale può essere “normalizzato” o “non normalizzato”.
2. **normalizzati**, quando i metodi sono emessi da organismi di normazione nazionali, europei o internazionali (es. UNI, CEI, ISO, UNICHIM, AOAC, ecc.);
3. **non normalizzati**, quando i metodi sono emessi da organizzazioni tecniche nazionali o internazionali (es. metodi pubblicati su riviste, Rapporti ISTISAN, ecc.), sviluppati da laboratori/centri di riferimento nazionali o comunitari o da centri di referencia nazionali accreditati. Elemento discriminante è che la responsabilità dei dati forniti è riferita non all'organizzazione che lo ha emesso, ma ai singoli autori;
4. **interni**, quando i metodi di prova sono sviluppati, messi a punto o adottati da un laboratorio sulla base di conoscenze desunte dalla letteratura scientifica e/o dall'esperienza pratica. Il metodo interno può essere sia un metodo interamente sviluppato dal laboratorio, sia un metodo (normalizzato o non) che è stato sostanzialmente modificato a seguito di particolari esigenze del laboratorio).

¹ Regola tecnica: documento, emanato da una autorità, che riporta requisiti tecnici obbligatori o direttamente o tramite riferimenti, oppure incorporando il contenuto di una Norma.

² Norma: documento prodotto mediante consenso e approvato da un organismo riconosciuto che fornisce, per usi comuni e ripetuti, regole, linee guida o caratteristiche relative a determinate attività o ai loro risultati, al fine di ottenere il miglior ordine in un determinato contesto. Norma di prova: Norma che stabilisce e descrive i metodi di prova, talvolta accompagnati da disposizioni relative alle attività di prova, quali: campionatura, uso di metodi statistici, sequenze di prova.

Nei seguenti casi particolari (espressi da ACCREDIA):

- progetti di norma;
- edizioni non più in vigore di norme o metodi di prova ufficiali (fanno eccezione le edizioni superate di norme ed i progetti di norma quando sono richiamati da disposizioni cogenti o da norme per la certificazione di prodotto, in vigore, o richiesti da organismi notificati);
- metodi (non normalizzati) riportati in articoli pubblicati su riviste o su istruzioni dei fornitori delle apparecchiature (ad eccezione di quando sono richiamati espressamente dalla normativa cogente);
- metodi normalizzati (o ufficiali) che sono stati modificati sostanzialmente (es. eliminando fasi di prova, impiegando apparecchiature con prestazioni inferiori a quelle previste o che si basano su principi differenti, applicando materiali o prodotti non indicati nel campo di applicazione del metodo stesso);

si procede trasformandoli in metodi interni e pertanto alla loro validazione.

In ogni caso non è discriminante l'organizzazione che ha emesso un determinato metodo, ma se questo è stato o meno validato, per stabilire le eventuali azioni di validazione necessarie. I metodi non normalizzati, quelli sviluppati dal laboratorio e i metodi normalizzati che sono stati sostanzialmente modificati devono essere validati. È necessario scegliere con attenzione i metodi che si intendono accreditare per evitare ove possibile complesse procedure di validazione.

Una volta stabiliti i metodi di prova che si intendono utilizzare e accreditare il laboratorio deve verificare se tali metodi sono ben documentati, altrimenti deve predisporre opportune "procedure di dettaglio" (per esempio, per definire le condizioni strumentali ottimali per le proprie apparecchiature). Tali documenti aggiuntivi, contenenti dettagli supplementari per garantire la corretta applicazione dei metodi scelti, definiti da ACCREDIA "procedure di prova", devono contenere almeno tutti gli elementi indicati nella nota al punto 5.4.4 della UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, se non già presenti nel metodo.

2.2 Metodo di prova ufficiale e/o normalizzato

I metodi ufficiali e/o normalizzati sono descritti in protocolli ben definiti in cui sono riportati i limiti degli intervalli in cui devono essere compresi i valori di quasi tutti i parametri di interesse e, anche se non sempre, i dati dei parametri di *precisione* ricavati dalla validazione del soggetto che li ha emessi (ad esempio prove interlaboratorio per uno o più tossici di riferimento).

Quando il laboratorio dichiara di seguire tali metodi, deve distinguere tra quelli che riportano dati dei parametri di precisione (*ripetibilità e riproducibilità*) e quelli che non li riportano, per stabilire le modalità da attuare al fine di dimostrare la propria capacità (competenza) ad eseguirli. Nel primo caso è sufficiente ottenere dati della propria *ripetibilità*, da confrontare con quelli disponibili dal metodo (verifica del limite di ripetibilità). Nel secondo caso, è necessario produrre sperimentalmente dati di ripetibilità intermedia a cui attribuire l'indicazione di "ripetibilità del metodo" e confrontarla con i dati di *ripetibilità stretta del laboratorio stesso*.

Laddove il metodo ufficiale ammetta un certo numero di possibilità, il laboratorio deve riportare le proprie scelte nella relativa procedura di prova che ha predisposto.

Il laboratorio deve sempre utilizzare l'ultima edizione valida del metodo scelto (documento cogente o norma), a meno che questa non sia appropriata o non sia possibile; pertanto, nel caso sia accreditato un metodo e questo sia modificato dal soggetto che l'ha emesso, il laboratorio deve ottenere la conferma dell'accreditamento per la versione modificata.

In generale, l'accreditamento secondo una Norma o un metodo ufficiale prevede che siano rispettati e documentati tutti i parametri normativi (prescritti e vincolanti); per i parametri informativi (Appendici

informative), se non vengono puntualmente seguiti, è opportuno motivare l'eventuale difformità. Quando il metodo prevede l'applicazione a più materiali di prova, l'accreditamento viene concesso per tutti quelli specificati da quel metodo, anche se il documento riporta evidenze sperimentali riferite ad uno solo dei materiali di prova indicati.

Un caso particolare è costituito da metodi normalizzati all'estero, quali i protocolli USEPA o ASTM, nei quali vengono indicate specie non presenti in Italia. In tal caso, il laboratorio può essere accreditato per il metodo di prova, ma rimane a carico del laboratorio la procedura di validazione del metodo per i parametri che dovessero essere modificati per adeguarsi alle esigenze della specie di organismi effettivamente utilizzabili nella prova ed appropriate per l'area geografica nella quale la prova deve essere eseguita.

Sul sito www.acredia.it, sezione "Metodi", viene poi dettagliato un requisito specifico per l'accreditamento di Metodi miniaturizzati: *"I kit miniaturizzati per le analisi microbiologiche e chimiche sono accettabili se accompagnati da certificati di validazione rilasciati da enti accreditati (AFNOR), da organizzazioni tecniche nazionali e internazionali (AOAC, Nordval, ecc.), o se inseriti e richiamati in metodi ufficiali o normalizzati (es. Metodi UNICHIM). In questi casi il metodo sarà riportato in elenco prove con i riferimenti all'ente responsabile della validazione"*.

Con gli opportuni adattamenti si può dunque ritenere che anche per i saggi ecotossicologici sia ammesso l'uso di metodi miniaturizzati (solitamente denominati Toxkit).

"ACCREDIA non riconosce come metodi normati articoli pubblicati su riviste o istruzioni dei fornitori delle apparecchiature; in tali casi e qualora il laboratorio applichi un metodo normato al di fuori del campo di applicazione (matrice/materiale/prodotto) definito, richiederà l'accreditamento mediante l'emissione di un metodo interno". A questo proposito, viene precisato che *gli articoli pubblicati su riviste (es. pubblicati sul Journal AOAC, Bollettino dei Chimici Igienisti, ecc.) non possono essere considerati metodi ufficiali, in quanto la responsabilità del metodo è degli autori, e non dell'editore*.

2.3 Metodi interni (non normalizzati e/o sviluppati dal laboratorio)

Si considerano metodi di prova non normalizzati quelli emessi da organizzazioni tecniche nazionali o internazionali (ad es. metodi AOAC, Rapporti ISTISAN, Quaderni IRSA, Metodi ISPRA, ecc.), norme di prova prodotte da industrie, istruzioni del produttore.

Sono definiti metodi di prova interni i metodi di prova non normalizzati o messi a punto o adottati da un laboratorio sulla base di conoscenze desunte dalla letteratura scientifica e/o dall'esperienza pratica.

Sono classificati inoltre tra i metodi di prova interni anche *"...le edizioni non più in vigore di norme o metodi di prova ufficiali, insieme con i progetti di norma non ancora nella forma sottoposta al voto finale. Fanno eccezione le edizioni superate di norme ed i progetti di norma quando sono richiamati da disposizioni cogenti o da norme per la certificazione di prodotto, in vigore, o richiesti da organismi notificati"* (ACCREDIA RT-08 Rev. 02).

Infine, i metodi di prova normati o ufficiali che sono stati modificati dal laboratorio sono metodi interni; nel caso di modifiche apportate ad un metodo ufficiale/normato/non normato, tali da migliorarne le prestazioni senza snaturarne il principio (es. impiego di apparecchiatura con migliore risoluzione e stabilità, materiali di riferimento e reagenti di più elevata purezza), il metodo non deve essere validato.

I metodi interni, in particolare quelli sviluppati dal laboratorio, richiedono un maggiore impegno da parte dello stesso, poiché devono essere validati.

Pertanto, il laboratorio deve progettare il metodo pianificando un protocollo che riporti senza ambiguità le diverse fasi della sperimentazione e stabilisca i limiti degli intervalli dei parametri necessari.

Sul sito www.acredia.it, sezione “Metodi”, viene chiaramente specificato che, *“...nel caso un metodo sviluppato definisca la determinazione di più analiti non è possibile richiedere l'accreditamento solo per una parte di questi”*.

Quindi, in funzione degli obiettivi, si deve innanzi tutto stabilire se si tratta di una validazione primaria o secondaria.

2.3.1 Validazione primaria

La validazione primaria (UNI ENV ISO 13843:2003) è un processo sperimentale atto a stabilire i limiti operativi e le prestazioni (performance) caratteristiche di un nuovo protocollo metodologico modificato o altrimenti inadeguatamente caratterizzato al fine di dimostrare che tale metodo (con quei limiti e prestazioni) è adeguato all'utilizzazione prevista/concordata.

Un apposito documento descriverà dettagliatamente ed in modo non ambiguo i risultati numerici della sperimentazione, le eventuali modifiche apportate alla procedura di prova, nonché tutto quanto può influenzare le prestazioni del metodo.

Per i metodi chimici e microbiologici la validazione primaria generalmente prevede anche il confronto con altri metodi normalizzati in uso, secondo quanto indicato dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, o per confronto con una precisione teorica predefinita per lo scopo ed il campo di applicazione previsto.

Per i saggi ecotossicologici *“il confronto dei risultati ottenuti con altri metodi normalizzati o non”*, non è però proponibile, in quanto per definizione si tratta di metodi empirici. È, invece, necessario il confronto con la *precisione* predefinita, se riportata dal metodo.

2.3.2 Validazione secondaria

La validazione secondaria detta anche di verifica (UNI ENV ISO 13843:2003) è richiesta per i metodi sviluppati e validati (validazione primaria) da altri (metodi normalizzati e/o ufficiali) e dimostra che il laboratorio è in grado di applicare un metodo validato conformemente alle specifiche stabilite nella validazione primaria.

A tale scopo è necessario documentare le prestazioni del metodo a lungo termine (ad esempio, predisponendo apposite carte di controllo).

Per i metodi normalizzati o ufficiali che non dovessero riportare tutte le specifiche richieste dalla validazione primaria, perché ad esempio non sono disponibili i dati di *riproducibilità*, la validazione secondaria può essere completata con la partecipazione a circuiti esterni di assicurazione della qualità.

In ecotossicologia sono attualmente disponibili, o sono in via di sviluppo, metodi rapidi miniaturizzati (kit) che consentono di evitare l'allevamento o la coltura di organismi da destinare ai saggi. Se l'organizzazione che li produce e/o commercializza non ha già provveduto a validarli ed a certificare la rispondenza con il metodo normalizzato di riferimento, anche i metodi rapidi dovranno essere validati a livello primario e secondario.

In figura 1 è riassunto lo schema di validazione di un metodo ecotossicologico.

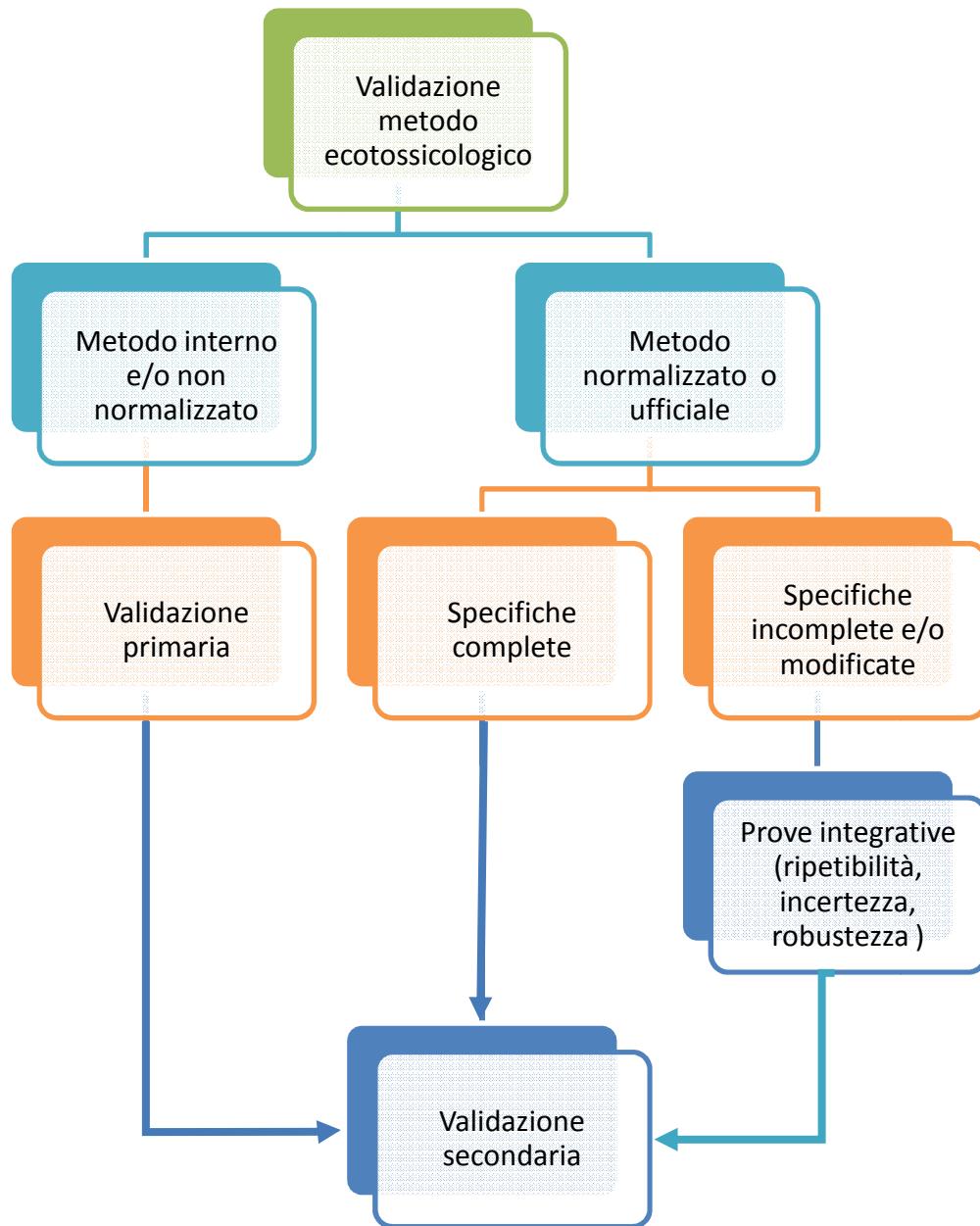


Figura 1 - Schema di validazione di un metodo ecotossicologico.

In sintesi, per validazione primaria si deve intendere la *validazione del metodo*, mentre la validazione secondaria è la convalida del processo di esecuzione della prova, riferito ai vincoli imposti dal metodo (*validazione del processo*).

CAPITOLO 3: VALIDAZIONE PRIMARIA DEI METODI DI PROVA INTERNI (NON NORMALIZZATI E/O SVILUPPATI DAL LABORATORIO)

3.1 Definizione

Il termine validazione necessita di un chiarimento, visto che la ISO stessa, nei suoi vari documenti, ne fornisce ben 82 definizioni diverse. Pertanto, si riportano quelle riprese dai due documenti ritenuti più importanti:

1. *Conferma, sostenuta da evidenze oggettive (3.8.1), che i requisiti (3.1.2) relativi ad un utilizzo o ad un'applicazione specifici previsti sono stati soddisfatti (ISO 9000:2005).*
2. *Conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista sono soddisfatti (UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005).*

Occorre anche ricordare che, secondo la Guida 13 del CEN (2008), il percorso che porta alla normalizzazione di un metodo deve necessariamente prevedere la sua validazione in due tappe: la prima prevede la verifica della *robustezza* del metodo (solitamente effettuata da un laboratorio altamente competente e con precedente esperienza del metodo in esame); nella seconda si procede alla stima della *ripetibilità* e *riproducibilità* mediante confronti interlaboratorio. La stessa CEN Guide 13:2008 precisa che la procedura di validazione richiesta al laboratorio in accreditamento è diversa da quella prevista per la normalizzazione del metodo (UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005).

Quindi, se il metodo che viene portato in accreditamento è un metodo normalizzato, si deve ritenere che sia già validato ai sensi della CEN Guide 13: 2008.

La Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 precisa poi che il laboratorio deve validare metodi non normalizzati, i metodi sviluppati/progettati dal laboratorio, i metodi normalizzati utilizzati al di fuori del proprio scopo e campo di applicazione prefissato, così come estensioni e modifiche di metodi normalizzati, per confermare che i metodi siano adatti all'utilizzazione prevista. La validazione deve essere estesa in modo da soddisfare le esigenze di una data applicazione o campo di applicazione. Il laboratorio pertanto deve registrare i risultati ottenuti, le procedure utilizzate per la validazione, così come una dichiarazione circa l'idoneità del metodo per l'utilizzo previsto.

Una validazione può comunque essere necessaria anche nel caso il metodo non specifichi l'ambito di variabilità tollerato per ciascuno dei parametri ritenuti rilevanti (tempo, temperatura, ecc.). Poiché nella pratica questi parametri hanno un naturale ambito di variabilità (nessun termostato può garantire che una data temperatura, ad esempio 25 °C, venga esattamente mantenuta senza variazioni per tutta la durata del saggio), il laboratorio dovrà verificare quale tolleranza sia accettabile (con la propria strumentazione), cioè entro quale ambito di variabilità gli effetti sulla misura finale siano trascurabili.

Ciò significa che, per i parametri per i quali la norma non specifica un ambito di tolleranza e che hanno un significativo impatto sul risultato finale, il metodo dovrà essere validato come discusso nel seguito.

La Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 precisa nelle Note che la validazione può comprendere delle procedure per il campionamento, la manipolazione ed il trasporto. Inoltre, le tecniche utilizzate per la determinazione della prestazione di un metodo dovrebbero essere una, o una combinazione delle seguenti:

- taratura, utilizzando campioni o materiali di riferimento;
- confronto dei risultati ottenuti con altri metodi;
- confronti interlaboratorio;
- valutazione sistematica dei fattori che influenzano il risultato;

- stima dell’incertezza dei risultati sulla base di una conoscenza scientifica dei principi teorici del metodo e di un’esperienza pratica.

Quando sono effettuati dei cambiamenti nei metodi non normalizzati validati, l’influenza di tali cambiamenti dovrebbe essere documentata e, se necessario, dovrebbe essere effettuata una nuova validazione.

In funzione dello sviluppo del metodo, dovrebbero essere eseguiti riesami regolari per verificare che le esigenze del cliente continuino ad essere soddisfatte. Qualsiasi variazione dei requisiti, che richieda modifiche al piano di sviluppo, dovrebbe essere approvata ed autorizzata.

La validazione è sempre un bilancio fra costi, rischi e possibilità tecniche. Vi sono molti casi in cui la gamma e l’incertezza dei valori (per esempio: i limiti di rivelazione, la selettività, la linearità, la ripetibilità, la riproducibilità, la robustezza e la sensibilità incrociata alle interferenze) può essere fornita unicamente in modo semplificato a causa di mancanza di informazioni.

Proposta per lo sviluppo di un percorso di riconoscimento specifico per enti di ricerca ed istituzionali.

Un Ente Pubblico di ricerca ha il compito istituzionale di sviluppare nuovi metodi e metterli a disposizione della comunità (laboratori pubblici e privati), ma ad oggi senza alcun “controllo di qualità” del processo. Sarebbe pertanto auspicabile definire un percorso di abilitazione per gli enti di ricerca intenzionati allo sviluppo di nuovi saggi ecotossicologici in modo tale da riconoscerne il lavoro e garantirne la qualità. Il percorso dovrebbe prevedere una forma di abilitazione/riconoscimento che garantisca sia l’organizzazione che sviluppa il metodo, sia i relativi metodi sviluppati nell’ottica di bilanciare le risorse (materiali umane ed economiche) necessarie.

A titolo esemplificativo, nell’ambito della revisione del D.D. del 25.12.2002 (oggi abrogato dal D.D. 25.02.2011) relativo all’idoneità all’impiego in mare di prodotti assorbenti e disperdenti per la bonifica dalla contaminazioni da idrocarburi, sono stati sviluppati, validati e normati alcuni metodi biologici sui crostacei da laboratori pubblici di ricerca e di controllo privi di qualsiasi abilitazione, pur essendo gli autori della metodologia.

Il sistema attuale, inoltre, penalizza gli Enti di Ricerca che sviluppano saggi di tossicità (progettando il protocollo metodologico, validandolo e infine normandolo), in quanto non riconosce il valore scientifico del risultato e il suo potenziale utilizzo nel mercato da parte dei laboratori con le relative ricadute economiche.

Al contrario, un laboratorio in grado di finanziare il percorso di accreditamento e di sviluppare, o addirittura semplicemente utilizzare e vendere un nuovo saggio sviluppato da altri, riceve un maggiore riconoscimento a fronte dell’accreditamento stesso piuttosto che della garanzia scientifica del lavoro svolto.

Sarebbe quindi auspicabile definire questa nuova modalità di abilitazione/riconoscimento per il percorso di ricerca e sviluppo dei saggi ecotossicologici (compresa la fase di confronto interlaboratorio), stabilendo però requisiti specifici per gli enti di ricerca che vogliono dedicarsi a tale attività.

In via preliminare e propositiva gli autori hanno concordato di prevedere i seguenti steps:

1. Determinare i prerequisiti di partecipazione dei laboratori di ricerca a questo tipo di attività;
2. Determinare le procedure utilizzate per la ricerca e lo sviluppo dei saggi;
3. Determinare i metodi di controllo delle procedure di sviluppo utilizzate (incluso il processo di validazione);
4. Individuare l’Ente terzo (pubblico o privato) in grado di rilasciare tale abilitazione/riconoscimento;

5. Stabilire uno schema di abilitazione dedicato alle strutture di ricerca interessate allo sviluppo di saggi di tossicità.

6. Eseguire l'abilitazione secondo lo schema previsto;

7. Istituire un “albo” di laboratori di ricerca abilitati a questo scopo.

Si tratta pertanto di una sorta di “accreditamento”, volto ad abilitare/riconoscere i laboratori che hanno interesse a sviluppare, validare e normare una nuova metodica ecotossicologica e che ne consenta la diffusione e utilizzo in caso di richieste istituzionali (e/o di ricerca applicata).

3.2 Progettazione e pianificazione della sperimentazione

In generale, il processo di validazione di un metodo richiede una appropriata pianificazione che, dopo aver definito i requisiti da soddisfare, descrive chiaramente il metodo da validare e stabilisce un programma che indichi:

- le informazioni deducibili da fonti esistenti (inclusi norme e leggi);
- le richieste dei clienti e/o vincoli legislativi;
- il campo di applicazione;
- il modello biologico;
- i parametri che si intendono valutare per la validazione;
- gli esperimenti che si intendono eseguire;
- la registrazione dei risultati;
- una verifica finale rispetto agli obiettivi;
- una dichiarazione di validità del metodo all'interno del campo di applicazione stabilito.

3.2.1 Prima valutazione dei parametri di validazione

Per la stima dei parametri di validazione di un saggio ecotossicologico, può essere utile un confronto con le indicazioni fornite dalle linee guida per i metodi chimici (UNICHIM, 179/0:1999; UNICHIM, 179/1:2011) e microbiologici (UNI ENV ISO 13843:2003).

Per un metodo chimico i parametri tecnici di validazione che occorre valutare in relazione al metodo in oggetto sono:

- selettività;
- specificità;
- sensibilità;
- intervallo di lavoro;
- intervallo di linearità
- limite di rilevabilità;
- limite di quantificazione;
- precisione (ripetibilità e riproducibilità);
- accuratezza;
- robustezza;
- recupero;
- incertezza;
- giustezza (esattezza).

Per i metodi microbiologici i parametri da considerare (UNI ENV ISO 13843:2003) sono:

- scopo e campo di applicazione (elenco delle situazioni e tipi di campioni in cui sia applicabile il metodo);
- precisione (ripetibilità e riproducibilità);
- linearità;
- recupero;
- limiti operativi (in termini di numero più basso e più alto di colonie);
- selettività;
- specificità;
- robustezza.

Come si può notare, metodi chimici e metodi microbiologici hanno in comune alcuni di questi parametri tecnici di validazione, con piccole differenze nelle relative definizioni, comunque derivate dalla statistica. Si può quindi ritenere che valgano anche per i saggi ecotossicologici i parametri tecnici precisione (ripetibilità e riproducibilità); accuratezza; robustezza; incertezza; esattezza.

Per altri parametri sono necessarie alcune precisazioni. Ad esempio, selettività e specificità sono a volte utilizzate come sinonimi (Desimoni e Brunetti, 2004). Inoltre, secondo la Guida EA-4/16 rev.0 , si tratta di concetti qualitativi che non contribuiscono direttamente a fornire informazioni sull'incertezza (anche se lo studio dell'influenza di effetti interferenti può in linea di principio essere utilizzata nella valutazione dell'incertezza).

Selettività

È la *“proprietà di un metodo di rispondere esclusivamente alla caratteristica o all’analita che deve essere misurato, o grado con il quale un metodo può quantificare accuratamente quella caratteristica o analita in presenza di interferenti.”*

Come principio generale, la selettività è sufficientemente buona da ignorare qualsiasi interferente; la selettività contribuisce all'esattezza.

In realtà, un saggio ecotossicologico misura la risposta di un *modello biologico* all'esposizione ad un campione di prova. Tale risposta, sia essa la concentrazione di un parametro biochimico, il numero di cellule o la sopravvivenza di organismi, è influenzata contemporaneamente da tutte le caratteristiche (fisiche, chimiche, biologiche) del campione, cosicché la misura esprime il bilancio tra influenze negative e positive. Pertanto, se la procedura del saggio identifica e descrive chiaramente l'*effetto biologico* da osservare nel prescritto *modello biologico*, un adeguato sistema di misura è in grado di quantificare la risposta con estrema selettività, anche se non può però identificare il o gli agenti causali che inducono la risposta rilevata.

Specificità

Per specificità si intende la *“proprietà di un metodo di rispondere esclusivamente alla caratteristica o analita sotto esame”* e la *“capacità di riconoscere esclusivamente il bersaglio da rivelare, distinguendolo da sostanze simili e dalle impurità”*.

Per i saggi ecotossicologici la specificità è determinata dal tipo di *misurando* e dal sistema di misura: per alcuni, la specificità dell'*endpoint* è molto elevata, ad esempio quando si debbano rilevare effetti quantali (es., vivi – morti); in altri, è meno elevata (es., quantificazione del livello di un enzima, quando enzimi simili costituiscono una possibile interferenza).

Se il saggio ammette *endpoint* multipli, oppure sistemi di misura diversi per lo stesso endpoint, la specificità può essere diversa. È il caso ad esempio del conteggio algale per il quale la norma ISO 8692: 2012 ammette che possa essere effettuato:

- con un contaparticelle, in grado di contare particelle sferiche nel campo dimensionale tra 2,5 μm e 25 μm ;

- per conta diretta al microscopio;
- con un fluorimetro;
- con un turbidimetro;
- con uno spettrometro ottico.

Ciascuno di questi metodi di misura è soggetto ad interferenze, anche se a diverso livello, quali la presenza di cellule algali di specie diverse da quella di prova, di particelle di altra natura, di sostanze colorate.

Per molti saggi ecotossicologici è particolarmente importante l'*effetto matrice*: “*influenza di una proprietà del campione, diversa dal misurando, sulla misura del misurando secondo una procedura di misura specificata e quindi sul suo valore di misura*”.

Il ruolo dei possibili interferenti è solitamente minimizzato in saggi con *controlli positivi* (che utilizzano sostanze di riferimento, raccomandate od opportunamente scelte, disciolte nell'appropriato mezzo di prova), mentre tende ad aumentare per campioni ambientali naturali.

Nell'esempio citato del saggio algale, nei campioni naturali possono essere presenti cellule algali di altre specie, materiale particolato organico od inorganico, sostanze variamente colorate. In questo caso è possibile valutare il grado di interferenza effettuando in parallelo anche un saggio nel quale, al campione di prova, viene aggiunta una quantità nota di una sostanza di riferimento (fortificazione). La risposta ottenuta viene poi confrontata con quella di un saggio con un *controllo positivo* alla stessa concentrazione, ma con il solo mezzo di prova.

Sensibilità

Per sensibilità di un sistema di misura si intende “*il quoziente tra cambiamento di un sistema di misura e corrispondente cambiamento del valore di una quantità che va misurata*”.

La sensibilità di un sistema di misura dipende dalla quantità da misurare.

Il cambiamento misurato nel valore di una quantità da misurare deve essere grande in confronto con la risoluzione.

In termini statistici (ISO 16820:2004), “*la sensibilità di una prova è definita dai valori di α , β e pd . p_0 è la probabilità di una risposta corretta quando non esiste una differenza percettibile. pd è la proporzione di valutazioni nella quale viene rivelata una differenza percettibile tra due prodotti. p_1 è la probabilità di una risposta corretta quando esiste effettivamente una differenza percettibile*”.

In chimica la “*sensibilità indica la capacità di registrare una piccola variazione nella concentrazione di una sostanza nel materiale di prova*”.

In questo contesto, la sensibilità solitamente è intesa come la più piccola quantità o concentrazione di un analita che può essere realmente distinta dal valore di fondo.

Secondo un'altra definizione ancora, sempre in chimica, “*indica il cambiamento più piccolo nella concentrazione che può essere misurato da una procedura analitica*”. Una Nota precisa però: “*la sensibilità è calcolata come rapporto della variazione della risposta del metodo alla variazione della concentrazione dell'analita*”. Poiché questo è solitamente arbitrario, dipendendo dalle condizioni strumentali, non è utile nella validazione. Tuttavia, può essere utile nelle procedure di assicurazione della qualità per stabilire se uno strumento ha prestazioni consistenti e soddisfacenti rispetto ad uno standard.

Se la sensibilità indica (UNI ISO 5725-2:2004) “*il cambiamento nella risposta diviso per il corrispondente cambiamento di una curva standard (taratura)*”, corrisponde alla pendenza della relativa curva.

In microbiologia è stata preferita la definizione (UNI ENV ISO 13843:2003): “*frazione del numero totale di colture o colonie positive correttamente assegnate nella ispezione presunta*”.

Nessuna di queste definizioni sembra direttamente applicabile ai saggi ecotossicologici, per i quali la sensibilità potrebbe essere invece definita come “*capacità di registrare una piccola variazione nella risposta di un modello biologico dopo esposizione ad un materiale di prova*”. Inoltre, per analogia con la Norma ISO 21572:2013, si può precisare: “*la sensibilità è la più piccola risposta di un modello biologico che può essere realmente distinta dalla risposta del controllo negativo*”.

Per ogni saggio ecotossicologico, dunque, è necessario stabilire qual è la differenza minima tra campione di prova e controllo negativo statisticamente significativa rivelabile. Per ogni coppia di risultati *controllo negativo* – saggio di prova, la differenza minima significativa (Minimum Significant Difference o MSD), espressa in percentuale del controllo negativo, si può calcolare in funzione delle varianze e del numero di dati del controllo negativo e del trattato con la seguente equazione (Thursby *et al.*, 1997):

$$MSD = t_{critico} \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

dove $t_{critico}$ è il valore di t alla probabilità 0,05 per gli appropriati gradi di libertà.

Sulla base di una lunga serie MSD (variabili, in funzione dei valori relativi delle varianze e del numero di dati, entro un certo intervallo), è possibile calcolare un valore soglia (Threshold Value TV), corrispondente al 90° percentile, che identifica la “significatività rilevabile”, cioè una proprietà del metodo utilizzato. Ovviamente, la scelta del percentile (75°, 80°, 90°, ecc.) da usare come soglia prevede il calcolo della curva di potenza.

La differenza minima statisticamente significativa rivelabile assume quindi un significato simile a quello di limite di rivelabilità: “*valore della quantità misurata, ottenuto tramite una data procedura di misura, per il quale la probabilità di erroneamente dichiarare assente un componente in un materiale è pari a β , data una probabilità α di dichiararlo presente erroneamente*”. La IUPAC raccomanda come default per α e β valori pari a 0,05.

Talvolta è usata l'abbreviazione LOD.

Viene sconsigliato l'utilizzo del termine “sensibilità” per “limite di rilevabilità”.

Si noti che, almeno per alcuni saggi, è possibile stabilire due diverse differenze minime statisticamente significative. Infatti, solitamente la risposta del *modello biologico* all'esposizione ad un tossico è peggiore che nel *controllo negativo*, ma per alcuni *endpoint*, alle concentrazioni più basse, il modello biologico può rispondere meglio che nel controllo negativo (*ormesi*). Questo caso si verifica frequentemente ad esempio nei saggi algali: quando la concentrazione del tossico nel materiale di prova è sufficientemente elevata, la crescita algale è inferiore a quella del controllo negativo; a concentrazioni inferiori del tossico, però, la crescita algale può essere superiore a quella del controllo negativo. Nel primo caso, si parla di *tossicità*; nel secondo, di *biostimolazione*. Le differenze minime significative possono essere diverse per le due tipologie di risposta e quindi è necessario calcolarle separatamente per i saggi per i quali la possibilità della biostimolazione è già stata riscontrata.

Intervallo di lavoro

L'intervallo di lavoro può essere definito come “*il campo tra il valore minimo e massimo del determinando per il quale sono state effettuate prove per stabilire precisione e bias*”.

Per i saggi ecotossicologici, l'intervallo di lavoro tipicamente si estende dalla assenza di risposta (corrispondente a quella del *controllo negativo* o, in caso di *ormesi*, alla risposta massima di biostimolazione) alla risposta massima del *modello biologico*. Per quest'ultima, non esiste in teoria un valore massimo assoluto, ma solo il valore massimo effettivamente osservato nella casistica di quel saggio.

Per ognuno degli estremi dell'intervallo di lavoro è possibile ricavare su basi statistiche i valori di *precisione* (intra- ed inter-laboratorio) attraverso la partecipazione a confronti interlaboratorio.

Intervallo di linearità

In chimica, per intervallo di linearità si intende l'intervallo di concentrazione in cui il segnale varia linearmente con la concentrazione.

In ecotossicologia, invece, la tipica relazione dose-risposta non è lineare, ma sigmoide (ISO/TS 20281:2006), ed è descritta dagli opportuni modelli (Logit, Probit, Weibull, ecc.), piuttosto che dall'equazione di una retta. Pertanto, anche se una parte della curva dose – risposta può essere approssimata da un segmento di retta, l'intervallo di linearità non può essere considerato un parametro tecnico di interesse per la validazione di un saggio ecotossicologico.

Infine, per i saggi ecotossicologici non è possibile utilizzare il parametro tecnico *recupero* (ISO 5667-14:1998): “*frazione di una quantità nota del determinando aggiunta ad un campione che può essere misurata da un sistema analitico*”.

Il recupero viene calcolato dalla differenza tra i risultati ottenuti tra una aliquota fortificata del campione ed una non fortificata ed è solitamente espresso come percentuale (ISO/TS 13530:2009).

Poiché il *determinando* è un *effetto biologico*, non è possibile fortificare il campione e quindi calcolare il *recupero*. Tuttavia, se il saggio lo prevede e riporta il risultato atteso per un determinato tossico di riferimento, sagggiando opportunamente un *controllo positivo* è possibile verificare se la risposta è conforme alle attese per la specifica sostanza di riferimento e lo specifico *modello biologico* nelle condizioni del saggio.

3.2.2 Identificazione delle fonti di incertezza

Per lo sviluppo di un metodo tipicamente le fonti più significative di incertezza vengono dapprima identificate con uno studio preliminare e l'incertezza stimata da un laboratorio per un determinato metodo può essere successivamente applicata, in assenza di modifiche procedurali, ai risultati ottenuti con lo stesso metodo in quel laboratorio e quindi non richiede ulteriori dimostrazioni (EURACHEM/CITAC Guide CG 4: 2012).

Per un saggio biologico, lo studio preliminare deve prendere in considerazione le seguenti fonti di incertezza:

1. il campionamento;
2. la conservazione del campione;
3. il pretrattamento del campione;
4. gli effetti dovuti alla strumentazione utilizzata (se richiesta dal metodo);
5. la purezza dei reagenti;
6. la variabilità biologica intrinseca degli organismi utilizzati;
7. le condizioni di misura;
8. i fattori di confusione;
9. gli effetti dovuti alla matrice del campione;
10. gli effetti del tipo di calcolo;
11. la correzione per il controllo negativo;
12. gli effetti dovuti all'operatore;

13. gli effetti casuali.

3.2.3 Quantificazione delle incertezze

La Guida EURACHEM/CITAC CG 4:2012 richiama la distinzione tra errore e incertezza: l'errore è la differenza tra un risultato individuale ed il valore “vero” del misurando (in pratica, tra il valore osservato ed un valore di riferimento) e quindi è un valore singolo associato a ciascuna misura; l'incertezza, invece, assume la forma di un range o intervallo che, una volta stimata per un dato protocollo metodologico e tipologia di campione, si applica a tutte le determinazioni dello stesso tipo.

L'incertezza di misura comprende dunque molti componenti e varia in funzione delle condizioni nelle quali viene attribuito un valore al misurando.

Campionamento

L'accreditamento della prova, se la norma relativa non richiede specificatamente di coprire questa fonte di incertezza, può ignorare il campionamento come fattore di variabilità.

Se la norma contempla le prescrizioni relative al campionamento, ma il campione viene indipendentemente raccolto dal committente e semplicemente consegnato al laboratorio, l'incertezza relativa al campionamento, ed in particolare la sua rappresentatività, non può essere stimata dal laboratorio. Pertanto, se il laboratorio che effettua la prova non è lo stesso soggetto che si occupa del campionamento, è possibile richiedere l'accreditamento solo per la parte relativa all'esecuzione del saggio di tossicità. In questo caso, il laboratorio di prova è tenuto però ad informare il cliente sulle indicazioni per il campionamento, trattamento e conservazione dei campioni; più precisamente, il cliente dovrebbe essere informato, ma ciò non implica che chi riceve il campione prelevato dal cliente debba assicurarsi che le indicazioni siano state seguite. Il laboratorio di prova è comunque tenuto a verificare che le condizioni del campione al momento del conferimento siano adeguate alle istruzioni date. Il rapporto di prova dovrà comunque indicare chiaramente che la fase di campionamento non è accreditata né eseguita dal laboratorio di prova.

Se la norma prevede una specifica modalità di campionamento e questo viene effettivamente eseguito a cura del laboratorio di prova, il laboratorio può comunque richiedere il solo accreditamento della procedura di prova (ACCREDIA RT08 Rev. 02), *purché sia esplicitata l'esclusione del campionamento dall'accreditamento e tale esclusione sia riportata anche nei rapporti di prova.*

Infine, se la Norma prevede una specifica modalità di campionamento ed il laboratorio richiede un accreditamento che include anche questa fase, oltre a dimostrare la conformità ai requisiti della Norma, si dovrebbe procedere alla stima dell'incertezza legata al campionamento.

Le indicazioni relative alle modalità di campionamento si possono reperire nelle diverse parti della Norma ISO 5667 (Water quality — Sampling).

I dettagli relativi alla stima statistica dell'incertezza di campionamento vengono approfonditamente discussi in Eurachem Guide, 2007 (First edition): *Use of uncertainty information in compliance assessment.*

Conservazione dei campioni

Nella stima della tossicità le modalità di conservazione dei campioni e, in particolare, il tempo massimo della loro conservazione prima dell'esecuzione del saggio sono fattori critici.

Se non specificati dalla procedura di prova, in generale si deve fare riferimento alla Norma ISO 5667-16:1998.

La conformità con le specifiche del metodo di prova o con tale norma dovrebbe garantire che questa fonte di incertezza non influenzi significativamente il risultato finale.

Pretrattamento del campione

Se richiesto, il pretrattamento del campione è parte integrante del metodo di norma. Ciò significa che il suo effetto è stato studiato in precedenza e le procedure indicate sono risultate essere idonee perché il pretrattamento non abbia effetti significativi sull'incertezza complessiva. Pertanto, se le prescrizioni sono integralmente rispettate, non è necessario prendere in considerazione questo fattore nel calcolo dell'incertezza (EURACHEM/CITAC CG 4:2012).

Effetti dovuti alla strumentazione

Nella maggior parte dei casi si tratta di incertezze di categoria B (ACCREDIA DT-0002 rev.1) che possono essere desunte dalle specifiche della strumentazione utilizzata (bilance, pipette, spettrometro molecolare, ecc.). Solitamente l'ordine di grandezza di questo tipo di incertezza è molto inferiore alla variabilità biologica intrinseca degli organismi, tanto da poter essere trascurata nel calcolo dell'incertezza composta.

Purezza dei reagenti

Il saggio può richiedere l'uso di reagenti, ad esempio per preparare soluzioni del tossico di riferimento o per preparare il mezzo artificiale impiegato per i controlli negativi.

La purezza dei reagenti è solitamente dichiarata dal produttore.

Anche questo tipo di incertezza, di categoria B (ACCREDIA DT-0002:Rev.1), potrebbe essere trascurata nel calcolo dell'incertezza composta, perché sicuramente inferiore di almeno un ordine di grandezza rispetto alla variabilità biologica intrinseca degli organismi.

Variabilità biologica intrinseca degli organismi

È indubbiamente la fonte di incertezza più rilevante e può essere distinta in due parti: la prima è legata alla variabilità dovuta alla eventuale raccolta degli organismi in campo, se la norma ne prevede il campionamento in ambiente opportuno, oppure alla provenienza e al metodo di coltura/allevamento in laboratorio degli organismi capostipite; la seconda dipende dalla variabilità intrinseca tra organismi (raccolti in campo o provenienti dalla stessa coltura/allevamento di laboratorio).

La prima fonte di incertezza è discussa nel paragrafo della Riferibilità delle misure.

La seconda fonte di incertezza (variabilità intralaboratorio) può essere stimata sulla base delle repliche previste dal saggio, solitamente 3 o 4, che si assume seguano una distribuzione normale (assunzione difficile da verificare, data l'esiguità delle repliche; comunque, se è noto che i risultati non seguono la distribuzione normale, si può operare una trasformazione logaritmica od altro tipo di trasformazione appropriata).

Come evidenziato da numerosi circuiti interlaboratorio per molti organismi e protocolli differenti, la ripetibilità solitamente è $\geq 5\%$ e la riproducibilità $\geq 12\%$ (Tabella 1). Essa, inoltre, indica molto chiaramente che, per lo stesso protocollo, ripetibilità e riproducibilità possono essere anche molto diverse cambiando tossico, modello biologico o endpoint.

Per il singolo laboratorio la ripetibilità potrebbe essere stimata sulla base di carte di controllo degli scarti tipo dei controlli negativi.

Tabella 1 – Dati di variabilità intra- ed interlaboratorio riportati in alcune Norme ISO.

Norma	Tossico	Scarto tipo ripetibilità	Scarto tipo riproducibilità
		CV %	CV %
UNI EN ISO 6341: 1999	<chem>K2Cr2O7</chem>	5	50
	TPBS (1)	14,4	30
	TPBS(2)	12	35
	2,4,5-T sale di K	8,3	35,9
ISO 14669: 1999	3,5-diclorofenolo	23	58
		36	48
	<chem>K2Cr2O7</chem>	23	42
		22	47
UNI EN ISO 20079: 2006	3,5-diclorofenolo	15,8	20,7
		12,6	19,4
		9,4	12,3
		16,8	16,0
		13,9	13,6
		12,2	15,9
		12,4	20,8
		8,5	13,5
		7,6	9,3
UNI EN ISO 16712: 2007	Bioban	7,9	24,2
	Ivermectin – 1° round	6,7	28
	Ivermectin – 2° round	8,8	20,2
UNI EN ISO 15088: 2009	3,4-dicloroanilina	8,7	13,8
		25	35
ISO 14380: 2011	<chem>K2Cr2O7</chem>	9,74	23,74
ISO 14371: 2012	<chem>CuSO4*5H2O</chem>	11,91	30,88

In questo caso, assumendo che i risultati seguano la distribuzione normale, come criterio di controllo dei risultati si potrebbe utilizzare la distribuzione chi-quadro:

$$\chi_{sp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{\sigma^2} \leq \chi_{p,v}^2$$

dove:

χ_{sp}^2 è il valore sperimentale della variabile chi-quadro; al numeratore la somma al quadrato degli scarti dei risultati rispetto al valore medio; al denominatore il valore della varianza del metodo di prova (ricavato dalla carta di controllo degli scarti tipo). Il valore sperimentale deve essere minore o uguale al valore tabulato del chi-quadro per la probabilità desiderata p e per i gradi di libertà v (numero n degli addendi al numeratore meno 1).

Allo stesso modo, per saggi biologici che prevedono altri tipi di distribuzione (Poisson, binomiale) si potrebbero applicare le relative formule.

In alternativa, poiché molti metodi normalizzati prevedono come criterio di validità del saggio il rispetto di un valore prefissato dei controlli negativi, è possibile stimare l'incertezza "biologica" sulla base di questo valore. Ad esempio, per la norma ISO 6341:2012 tra i criteri di validità dei risultati si specifica che la percentuale di immobilizzazione dei controlli di *Daphnia magna* sia inferiore o uguale

al 10 %. Si potrebbe quindi concludere che è tollerata (accettata) una variabilità di $\pm 10\%$ sui controlli negativi e, per analogia, sui campioni.

Condizioni di misura

In riferimento alle condizioni ambientali del laboratorio di prova, quando il metodo da accreditare non precisa i requisiti che i locali devono rispettare, si deve far riferimento al paragrafo 5.3 della Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. In particolare, il laboratorio dovrebbe monitorare, controllare e registrare le condizioni ambientali che possono influenzare la qualità dei risultati.

A questo proposito, come indicazioni generali, può essere utile consultare la Norma ISO 5667-16:1998. Sebbene principalmente rivolta ai criteri di campionamento, pretrattamento e conservazione dei campioni acquosi destinati ai saggi ecotossicologici, questa Norma riporta utili indicazioni sull'utilizzo di contenitori, apparecchiature e procedure specifiche.

La Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 definisce i requisiti generali per la gestione e la conferma metrologica delle apparecchiature del laboratorio, si segnalano anche le indicazioni fornite dalla guida Eurachem AML 2013 Accreditation for Microbiological Laboratories.

Il metodo di prova da accreditare non sempre descrive dettagliatamente le caratteristiche di apparecchiature di uso comune in laboratorio (vetreria tarata, bilance, ecc.), oppure si limita a citare “vetreria tarata di classe A ovvero B”, “bilancia tecnica ovvero analitica”. Sono invece solitamente dettagliate le caratteristiche di apparecchiature non correntemente disponibili e/o necessarie per la specifica procedura di prova. Ovviamente, in quest'ultimo caso è indispensabile garantire il rispetto dei parametri normativi.

Quando la Norma non prevede le specifiche di funzionamento degli strumenti di normale dotazione del laboratorio (per pesare, pipettare, portare a volume, ecc.), non è sufficiente indicare le specifiche indicate dal produttore. Bisogna, infatti, rendere disponibile la documentazione relativa alla valutazione di materiali (es. vetreria tarata di classe A, taratura delle micro pipette) e strumenti di laboratorio. Tale documentazione non è relativa al metodo, ma al laboratorio e si può, quindi, precisare nella procedura di prova.

Pertanto, tutte le attrezzature (micropipette, stufe, termometri, termostati, bilance, ecc.) necessarie per l'esecuzione della prova, anche quando non esplicitamente richiamate dal metodo di prova, devono essere sottoposti a taratura periodica.

Le modalità di controllo devono ovviamente essere riportate nel Manuale della Qualità.

Solitamente l'ambito di variabilità tollerato è precisato nel metodo di norma per ciascuna delle condizioni ritenute rilevanti (tempo, temperatura, ecc.). Ciò significa che i loro effetti sono stati studiati in precedenza e, entro il campo permesso, sono risultati essere insignificanti. Pertanto, se le prescrizioni sono integralmente rispettate, non è necessario prenderle in considerazione nel calcolo dell'incertezza (EURACHEM/CITAC CG 4:2012).

Per i saggi ecotossicologici la variabilità accettabile di alcuni parametri è solitamente indicata dalla norma. In tal caso, la robustezza del metodo per quel parametro non è da verificare/dimostrare, perché si assume sia già stata provata dall'estensore della norma. È il caso ad esempio della Norma ISO 8692:2012 che stabilisce che il saggio algale ha una durata di $72\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Poiché è esplicitamente prevista una tolleranza di $\pm 2\text{ h}$, il laboratorio è soltanto tenuto a provare, con le registrazioni dei rapporti dei saggi, di aver effettuato le letture ai tempi previsti e rispettata la tolleranza indicata.

In alcuni casi, anche se il protocollo da accreditare non lo richiede esplicitamente, è invece necessario valutare sperimentalmente i margini di tolleranza per i parametri che potrebbero influire sulla determinazione finale (pH, temperatura, pesate, volumi, durata del saggio, ecc.).

Ad esempio, la Norma ISO 6341:2012 stabilisce che: “*At the end of the test period of 24 h (and where appropriate 48 h), count the mobile Daphnia magna in each container...*”.

Poiché è impossibile garantire che tutte le letture vengano effettuate esattamente alla scadenza indicata (24 o 48 h), il laboratorio dovrebbe verificare sperimentalmente quale tolleranza della durata del saggio non modifica significativamente i risultati finali. In pratica, una serie di prove in parallelo dovrebbero essere “lette” a tempi diversi (in più ed in meno rispetto alla durata stabilita, per giungere a stabilire se una tolleranza, ad esempio (24 ± 1) h, risulta accettabile).

La decisione di effettuare questa convalida sperimentale va però lasciata all’operatore che, sulla base della sua esperienza o di evidenze bibliografiche, stabilisce quando è effettivamente necessario convalidare la variabilità accettabile di un parametro. In mancanza di evidenze contrarie, si può assumere che la tolleranza accettabile sia legata alla significatività dell’unità di misura. Ad esempio, se per la durata del saggio la cifra significativa è l’unità (24 o 48), si può ammettere che possa variare di una unità, e quindi che il campo tra 23-25 ore (o 47-49 ore) definisca la variabilità tollerabile della durata del saggio.

Per la temperatura, parametro spesso più critico, poiché la velocità delle risposte biologiche è direttamente influenzata da questo parametro, si può utilizzare il criterio dell’approssimazione numerica: ad esempio, se la temperatura indicata è di 25 °C, il campo tra 24,51 °C e 25,49 °C può essere ritenuto conforme, in quanto tali valori, per approssimazione alla cifra significativa, risultano appunto pari, in entrambi i casi, a 25 °C, cioè al valore indicato dalla norma.

Analogamente a quanto più volte evidenziato per le prove microbiologiche, anche per i saggi ecotossicologici spesso si pone il problema che le specifiche di alcune norme siano troppo restrittive rispetto alle caratteristiche dei termostati utilizzati.

UNICHIM ha fornito alcuni chiarimenti in merito: *“è possibile mantenere la temperatura di un normale termostato (ad acqua) entro l’intervallo di $\pm 0,2^\circ\text{C}$; un normale armadio termostatico dovrebbe essere in grado di garantire una stabilità di $\pm 1^\circ\text{C}$; la valutazione dell’ampiezza reale di oscillazione della temperatura effettuata direttamente nei contenitori posti a incubare, o comunque in sistemi che garantiscono una inerzia termica minima, in genere rivela escursioni più ristrette di quanto non sia verificato in parallelo con sonde o termometri posti in aria libera. Un controllo così impostato permette di essere più realistici nel definire l’intervallo di accettabilità per la taratura di un termostato”*.

Matrice del campione

Si noti che il misurando tossicità intende proprio verificare l’insieme degli effetti simultanei di tutti i componenti presenti nel campione, noti e non, sul modello biologico utilizzato per il saggio. La variabilità tra un campione e l’altro, quindi, non va intesa come fonte di incertezza, perché esprime la differente risposta del modello biologico alla composizione dei campioni.

Fattori di confusione

Per ciascuno dei fattori che possono costituire una sorgente di confusione ed indurre falsi positivi, quali la presenza di solfuri e ammoniaca, dovrebbe essere stimato sperimentalmente l’intervallo di tolleranza “biologica” che non provoca scostamenti significativi dal controllo negativo e che quindi non condizionano la precisione della prova.

Effetti del tipo di calcolo

Quando il calcolo è relativamente semplice, ad esempio il risultato finale prevede solo di calcolare l’effetto relativo tra campione e controllo negativo, entrambi rilevati visivamente (conta diretta degli organismi che presentano una determinata caratteristica, ad es. mobili od immobili), l’incertezza è legata solo allo strumento utilizzato per il calcolo (calcolatrice, computer) e comporta una incertezza probabilmente trascurabile.

In molti casi è però previsto di stimare una relazione concentrazione effetto. Solitamente, per calcolare l’EC_x dalla relazione concentrazione – effetto sono disponibili algoritmi diversi che potrebbero quindi

portare a risultati differenti. Tuttavia, questa fonte di incertezza non è rilevante se il metodo di calcolo è precisato dal metodo di prova normalizzato e comunque se viene consistentemente utilizzato lo stesso algoritmo per tutti i risultati. In questo caso, l'unico “errore” è quello computazionale (calcolatrice, computer).

Quando il risultato finale viene misurato con una strumentazione che richiede una calibrazione, l'uso di algoritmi diversi di calibrazione potrebbe portare a risultati differenti. Ma se viene consistentemente utilizzato lo stesso algoritmo per tutti i risultati l'incertezza di calcolo non contribuisce all'incertezza composta.

Il documento ACCREDIA RT-08 Rev.02, al punto 5.4.7.2. precisa: “... *Con riferimento all'utilizzo di fogli elettronici o di altri programmi di calcolo commerciali, le applicazioni sviluppate dal laboratorio (formule, macro) devono essere documentate e validate. Si rammenta inoltre che è stato accertato che alcune versioni di fogli elettronici forniscono funzioni che utilizzano algoritmi non corretti, o che arrotondano i risultati in modo non corretto*”.

Quindi, se per l'espressione e l'analisi statistica dei dati si usano software commerciali, questi si considerano convalidati solo dal produttore.

Se si utilizzano invece programmi autoprodotti (ad esempio, basati su fogli elettronici), questi devono essere convalidati, riproducendo il calcolo con una calcolatrice o con un altro software convalidato; i fogli di calcolo possono essere validati anche inserendo dati noti con risultati noti.

L'utilizzo di strumentazione dedicata, che consente di ottenere i risultati richiesti attraverso una elaborazione statistica automatica delle letture del saggio, comporta la richiesta ed il rilascio, da parte del produttore dello strumento, di una dichiarazione dalla quale risulti che il sistema di calcolo è validato.

Ad esempio, per la Norma ISO 11348-3:2006 è commercialmente disponibile una strumentazione che consente di effettuare il saggio mediante *Vibrio fischeri* ed ottenere un rapporto di prova, con la relativa elaborazione statistica. Il laboratorio che richiede l'accreditamento di tale saggio con detta strumentazione dovrà esibire il certificato di validazione del software, oppure validare il calcolo con un altro software validato o riproducendo il calcolo con una calcolatrice.

Correzione per il controllo negativo

Praticamente tutti i saggi biologici prevedono risultati relativi alla risposta dei controlli negativi. Poiché i saggi vengono effettuati su un certo numero di repliche (solitamente 2, 3, o 4), tanto per il campione che per il controllo negativo, entrambi i risultati (medi) hanno associato uno scarto tipo. Per saggi biologici che prevedono misure in singolo, l'incertezza del risultato va calcolata sulla base delle incertezze attribuite a tutte le sue fonti.

Effetti dovuti all'operatore

Questa fonte di incertezza può essere abbastanza rilevante, soprattutto a causa della manipolazione degli organismi e/o alla preparazione delle diluizioni del campione. Limitatamente ai laboratori nei quali più operatori effettuano lo stesso tipo di saggi biologici, potrebbe essere organizzato un confronto intralaboratorio (tra operatori) per calcolare una riproducibilità intralaboratorio.

Ovviamente, questa fonte di incertezza è compresa nella riproducibilità interlaboratorio (indicata dal metodo normalizzato o ricavata da circuiti interlaboratorio).

Effetti casuali

Gli effetti random dovrebbero essere inclusi automaticamente in qualsiasi lista delle fonti di incertezza.

3.3 Stima definitiva dei parametri di validazione

Le tecniche utilizzate per la determinazione della prestazione di un metodo (UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, nota 2) dovrebbero essere una combinazione delle seguenti:

- taratura della strumentazione e verifica periodica del buon funzionamento, utilizzando campioni o materiali di riferimento;
- confronto dei risultati ottenuti con altri metodi normalizzati o non;
- confronti interlaboratorio;
- valutazione sistematica dei fattori che influenzano la misura e il risultato finale;
- controllo del processo analitico mediante l'elaborazione di apposite carte di controllo;
- stima dell'incertezza associata ai risultati sulla base della conoscenza scientifica dei principi teorici del metodo e dell'esperienza pratica.

Più in dettaglio, in ambito chimico le procedure da seguire, in accordo con la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, sono descritte in UNICHIM (179/0 e 179/1). Si segnalano, inoltre, la pubblicazione di ARPA Emilia Romagna a cura di Tenaglia *et al.* (2002) e, per le prove microbiologiche, la norma UNI ENV ISO 13843:2003.

Non sono invece attualmente disponibili Linee guida per la validazione di metodi ecotossicologici.

La validazione di un metodo ecotossicologico, inteso a quantificare l'effetto biologico di una o più componenti, note od ignote, presenti nel campione, prevede una prova documentata che, nell'applicazione "routinaria" di laboratorio, dimostri che le caratteristiche operative del metodo sono mantenute entro limiti specificati.

In tutti i casi, la sperimentazione deve essere effettuata nelle condizioni che riflettono quelle reali del saggio da accreditare, in particolare per quanto concerne il *modello biologico*, gli *endpoint*, la *matrice* e soprattutto la sua possibile modifica nel tempo necessario per completare il saggio stesso.

3.3.1 Stima della ripetibilità

La ripetibilità dovrebbe essere stimata attraverso uno studio della dispersione dei risultati di misurazione ripetute in condizioni "estreme strette". In realtà in alcuni casi è necessario stimare una ripetibilità intermedia con condizioni (di ripetibilità) meno restrittive. Il trattamento statistico dei dati è possibile quando il risultato della prova è espresso in termini quantitativi.

La differenza tra le due ripetibilità è data dalle diverse condizioni nelle quali viene valutata la bontà dell'accordo tra i risultati di misurazioni successive dello stesso misurando: per la ripetibilità stretta, è previsto lo stesso laboratorio, stesso operatore, stesso strumento, stesso campione (o stessi campioni se a più livelli di concentrazione di analita), stesse condizioni operative, breve intervallo di tempo; per la ripetibilità intermedia è previsto lo stesso laboratorio, ma operatore o strumento o campione/i o condizioni operative o intervallo di tempo differenti.

Secondo il Documento Accredia DT-0002/6 REV. 0, "...il limite di ripetibilità è espresso in termini di scarto tipo di ripetibilità al livello considerato e deve essere determinato mediante un sufficiente numero di ripetizioni della prova. Il limite di ripetibilità deve essere valutato a diversi livelli all'incirca equidistanti nell'intervallo di applicazione di un metodo".

In pratica, la prassi sperimentale che il laboratorio deve seguire prevede un primo momento dedicato ad effettuare alcune prove utilizzando, per quanto possibile, le condizioni indicate o ritenute ottimali, in modo da stabilire i valori di *ripetibilità stretta*. Naturalmente, ogni prova dovrebbe essere condotta con diverse unità ((4 o 5 o più contenitori) per livello di tossico considerato.

Per una normale prova di *ripetibilità* è necessario allestire e condurre parallelamente diverse unità (contenitori) indipendenti per ogni livello del tossico da saggiare, ognuna di esse preparata rigorosamente (per quanto possibile) nelle stesse condizioni ottimali.

Secondo la EURACHEM/CITAC Guide CG 4:2012: “*It is important to recognise that not all of the components will make a significant contribution to the combined uncertainty; indeed, in practice it is likely that only a small number will. Unless there is a large number of them, components that are less than one third of the largest need not be evaluated in detail. A preliminary estimate of the contribution of each component or combination of components to the uncertainty should be made and those that are not significant eliminated*”.

Come in microbiologia, i saggi ecotossicologici generalmente ricadono nella categoria delle prove per le quali non è realizzabile un calcolo dell’incertezza di misura rigoroso, metrologicamente e statisticamente valido. La stima dell’incertezza solitamente si basa dunque sui soli dati di *ripetibilità* e *riproducibilità*, idealmente comprendenti il *bias*, ad esempio ricavabili da prove valutative (proficiency test).

Le componenti individuali dell’incertezza dovrebbero essere identificate e provate essere sotto controllo, con una stima del loro contributo relativo sulla variabilità dei risultati. Alcune componenti, quali le pipettate, le pesate o le diluizioni, devono essere misurate per dimostrare che il loro contributo sia trascurabile. Altre componenti, ad esempio la stabilità del campione e la sua preparazione, non possono essere misurate direttamente, né statisticamente valutate, ma la loro importanza deve comunque essere studiata.

Seguendo questo approccio, le fonti significative di incertezza nei saggi ecotossicologici sarebbero 4:

1. la variabilità biologica intrinseca dei modelli biologici;
2. la correzione per il controllo negativo;
3. gli effetti dovuti all’operatore;
4. gli effetti casuali.

Attribuire una stima a queste incertezze è obiettivamente piuttosto difficile, se non impossibile, sulla base di considerazioni teoriche, oppure di verifiche sperimentali appositamente progettate.

Per i saggi ecotossicologici è particolarmente rilevante il paragrafo 5.4.6.2 della Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, poiché: “*laboratori di prova devono avere e devono applicare delle procedure per stimare l’incertezza di misura. In certi casi la natura dei metodi di prova può escludere il calcolo rigoroso dell’incertezza di misura, valido dal punto di vista metrologico e statistico. In questi casi il laboratorio deve almeno tentare di identificare tutte le componenti dell’incertezza e fornire una stima ragionevole, e deve assicurare che l’espressione del risultato non fornisca un’impressione errata dell’incertezza. Una stima ragionevole deve essere basata sulla conoscenza del metodo e sullo scopo della misurazione e deve far uso, per esempio, delle esperienze precedenti e della validazione dei dati.*”.

3.3.2 Stima della robustezza

La *convalida* dei metodi spesso prevede di valutare il parametro tecnico *robustezza*, cioè il grado di insensibilità dei risultati a piccole variazioni imposte ad alcuni parametri e ritenute capaci di influire sui risultati stessi. A tale scopo, dovrebbero essere effettuate delle prove utilizzando gli intervalli dei valori delle condizioni previste dall'estensore o delimitati dal laboratorio per i suoi scopi e riguardanti i parametri di maggior interesse. Più precisamente, per i parametri che si ritengono importanti, verranno utilizzati i valori estremi dell’intervallo indicato dal protocollo metodologico per stabilire se la *ripetibilità stretta* sia o no compatibile con il valore ricavato in precedenza nelle condizioni ottimali.

Per saggiare la *robustezza* del metodo rispetto ad alcuni parametri ritenuti importanti, le diverse unità, invece di essere in condizioni di partenza identiche, dovranno essere preparate secondo uno schema definito. Ad esempio, nella tabella 2 è riportato un piano sperimentale condotto con 8 diverse combinazioni di 7 parametri, identificati con le prime 7 lettere dell'alfabeto. Per ciascun parametro, la lettera maiuscola indica il limite superiore e la lettera minuscola il limite inferiore dell'intervallo per quel parametro. Ad esempio, se il parametro A indica la temperatura ed il protocollo ammette una variazione di $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con **A** si intende il limite superiore, 27°C , e con **a** il limite inferiore, 23°C .

Tabella 2 - Otto combinazioni di sette parametri per verificare la robustezza di un metodo analitico secondo Youden e Steiner (1975).

Parametri	Combinazioni							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Risultati	s	t	u	v	w	x	y	z

È dunque previsto di effettuare contemporaneamente 8 prove in singolo, una per ciascuna delle combinazioni (da 1 a 8) di parametri indicate in tabella 2.

Quindi, il primo saggio verrà effettuato con la condizione A per il parametro A/a, la condizione B per il parametro B/b, la condizione C per il parametro C/c, ecc. Il secondo saggio sarà basato sulla combinazione 2, e quindi con la condizione A per il parametro A/a, la condizione B per il parametro B/b, la condizione c per il parametro C/c, ecc. L'ottavo saggio, con la combinazione 8, avrà la condizione a per il parametro A/a, la condizione b per il parametro B/b, la condizione c per il parametro C/c, e così via. Si otterranno così 8 risultati (qui denominati con le lettere s, t, u, v, w, x, y, z).

Se la norma prevede di calcolare una ECx, interpolata dai saggi eseguiti a varie concentrazioni, verranno effettuati 8 saggi, in singolo, con le combinazioni da 1 a 8, per ciascuna delle concentrazioni previste. Infine, applicando l'opportuno algoritmo, si otterranno 8 risultati (da s a z) anche per gli ECx.

Con gli opportuni strumenti statistici, si calcoleranno poi ad ogni livello i valori dello scarto tipo di ripetibilità in queste condizioni.

Un primo confronto tra questo scarto tipo e quello calcolato in precedenza con 8 saggi con i parametri considerati nelle condizioni ottimali potrà fornire materia per giudicare se vi siano state variazioni significative nella *precisione*. Successivamente, con un calcolo semplice si può valutare l'effetto da imputare alla variazione di ciascun parametro. Un confronto di tali effetti rispetto ad un valore critico facilmente definibile permette di stabilire se uno o più di essi devono essere considerati inaccettabili e quindi per ridefinire gli intervalli dei parametri entro i quali il metodo può essere ritenuto sufficientemente robusto.

Quella descritta è la modalità teorica più semplice per valutare la robustezza del metodo nei confronti di 7 parametri; naturalmente, esistono schemi più semplici per 3 parametri con 4 unità e schemi più complessi per 11 parametri con 12 unità.

Esempio applicativo di sviluppo e normazione di un metodo.

È stato redatto da parte di ISMAR-CNR di Genova, approvato dal Gruppo di Lavoro UNICHIM e normalizzato il seguente metodo: ***Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di nauplii di Amphibalanus (=Balanus) amphitrite (Darwin, 1854) (Crustacea: Cirripedia) dopo 24h e 48h di esposizione (M.U. 2245: 12).***

Il metodo descrive le modalità di esecuzione di un saggio ecotossicologico per la determinazione degli effetti tossici a breve termine (24 h e 48 h) sulla fase larvale di un organismo marino (nauplii di *Amphibalanus* (=*Balanus*) *amphitrite* al II° stadio di crescita).

Le norme di riferimento che contengono indicazioni valide per il metodo sviluppato sono: UNI EN ISO 5667-1:2007; UNI EN ISO 5667-16:2001 (Qualità dell'acqua – Campionamento), UNI ISO 5725-2:2004 (Accuratezza, esattezza e precisione dei risultati).

La stesura del metodo ha posto le sue basi su di una ri-scrittura accurata del protocollo di esecuzione del saggio, che fino a quel momento rappresentava semplicemente un metodo interno, scritto ad uso degli operatori di laboratorio.

Il modello seguito nella fase di ristesura è stato quello di alcuni protocolli ufficiali già normati, quali ad esempio UNI EN ISO 6341:1999 (Determinazione dell'inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Prova di tossicità acuta) o UNI EN ISO 10253:2006 (Saggio di inibizione della crescita di alghe marine con *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornutum*).

È stato, quindi, seguito il medesimo schema per quanto riguarda la terminologia utilizzata e la suddivisione in paragrafi. Tale lavoro ha ovviamente previsto più fasi di revisione da parte dei componenti del Gruppo di Lavoro.

In parallelo, alla fase di stesura sono state eseguite prove di calibrazione intra- ed inter-laboratorio. La calibrazione intra-laboratorio ha previsto 10 ripetizioni del saggio da parte del laboratorio-guida (ISMAR-CNR Genova), eseguite in tempi diversi (da Luglio 2008 a Novembre 2008), utilizzando come tossico di riferimento il Cadmio Nitrato.

La fase di intercalibrazione ha previsto la partecipazione di 9 laboratori presenti sul territorio italiano (ARPA – Ferrara, ARPA – La Spezia, ARPA – Macerata, ISPRA Livorno, ISMAR CNR Genova, IAMC CNR Taranto, Università di Genova, Università di Napoli, Shoreline Coop. Trieste).

Tale esercizio ha previsto in primo luogo una fase di trasferimento delle conoscenze da parte del laboratorio guida (ISMAR CNR Genova), consistente in due giornate di training durante le quali il personale coinvolto ha appreso la metodica di ottenimento delle larve e di esecuzione del saggio. A seguito di tale fase, ISMAR CNR Genova ha fornito a tutti i laboratori partecipanti il materiale necessario per l'allestimento di una coltura larvale presso la propria sede e per l'esecuzione del saggio di tossicità sul medesimo tossico di riferimento (Cadmio Nitrato).

Ogni laboratorio ha pertanto eseguito il saggio autonomamente, eseguendo tre ripetizioni.

I risultati conseguiti mediante intra- e intercalibrazione sono risultati confrontabili e utili a definire la bontà del metodo proposto. I valori di EC₅₀ medi per le 10 ripetizioni del saggio (intra-calibrazione) hanno portato al calcolo di un coefficiente di variazione (CV) pari a 15,8% e 16,9%, rispettivamente dopo 24 e 48 ore; tali valori rientrano nel range del 14 - 30% definito dall'US EPA come "accettabile" per la variabilità delle prove intra-laboratorio con diversi organismi modello (US EPA, 2000).

Anche i valori di CV ottenuti a seguito della intercalibrazione (pari a 37,0 e 35,4% dopo 24 e 48 ore, rispettivamente) non sono risultati essere maggiori del coefficiente di variazione pari al 50% della norma ISO 6341:1991, seppur su un maggior numero di laboratori partecipanti, per la precisione interlaboratorio del test di tossicità acuta su *Daphnia magna* (ISO 6341:1996). È stato inoltre calcolato il valore *z-score*, un indicatore di qualità comunemente proposto nelle prove di intercalibrazione (AOAC & ISO & IUPAC, 1987), ottenendo un valore compreso tra +2 e -2, classificato secondo tale criterio come “soddisfacente” ai fini della valutazione della qualità del dato.

Tutta la parte sperimentale eseguita ai fini della normazione del metodo (comprendente le prove di intra- ed intercalibrazione) è pubblicata in Piazza *et al.*, 2012.

In conclusione, il percorso seguito da ISMAR CNR Genova che ha portato alla trasformazione di un metodo interno in norma UNICHIM ha richiesto un notevole impegno in termini di tempo e di personale coinvolto ed ha presentato alcune difficoltà, soprattutto di carattere “formale” durante la stesura del protocollo, dovendo adattare il linguaggio di laboratorio più comune, con cui vengono normalmente scritti i protocolli interni, alla terminologia ed alle definizioni più rigide imposte dai protocolli normativi ufficiali.

Bibliografia:

- AOAC & ISO & IUPAC, 1987. “Z-scores”: Laboratory Accreditation and Audit Protocol, Food Inspection Directorate (Agriculture Canada, March 1987).
- PIAZZA V., FERIOLI A., GIACCO E., MELCHIORRE N., VALENTI A., DEL PRETE F., BIANDOLINO F., DENTONE L., FRISENDA P., FAIMALI M. (2012) A standardization of *Amphibalanus (Balanus) amphitrite* (Crustacea, Cirripedia) larval bioassay for ecotoxicological studies. Ecotoxicology and Environmental Safety, 79: 134-138.
- UNI EN ISO 6341:1999. Determinazione dell’inibizione della mobilità della *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea – Prova di tossicità acuta.
- UNI EN ISO 10253:2006. Saggio di inibizione della crescita di alghe marine con *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornutum*.
- UNI EN ISO 5667-1:2007. Qualità dell’acqua – Campionamento – Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi di campionamento e delle tecniche di campionamento.
- UNI EN ISO 5667-16:2001. Qualità dell’acqua – Campionamento – Parte 16: Guida ai saggi biologici dei campioni.
- UNI ISO 5725-2:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione – Parte 2: Metodo base per determinare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato.
- US EPA, 2000. Understanding and Accounting for Method Variability in Whole Effluent Toxicity Applications Under the National Pollutant Discharge Elimination System Program. In: Denton D.L., Fox J., Fulk F.A., Greenwald K., Narvaez M., Norberg-King T.J., Phillips L.(Eds.), EPA/833/R-00-003., Office of Water, Washington,DC.

CAPITOLO 4: VALIDAZIONE SECONDARIA DEI METODI DI PROVA NORMALIZZATI

La validazione secondaria è la verifica della capacità di esecuzione della prova da parte del laboratorio rispetto ai vincoli imposti dal metodo (validazione del processo).

Il documento ACCREDIA RT-08 Rev. 02, che riporta le *Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori di prova*, specifica: *“Quando un metodo normalizzato o ufficiale indica la ripetibilità e l'esattezza, il laboratorio è tenuto a verificare che, in condizioni di ripetibilità, le prestazioni del laboratorio siano compatibili con quelle indicate. Ove manchino tali informazioni, il laboratorio deve determinare la propria ripetibilità e l'esattezza e verificare di mantenerla nel tempo”*.

Quindi, oltre alla determinazione della propria ripetibilità, è necessaria una assicurazione della qualità dei dati, la partecipazione a eventuali confronti interlaboratorio, nonché la documentazione delle prestazioni del metodo a lungo termine, ad esempio, predisponendo apposite carte di controllo.

4.1 Determinazione della ripetibilità

Nel documento Accredia DT-0002/6 Rev. 0 sono brevemente riportate le modalità (e degli esempi) per la stima della ripetibilità di un laboratorio per un dato metodo e la sua verifica nel tempo. L'esecuzione della *prova in doppio* viene richiesta dalla norma, per verificare che la ripetibilità di una prova rientri nel limite di ripetibilità dichiarato dal laboratorio o indicato dalla norma pertinente.

Infatti, ACCREDIA richiede che, *“...nelle visite di valutazione si richiede di allestire le prove in doppio, confrontando i risultati con il limite di ripetibilità riportato nel metodo, o con quello che il laboratorio stesso ha determinato a seguito di sperimentazioni. Per quanto riguarda i rapporti di prova emessi al termine della verifica, i laboratori sono tenuti a compilare come per prove di routine (una sola misura) indicando l'incertezza di misura come solitamente stimata, in modo da dare evidenza di quella che è la prassi quotidiana”*.

Il Documento Accredia DT-0002/6 Rev. 0 illustra poi i dettagli del calcolo, ponendo particolare attenzione sulla necessità di verificare ad esempio il tipo di distribuzione statistica, la presenza di eventuali outlier, in modo da poter successivamente applicare le formule statistiche appropriate per il tipo di dati in esame.

Se i risultati richiesti dalla normativa o dal cliente derivano da calcoli non specificatamente previsti e/o descritti dal metodo normato accreditato, ACCREDIA stabilisce che per stimare la riproducibilità del laboratorio e per ricavarne l'incertezza *“...non è necessario che il laboratorio emetta un metodo interno, ma è sufficiente che abbia una procedura di dettaglio con le istruzioni per i suddetti calcoli”*. Un esempio appropriato è quello della Norma ISO 6341:2012 a proposito di *Daphnia magna*: essa non contempla la possibilità di calcolare una percentuale di effetto, mentre il Dlgs 152/2006, per le acque reflue urbane ed industriali, richiede proprio la misura della percentuale di organismi immobili. È dunque un calcolo extra Norma, ma non richiede metodo interno.

Ancora, il documento ACCREDIA RT-08 Rev. 02, al paragrafo 5.10.3.1. relativo ai Rapporti di prova, riporta proprio un esempio relativo ad un saggio ecotossicologico: *“In alcuni casi l'incertezza può essere espressa come intervallo di fiducia (limiti inferiore e superiore), come, per esempio, nella determinazione della tossicità nell'acqua secondo la UNI EN ISO 6341, la ISO 8199 per la determinazione dei microrganismi nelle acque e nella determinazione dell'amianto secondo l'allegato 2 del DM 06/09/1994. Con riferimento al documento EA-4/16, sul rapporto di prova deve essere riportata una dichiarazione relativa al livello di fiducia ed al fattore di copertura utilizzato”*.

Essa specifica ulteriormente: “*Si rammenta che i risultati di prova devono essere corredati dalle relative incertezze quando queste influenzano la valutazione della conformità con i limiti*”.

Quindi, se il saggio ecotossicologico prevede la stima della EC_x e dei relativi limiti fiduciali, queste informazioni esprimono l’incertezza di misura. Non è dunque indispensabile calcolare l’incertezza tipo composta e l’incertezza estesa (Accredia DT-0002 rev.1).

La Guida EURACHEM/CITAC CG 4:2012, riporta infatti l’esempio del calcolo dell’incertezza standard dai limiti fiduciali: per un intervallo $\pm a$ al livello di probabilità del 95 %, poiché per la distribuzione normale si ha $t = 1,96$, l’incertezza standard è pari a $a/1,96$; assumendo una distribuzione triangolare, sarà invece $a/\sqrt{3}$; e per una distribuzione triangolare sarà $a/\sqrt{6}$.

Permane tuttavia l’obbligo di dimostrare che, ad esempio, l’errore delle pipettate o delle pesate è di entità talmente ridotta, rispetto alla variabilità del saggio, da risultare ininfluente e quindi trascurabile.

In Ecotossicologia è possibile stimare l’incertezza di categoria A (valutazione dell’incertezza per mezzo dell’analisi statistica di una serie di osservazioni), mentre risulta difficile, se non impossibile, stimare una incertezza di categoria B (incertezza stimata con mezzi diversi dall’analisi statistica di serie di osservazioni).

In particolare, quando sono disponibili delle repliche di una misura, è possibile calcolare l’incertezza tipo (l’incertezza del risultato di una misurazione viene espressa come scarto tipo, altrimenti detta deviazione standard).

La Norma UNI CEI ENV 13005:2000 (“Guida all’espressione dell’incertezza di misura”) definisce poi due altre incertezze:

- l’incertezza estesa è la grandezza che definisce intorno al risultato di una misurazione un intervallo che ci si aspetta comprendere una frazione rilevante della distribuzione di valori ragionevolmente attribuibili al misurando;
- l’incertezza tipo composta o combinata è l’incertezza di un misurando Y che non viene misurato direttamente, ma è determinato mediante una funzione di altre grandezze, ognuna affetta da una incertezza.

Ma il documento Accredia DT-0002 (Guida per la valutazione e la espressione dell’incertezza delle misurazioni) raccomanda di riportare solo il valore dell’incertezza estesa.

L’incertezza estesa U si ottiene moltiplicando l’incertezza tipo per un opportuno fattore di copertura e definisce un intervallo intorno al risultato della misurazione $[y_m - U(y); y_m + U(y)]$ che ci si aspetti comprenda gran parte della distribuzione di valori che possono essere ragionevolmente assunti dal misurando. I limiti superiore ed inferiore dell’intervallo sono quindi $CL_{sup} = y_m + U$; $CL_{inf} = y_m - U$.

Se il misurando y_m è l’EC₅₀, in pratica l’incertezza estesa U corrisponde al semi-intervallo fiduciale, cioè $U = (CL_{sup} - EC_{50})$ (oppure $U = (EC_{50} - CL_{inf})$)

Per definizione, in statistica i limiti fiduciali superiore ed inferiore al 95 % sono dati da:

$$CL_{sup} = EC_{50} + t_{0,05} s_e$$

$$CL_{inf} = EC_{50} - t_{0,05} s_e$$

$$s_e = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

dove s_e indica l’errore standard della media.

Ne consegue che $U = t_{0,05} s_e$

Per calcolare U non è necessario conoscere $t_{0,05} s_e$, perché:

$$CL_{sup} - CL_{inf} = (EC_{50} + t_{0,05} s_e) - (EC_{50} - t_{0,05} s_e)$$

$$CL_{sup} - CL_{inf} = EC_{50} + t_{0,05} s_e - EC_{50} + t_{0,05} s_e$$

$$CL_{sup} - CL_{inf} = 2 t_{0,05} s_e$$

$$U = (CL_{sup} - CL_{inf})/2$$

Poiché i limiti fiduciali associati ad una ECx generalmente sono noti (o ricavabili, in funzione del modello di calcolo dell'ECx) è molto semplice ottenere l'incertezza estesa U.

È però necessario verificare prima quale modello sia stato utilizzato. La Guida EURACHEM/CITAC CG 4:2012, nell'Appendice statistica E.4, riporta le indicazioni per ricavare l'incertezza utilizzando il metodo dei minimi quadrati per un modello lineare (approccio utilizzato ad esempio per la calibrazione di un metodo analitico). Tuttavia, la maggior parte, se non tutti, i metodi ecotossicologici raccomandano, per il calcolo della ECx, di utilizzare un modello non lineare, in quanto la relazione concentrazione – risposta solitamente segue una distribuzione curvilinea. La stessa Guida conferma che, nel caso di evidente scostamento dalla linearità, l'approccio tradizionale comporta differenze anche rilevanti nella stima della incertezza e pertanto non è appropriato.

Uno dei modelli frequentemente utilizzato in ecotossicologia è quello logit, che prevede una trasformazione logaritmica dei dati di input. I limiti fiduciali restituiti dal modello sulla scala originale dei dati risultano pertanto non simmetrici, mentre lo sono come logaritmi. Quindi, se i limiti fiduciali associati alla stima di un ECx sono simmetrici, l'incertezza estesa U è semplicemente il semiintervallo fiduciale. Se i limiti non sono simmetrici, il calcolo va modificato calcolando il log della ECx e dei relativi limiti fiduciali e quindi:

$$\text{Log } U = (\text{log} CL_{sup} - \text{log} CL_{inf})/2$$

$$U = 10^{\text{log} U}$$

$$s_e = U/2$$

$$s = s_e \sqrt{N}$$

Esempio: Assumendo che il laboratorio abbia ottenuto, su una scansione di 6 concentrazioni:

$$EC_{50} = 8,29 \text{ mg/L}$$

$$CL_{sup} = 10,29 \text{ mg/L} \quad (\text{semiintervallo } 2,00)$$

$$CL_{inf} = 6,68 \text{ mg/L} \quad (\text{semiintervallo } 1,61)$$

Limiti non simmetrici !

Passando ai logaritmi:

$$\text{Log } EC_{50} = 0,918554531 \text{ mg/L}$$

$$\text{Log } CL_{sup} = 1,012415375 \text{ mg/L} \quad (\text{semiintervallo } 0,093860844)$$

$$\text{Log } CL_{inf} = 0,824693686 \text{ mg/L} \quad (\text{semiintervallo } 0,093860844)$$

Limiti simmetrici !

Quindi si ricava che:

$$\text{Log } U = (\text{log} CL_{sup} - \text{log} CL_{inf})/2 = 0,093860844$$

$$U = 1,241254524$$

$$s_e = U/2 = 0,620627262$$

$$s = s_e \sqrt{N} = 1,520220112$$

CV % = 100*s/media = 18,34

Se il calcolo della EC₅₀ è invece basato sul modello Probit, anche passando ai logaritmi i limiti fiduciali rimangono asimmetrici, perché il calcolo si basa su un diverso algoritmo. In questo caso, i calcoli sono:

$$I = EC_{50} - CL_{inf}$$

$$S = CL_{sup} - EC_{50}$$

$$\text{Log } U = (\text{log}I + \text{log}S)/2$$

$$U = 10^{(\text{log}U)}$$

Esempio: Assumendo che il laboratorio abbia ottenuto, su una scansione di 5 concentrazioni, con il modello Probit, una EC₅₀ pari a 0,50 mg/L :

$$CL_{sup} = 0,54 \text{ mg/L} \quad (\text{semintervalllo } S = 0,04)$$

$$CL_{inf} = 0,47 \text{ mg/L} \quad (\text{semintervalllo } I = 0,03)$$

Quindi limiti non simmetrici.

Passando ai logaritmi:

$$\text{Log } EC_{50} = -0,301029995 \text{ mg/L}$$

$$\text{Log } CL_{sup} = -0,26760624 \text{ mg/L} \quad (\text{semintervalllo } 0,033423755)$$

$$\text{Log } CL_{inf} = -0,327902142 \text{ mg/L} \quad (\text{semintervalllo } 0,026872147)$$

Limiti ancora non simmetrici.

Allora:

$$\text{Log } U = (\text{log}I + \text{log}S)/2 = (\text{log } 0,03 + \text{log } 0,04)/2 = (-1,522878745 - 1,397940009)/2 = -1,460409377$$

$$U = 0,034641016$$

$$s_e = U/2 = 0,017320508$$

$$s = s_e \sqrt{N} = 0,038729833$$

$$CV \% = 100*s/\text{media} = 7,75$$

Se il modello di calcolo della EC₅₀ prevede un altro tipo di trasformazione dei dati, sarà necessario utilizzare le opportune correzioni.

Se il modello non è noto, si può optare per un metodo non parametrico, basato sulla disuguaglianza Chebyshev (Oswen, 2002), se l'asimmetria dei dati non è eccessivamente elevata.

La disuguaglianza prevede che:

$$CL_{sup} = \text{media} + \sqrt{\frac{1}{\alpha} - 1} \left(\frac{s}{\sqrt{N}} \right)$$

$$s = \frac{(CL_{sup} - \text{media})\sqrt{N}}{\sqrt{\frac{1}{\alpha} - 1}}$$

$$s_e = \frac{s}{\sqrt{N}}$$

$$U = 2 s_e$$

Esempio: su 31 concentrazioni, si è ottenuto una EC₅₀ di 9,59 mg/L ed un CL_{sup} ($\alpha = 0,05$) di 16,7.

In base alle formule sopra indicate, si ottiene:

$$s = 9,081835833 \text{ CV\%} = 94,70$$

$$s_e = 1,631145868$$

$$U = 3,262291736$$

L'equazione $U = 2 s_e$ permette di stimare l'incertezza estesa anche per i risultati di un singolo saggio di tossicità, sulla base dei valori ottenuti per le diverse repliche.

Per dati di tipo continuo, quali ad esempio quelli ottenuti con un saggio di tossicità, è sufficiente calcolare l'errore standard della media, pari alla deviazione standard s delle repliche, diviso la radice quadrata del numero delle repliche N , e moltiplicare per 2.

Esempio: in un saggio algale, su 6 repliche ($N = 6$) si è ottenuta una percentuale di inibizione media della crescita algale $I\%$ pari al 19,72 %, con una deviazione standard $s = 7,32$.

L'errore standard della media è:

$$s_e = s / \sqrt{N} = 2,99$$

$$U = 2 s_e = 5,98$$

$$U \% = 100 U/I\% = 30,32$$

Per dati di tipo quantale, ad esempio il saggio di immobilizzazione con *Daphnia*, si possono avere solo mobili od immobili. Il risultato di un saggio è espresso dalla proporzione $p = \text{numero immobili/numero totale di esposti } n$.

Si deve quindi utilizzare la distribuzione binomiale, che è caratterizzata da una speranza matematica (spesso indicata come media o valore medio) $E = np$ e da una varianza $s^2 = npq$, dove $q = 1 - p$.

$$\text{Quindi, } s = \sqrt{s^2} = \sqrt{npq}.$$

Esempio: in un saggio con *Daphnia*, con 4 repliche, si ottengono 7 immobili su un totale di 20 esposti.

$$p = 7/20 = 0,35$$

$$q = 1 - p = 0,65$$

$$E = np = 7$$

$$s^2 = npq = 4,55$$

$$s = \sqrt{s^2} = 2,13$$

$$s_e = \sqrt{(pq/n)} = 0,11$$

$$U = 2 s_e = 0,21$$

$$U \% = 100 U/E = 3,05$$

Infine, la Guida EURACHEM / CITAC CG 4 (2012) riporta una procedura di stima dell'incertezza basata sulla simulazione di Monte Carlo, che utilizza un algoritmo per generare una serie di stime della ECx che seguono la distribuzione di probabilità che si suppone abbia la relazione concentrazione – risposta da indagare. La deviazione standard di tutti i risultati così stimati corrisponde all'incertezza standard.

Bibliografia

Oswert, 2002. Calculating Upper Confidence Limits For Exposure Point Concentrations At Hazardous Waste Sites Office of Emergency and Remedial Response U.S. Environmental Protection Agency Washington, D.C. 204609285, 6-10 December 2002.

4.2 Assicurazione della Qualità dei dati

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 prevede procedure di controllo della qualità del risultato per monitorare la validità delle prove effettuate. Pertanto il Laboratorio dovrebbe pianificare il tipo di controlli e la relativa frequenza che intende adottare per monitorare i propri risultati, in funzione del tipo e del volume delle attività svolte attraverso uno o più dei seguenti approcci:

- l'utilizzo regolare di materiali di riferimento certificati e/o la tenuta sotto controllo della qualità interna nell'utilizzo di materiali di riferimento secondari;
- la partecipazione a programmi di confronti interlaboratorio o prove valutative;
- la ripetizione di prove utilizzando metodi identici o differenti;
- l'effettuazione di nuove prove sugli oggetti conservati;
- la correlazione di risultati fra caratteristiche diverse di un oggetto.

Tale controllo esteso nel tempo produce una serie di dati che trattati attraverso strumenti statistici (es. carte di controllo) consentano di evidenziare eventuali tendenze significative. Qualora i risultati di tali monitoraggi non siano conformi ai criteri di accettabilità stabiliti il laboratorio dovrebbe valutare le cause e stabilire azioni correttive per prevenire che siano riportati risultati non corretti.

Per i saggi ecotossicologici le misure devono necessariamente essere riferite ad organismi precisamente identificati (classificazione tassonomica) ed in condizioni vitali spesso precise dalle Norme stesse per quanto concerne età, sesso, condizioni di alimentazione ed allevamento, ecc.

Ad esempio, la Norma UNI EN ISO 16712:2005, al punto 4.1.3 (Source) stabilisce: *“All amphipods used in a test shall be derived from the same population and source. Test organisms can be either recently collected from an area in which contaminants are at or below background levels, or organisms can be cultured in a laboratory [11], [12], [48]”*.

Per organismi raccolti in campo occorre, dunque, tenere un registro che documenti la data di raccolta, l'area di provenienza e, soprattutto, una caratterizzazione dei sedimenti nativi che dimostri la relativa assenza di impatto antropico. Se gli organismi derivano invece da allevamenti (o colture) di laboratorio è necessario documentare, tramite una autodichiarazione, la descrizione della metodologia seguita per l'allevamento/coltura, precisando l'origine dei capostipiti degli organismi. Se questi sono stati raccolti in campo, valgono le indicazioni di cui al periodo precedente; se, al contrario, sono stati ottenuti od acquistati da un fornitore, la documentazione dovrebbe includere anche una dichiarazione dello stesso fornitore.

In alcuni casi è la stessa norma ad indicare alcuni possibili fornitori (ISO 8692:2012): si tratta però soltanto di una indicazione intesa a facilitare il reperimento degli organismi capostipite, non vincolante. Infatti, tali organismi possono essere ottenuti anche da altri fornitori qualificati, purché questi siano in grado di documentare la conformità ai requisiti della Norma per quanto concerne l'identificazione tassonomica e, se previsto, stato, età, sesso, ecc.

Per quanto concerne le condizioni di allevamento, se sono prescritte come vincolanti dalla Norma, ovviamente devono essere rispettate in tutti i punti ed i registri di laboratorio devono documentare la conformità. Se, invece, non sono vincolanti ma genericamente indicate, ad esempio rimandando a pubblicazioni specifiche, la procedura effettivamente seguita dal laboratorio deve essere chiaramente descritta, documentando gli elementi caratterizzanti (ad esempio la misura del fotoperiodo e dell'illuminazione, specificando la variabilità ammessa, la frequenza di verifica, ecc.).

Eventuali difformità dalla procedura consigliata devono essere opportunamente motivate, ad esempio con riferimento a pubblicazioni più recenti di quella consigliata che dimostrino come la variazione introdotta comporti un miglioramento (tecnico, economico, temporale) e dimostrando che gli organismi ottenuti rispondono comunque ai requisiti previsti dalla Norma proposta per l'accreditamento.

4.2.1 Procedure di controllo

Nell'ambito delle procedure di controllo da considerare troviamo la regolamentazione sull'utilizzo di materiali di riferimento (certificati); il confronto tra tecniche indipendenti; la partecipazione in studi di sviluppo/validazione di metodi o di caratterizzazione di materiali di riferimento; l'uso di misure interne di controllo della qualità; altri confronti inter/intralaboratorio (ad esempio analisi di campioni ciechi).

Nel caso dei saggi ecotossicologici non esistono materiali di riferimento per il misurando tossicità, ma è possibile stimare ripetibilità e riproducibilità per tossici di riferimento specifici, indicati dal metodo normalizzato o ricavati da circuiti interlaboratorio. Per quest'ultimo aspetto occorre evidenziare che, in assenza di enti accreditati per la realizzazione di circuiti interlaboratorio per il misurando tossicità, la questione di quali circuiti possano essere ritenuti accettabili/leggittimi, rimane aperta.

A titolo informativo si ricorda che un rilievo di non conformità può dipendere anche da una non corretta gestione dei materiali di riferimento (nel caso di saggi ecotossicologici, i tossici di riferimento). Ad esempio, il laboratorio deve confermare che il materiale di riferimento viene utilizzato per i saggi ecotossicologici e non per altri scopi.

Per quanto concerne il confronto tra tecniche indipendenti, essendo i saggi di tossicità metodi empirici, questo criterio non può essere applicato.

L'uso di misure interne di controllo della qualità è certamente un modo molto efficace di garantire la bontà delle prestazioni del laboratorio ed è spesso previsto dalle norme. Ad esempio, per la nuova edizione della Norma ISO 6341:2012, la sensibilità degli organismi deve essere sistematicamente verificata determinando la EC50 a 24 h con il tossico di riferimento dicromato di potassio. Questa verifica va necessariamente effettuata entro un mese dall'esecuzione dei saggi su campioni di prova. In pratica, quindi, il laboratorio che effettua il saggio su basi routinarie avrà a disposizione molti dati (controllo di qualità interno) e di conseguenza potrà proporre una ridotta frequenza di partecipazione a confronti interlaboratorio.

La partecipazione in studi di sviluppo/validazione di metodi o di caratterizzazione di materiali di riferimento e l'uso di misure interne di controllo della qualità sono importanti elementi per dimostrare l'esperienza del laboratorio.

Nei confronti interlaboratorio viene talvolta distribuito un campione cieco (naturale o artificiale) sul quale i laboratori partecipanti determinano la tossicità secondo il protocollo metodologico specificato dagli organizzatori del circuito. La corretta determinazione della tossicità di un campione cieco è un altro importante elemento per garantire le capacità del laboratorio.

4.3 Partecipazione a confronti interlaboratorio

Tra i requisiti previsti dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 per il controllo delle qualità del dato è previsto (ove applicabile) che il laboratorio partecipi a prove valutative interlaboratorio (Proficiency Testing PT).

La Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 ed il documento ACCREDIA RT-08 Rev. 02, a proposito dell'Assicurazione della qualità dei risultati di prova e taratura, stabiliscono che:

"Il laboratorio deve, ove possibile, rivolgersi ad organizzazioni di confronti interlaboratorio che operino in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043 (per esempio rivolgendosi ad organizzazioni accreditate per tale attività oppure che dichiarino di operare in conformità alla suddetta norma). I laboratori devono comunicare ad ACCREDIA la loro partecipazione a confronti interlaboratorio, tenendo a disposizione degli ispettori, ed inviando su richiesta di ACCREDIA una sintesi dei risultati forniti, i valori di riferimento ed i criteri di valutazione dell'organismo organizzatore del circuito – vedi RT-24 rev. 0.

La partecipazione a circuiti interlaboratorio può essere richiesta da ACCREDIA a laboratori in corso di accreditamento o già accreditati come elemento di valutazione per la concessione o il mantenimento dello stesso".

La citata Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 ed il Regolamento ACCREDIA RT-27: rev. 0 , definiscono il confronto interlaboratorio come: "...organizzazione, prestazione e valutazione di misurazioni o prove sugli stessi materiali o su materiali simili, da parte di due o più laboratori in conformità a condizioni prestabilite".

I risultati dei confronti interlaboratorio e delle prove con materiali di riferimento devono essere sistematicamente riportati in apposite carte di controllo.

L'organizzazione dei confronti interlaboratorio dovrebbe tener conto delle indicazioni fornite dalla Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 e dalla ISO 13528:2005. In particolare, va sottolineato che, secondo quanto previsto dalla Norma UNI ISO 5725:2004 un corretto confronto interlaboratorio dovrebbe vedere la partecipazione di 8 – 15 laboratori, ciascuno dei quali con plessa esperienza di applicazione del metodo in esame.

Ulteriori indicazioni vengono infine fornite dal documento Accredia RT 24 rev.1. Ad esempio vengono previsti diversi tipi di confronti:

- a) Prove valutative proposte da organizzatori indipendenti (in conformità ai requisiti della UNI CEI EN ISO/IEC 17043);
- b) Prove valutative organizzate dall'EA, dall'APLAC, oppure offerte nell'ambito della cooperazione internazionale;
- c) Audit su misure (effettuati dagli ispettori tecnici nel corso delle visite di valutazione, quando sono disponibili materiali di riferimento certificati);
- d) Prove valutative basate su confronti bilaterali (quando non siano disponibili altri tipi di confronti interlaboratori In questo caso, poiché non è possibile un trattamento statistico dei dati, data l'esiguità degli stessi e la non rappresentatività, i risultati vengono ritenuti poco significativi).

Per quanto concerne l'elaborazione statistica dei risultati delle prove valutative interlaboratorio, è richiesto che vengano documentati e validati i sistemi di calcolo (fogli elettronici, programmi commerciali, applicazioni sviluppate dall'organizzatore, quali formule, macro, ecc.). Pertanto, oltre ad una registrazione della validazione, *"devono essere condotti sistematici controlli per assicurarsi che il programma di calcolo utilizzato sia idoneo per la specifica prova valutativa"*.

La Norma Europea UNI EN 16101:2012 descrive i principi informatori e le metodiche da seguire, compresa l'elaborazione statistica dei risultati, per organizzare il confronto interlaboratorio tenendo conto del livello richiesto di confrontabilità tra individui e laboratori; del tipo di dati generati (quantali o continui); della comprensione della distribuzione statistica sottostante a questo tipo di dati; delle fonti di variabilità del metodo.

Sebbene recentemente siano state condotte prove interlaboratorio organizzate da diversi soggetti (tra cui ISPRA), è da osservare che queste hanno avuto un carattere non continuativo ed aperto alla partecipazione sia di laboratori pubblici che privati; pertanto, la partecipazione a circuiti interlaboratorio rimane un fattore particolarmente critico nel caso dei saggi ecotossicologici, per la obiettiva scarsità di organizzazioni ufficialmente riconosciute.

A tal proposito, in considerazione del ruolo istituzionale che ISPRA riveste sul piano nazionale anche in rapporto alle Agenzie Regionali, è evidente che parallelamente alla progressiva delinearazione del percorso di accreditamento, il Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente dovrà chiarire ed assumersi un ruolo sempre più attivo e di riferimento in questo ambito.

È particolarmente importante ricordare che la partecipazione a confronti interlaboratorio non è limitata all'occasione dell'accreditamento del saggio in esame. Il documento accredia RT-24 rev.1, infatti,

chiede la partecipazione a prove valutative interlaboratorio e che il numero minimo di partecipazioni e frequenza di tali partecipazioni vengano preventivamente concordate. Questo punto è ulteriormente discusso nel documento EA-4/18 Rev.0. In pratica, il laboratorio propone all'organismo di accreditamento un proprio programma per il successivo quadriennio, tenendo conto delle proprie procedure di controllo di qualità, del livello di rischio, del tipo di PT disponibili, delle eventuali prescrizioni legislative. ACCREDIA deve preventivamente approvare questo programma per poi seguire il suo regolare svolgimento.

4.3.1 Livello di rischio

Il numero e la frequenza delle partecipazioni a confronti interlaboratorio dipendono dal rischio presentato di una non corretta esecuzione dei saggi ed è ovviamente funzione del tipo di prova e dalla metodologia utilizzata.

Questo rischio può essere stimato tenendo conto del numero di prove effettuate, dall'esperienza del personale, dalla riferibilità delle misure, dalla conoscenze della stabilità/instabilità della procedura, dal successivo utilizzo dei risultati delle prove (ad esempio, se devono assumere un valore legale).

4.3.2 Tipo di prove valutative interlaboratorio disponibili

Secondo il documento EA-4/18 Rev.0 le prove valutative interlaboratorio che vengono accettate da ACCREDIA possono essere presentate da organizzazioni indipendenti, oppure come esercizio collaborativo tra un numero adeguato di laboratori.

L'attuale situazione, tuttavia, potrebbe essere suscettibile di notevoli cambiamenti nel prossimo futuro, in quanto ACCREDIA nel 2011 ha redatto il Regolamento Tecnico RT-27 rev. 0, che, sulla base della Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010, descrive gli elementi che ACCREDIA prenderà in considerazione per verificare "...la competenza tecnica e gestionale dell'organizzatore di prove valutative interlaboratorio a progettare, organizzare e gestire le prove indicate nello scopo dell'accreditamento, e l'attuazione di un sistema gestionale per la qualità allineato ai principi della ISO 9001:2008". Il Documento RT-27 rev. 0 stabilisce, inoltre, che il regolamento tecnico è applicabile a tutti gli organizzatori di prove valutative interlaboratorio; non vengono cioè contemplate eccezioni e gli organizzatori di prove valutative interlaboratorio di centri di ricerca hanno gli stessi obblighi di quelli commerciali.

Si puntualizza inoltre che: "Al fine di ottenere e mantenere l'accreditamento gli organizzatori di prove valutative interlaboratorio devono dimostrare di essere conformi a tutti i requisiti delle norme applicabili, ad eccezione di quelli dichiarati non applicabili, a seguito di debita e documentata motivazione, per tutte le attività previste nello schema della prova valutativa interlaboratorio; sarà inoltre verificata la competenza tecnica (formazione-addestramento del personale, validazione dei metodi utilizzati nello schema della prova valutativa interlaboratorio, riferibilità delle misure, ecc.)".

Purtroppo, per i saggi ecotossicologici attualmente non esistono provider di confronti interlaboratorio accreditati secondo la Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010. Pertanto, almeno in via provvisoria, possono essere accettati anche i risultati di una partecipazione ad un interconfronto condotto secondo quanto previsto dalla Norma UNI ISO 5725-2:2004, od anche a confronti interlaboratorio non conformi a tale Norma, condotti da un consorzio di laboratori, utilizzando un protocollo di prova concordato per il saggio da accreditare.

Infine, se l'interconfronto non è effettuato specificatamente con il protocollo in accreditamento, possono essere accettati anche i risultati di interconfronti tra metodi diversi. In questo caso, però, viene richiesto di aumentare la qualità interna del dato, con prove addizionali. Va sottolineato, comunque, che gli interconfronti autogestiti sono normalmente sconsigliati, perché difficilmente è possibile

fornire garanzie sulla stabilità ed omogeneità dei campioni, nonché sulla gestione dei dati (interpretazione statistica).

4.3.3 Prescrizioni legislative

La frequenza della partecipazione a confronti interlaboratorio può essere prescritta per legge per alcuni tipi di prove. In questo caso, ovviamente, la programmazione non può essere inferiore a quella richiesta, ma eventualmente può prevedere una frequenza superiore, in particolare per prove per le quali il livello di rischio è elevato.

Attualmente, per i saggi ecotossicologici non è prevista per legge una specifica frequenza di partecipazione a confronti interlaboratorio.

4.3.4 Ulteriori elementi per la programmazione della frequenza di partecipazione a confronti interlaboratorio

Secondo il documento EA-4/18rev.0 il laboratorio dovrebbe partecipare a PT specifici per ciascuna tecnica di misura, proprietà misurata e tipo di campione.

Nel caso dei saggi ecotossicologici la tecnica di misura e la proprietà misurata sono definiti dal protocollo operativo. Quindi, il confronto interlaboratorio da utilizzare è quello che prevede l'utilizzo dello stesso protocollo operativo da parte di tutti i laboratori. In ciò, il confronto interlaboratorio differisce da quelli utilizzati in chimica o microbiologia, dove è ammesso l'uso di protocolli diversi, se consentono la misura dello stesso parametro (si veda ad esempio la Norma ISO 5725-6/Cor 1: 2001). Si ribadisce infatti che, per i saggi ecotossicologici, il determinando *tossicità* è strettamente dipendente dal metodo di misura e protocolli operativi diversi necessariamente comportano una differenza nei valori numerici stimati.

Per il tipo di campione il documento EA-4/18 rev. 0 ammette che campioni aventi matrici simili possano essere considerati equivalenti; in pratica, se il saggio viene effettuato ad esempio su campioni acquosi, il confronto interlaboratorio può essere considerato valido indipendentemente dal tipo di matrice (acque superficiali, effluenti, ecc.). Ma se il campo di applicazione del saggio ammette matrici diverse (acqua, fanghi, sedimenti, ecc.), tale saggio può essere accreditato solo per la matrice specificata e con partecipazione ad un confronto interlaboratorio condotto su quella specifica matrice.

Per l'accreditamento del saggio per una matrice differente, si richiede pertanto la partecipazione ad un ulteriore confronto interlaboratorio.

4.4 Carte di controllo

Le carte di controllo sono strumenti statistici per il controllo della qualità che devono essere utilizzate per confrontare lo stato attuale di un processo con limiti, basati sulle prestazioni precedenti, che tengono conto della variabilità intrinseca di quel processo.

In ecotossicologia, ad esempio, le carte di controllo permettono di verificare se la risposta di un modello biologico in un saggio di tossicità è confrontabile con quella normalmente riscontrata nei saggi dello stesso tipo effettuati in precedenza nello stesso laboratorio di prova con lo stesso protocollo metodologico.

ISO ha pubblicato le seguenti Norme sulle carte di controllo:

- ISO 7870-1:2014 - Control charts -- Part 1: General guideline;

- ISO 7870-2:2013 - Control charts -- Part 2: Shewhart control charts, principalmente utilizzate per verificare lo “*stato di controllo statistico*” o come strumento di accettazione di un processo (anche se non sono state specificatamente studiate per questo scopo);
- ISO 7870-3:2012 - Control charts -- Part 3: Acceptance control charts, specificatamente studiate come strumento di accettazione di un processo.

Il laboratorio di prova deve costantemente verificare che il processo, cioè nel caso specifico l'insieme delle operazioni necessarie per effettuare un saggio ecotossicologico, sia in uno stato di controllo statistico, con l'eccezione della variabilità casuale. Se la variabilità manifestata è superiore a quella che in precedenza risultava associata a variazioni unicamente casuali, il processo deve essere considerato fuori controllo.

Tale verifica consiste nel confronto di valori e andamenti di misure statistiche, cioè misure soggette ad errori legati al campionamento e/o ai processi di misura.

Il confronto può essere effettuato utilizzando un metodo grafico, oppure tabulare.

Le carte di controllo si applicano sia a dati di “*variabili*”, sia a dati di “*attributi*”. Per dati di variabili si intendono le osservazioni ottenute misurando e registrando la grandezza numerica di una caratteristica per ciascuna delle unità nel gruppo in osservazione (e presuppongono quindi una scala continua di qualche tipo); i dati di attributi, invece, sono le osservazioni ottenute annotando la presenza (o assenza) di qualche caratteristica od attributo in ciascuna delle unità del gruppo sotto osservazione e contando quante unità posseggono (o non posseggono) l'attributo, o quanti eventi si verificano nell'unità, gruppo, area o volume del campione.

Le misure statistiche utilizzate si distinguono in misure di posizione ed in misure di dispersione; le prime, ad esempio medie e mediane, permettono di verificare se c'è uno *spostamento* nelle prestazioni del processo, mentre le seconde, quali range e scarto tipo (deviazione standard) rilevano un eventuale *cambiamento* nella variabilità entro gruppi.

Per la maggior parte delle carte di controllo per variabili, si assume la distribuzione normale e vengono riportate in grafico le medie. Il presupposto statistico si basa sulla considerazione che, tranne casi eccezionali, le medie tendono a seguire la distribuzione normale anche se le osservazioni individuali non sono normalmente distribuite (Teorema del Limite Centrale). Ciò rende ragionevole assumere la normalità per carte basate sulle medie, anche per piccole dimensioni dei campioni (4 o 5) nel valutare i controlli (altri Autori, tuttavia, ritengono che il Teorema del Limite Centrale sia valido per $n \geq 30$).

Per un uso corretto delle carte di controllo per variabili, è necessario utilizzare entrambi i tipi di carte di controllo, di posizione e di dispersione.

Per i dati di attributi si usa invece una sola carta di controllo. Infatti, una “*p*” chart (carta di controllo della proporzione *p* di qualche classificazione specificata) è basata sulla distribuzione binomiale, invece che sulla distribuzione normale assunta per i dati di variabili. Poiché lo scarto tipo (o l'errore standard) s_p di una proporzione è:

$$s_p = \sqrt{p(1-p)/n}$$

e quindi dipende solo da *n* (numero delle osservazioni) e *p*, non è necessario preparare una carta di controllo separata per s_p .

Sempre per i dati di attributi è possibile optare per una carta di controllo “*c*” (dove *c* indica la conta degli eventi di una classificazione data), che è basata sulla distribuzione di Poisson. In questo caso lo scarto tipo (o errore standard) s_c è coincidente con *c*, quindi non avrebbe senso preparare una carta di controllo separata per la variabilità.

Tutte le carte di controllo prevedono criteri per l'identificazione di due tipi di limiti: il primo (action limit) segnala la necessità di una azione, perché il processo è fuori controllo; il secondo (warning

limit) richiama l'attenzione quando il processo, pur essendo ancora in controllo, mostra una tendenza statistica verso un fuori controllo. Entrambi i limiti sono basati su multipli di s_e , l'errore standard della statistica considerata, a sua volta derivata dalla deviazione standard entro gruppi, oppure sono basati su un multiplo del range come misura della variabilità (ed in questo caso non serve l'errore standard).

Le carte di controllo richiedono che i dati vengano ottenuti campionando un processo ad intervalli, temporali (es., ogni settimana), o quantitativi (es., per ogni lotto di organismi), approssimativamente regolari.

I dati ottenuti vengono sistematicamente confrontati con quelli prefissati, nel caso il protocollo metodologico utilizzato prescriva anche una statistica di posizione e/o dispersione, oppure una disposizione legislativa imponga valori specifici.

Se, al contrario, non sono previsti obiettivi statistici, sulla base della serie pregressa di osservazioni viene calcolata una statistica di posizione; per dati di variabili, ad esempio relativi alla misura della densità algale, ma non per i dati di attributi, ad esempio il conteggio di vivi e morti in un saggio di tossicità letale, viene inoltre calcolata una statistica di dispersione. Queste statistiche vengono sistematicamente aggiornate ogni volta che viene aggiunta una osservazione, confrontandola con le statistiche precedentemente calcolate.

In entrambi i casi è così possibile verificare quando una osservazione rientra nei limiti di controllo (di attenzione e di azione). Questa non è però l'unica condizione per assicurare che il processo rimanga effettivamente in controllo. Infatti, per identificare correttamente le possibili cause di un fuori controllo è necessario esaminare l'andamento complessivo di tutti i dati. Le Norme ISO 7870-1:2014, ISO 7870-3:2012; ISO 7870-4:2011, ISO 7870-2:2013 e ISO 7870-5:2014 offrono tutte le indicazioni sull'argomento, ma l'analista dovrebbe comunque prestare attenzione a qualsiasi andamento insolito.

A titolo informativo, si ricorda che è possibile realizzare carte di controllo anche per dati individuali, sebbene siano molto più sensibili a cambiamenti non casuali rispetto a quelle per le medie.

Il sistematico uso delle carte di controllo offre dunque un potente strumento statistico per verificare che le prestazioni del laboratorio di prova siano consistentemente accettabili.

Per i saggi ecotossicologici è necessario realizzare dunque le opportune carte di controllo (per dati di variabili o per dati di attributi), tanto per i controlli negativi che per i controlli positivi: quelle per i controlli negativi consentono di verificare che vengano rispettati i criteri di validità spesso indicati dalla norma in accreditamento (ad esempio, densità algale minima da raggiungere al termine del saggio algale, oppure sopravvivenza minima nei controlli negativi in un saggio di tossicità letale); quelle per i controlli positivi che venga stimato correttamente l'effetto valutato dal saggio (ad esempio, la EC_x o la percentuale di effetto osservata per una determinata concentrazione di un tossico di riferimento).

4.5 Qualifica degli operatori e mantenimento della loro competenza

La Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 stabilisce che la direzione del laboratorio deve assicurare la competenza degli operatori e, per scopi specifici, la loro qualifica sulla base di studi effettuati, l'addestramento ed esperienza e/o abilità dimostrata.

Tale prescrizione per i saggi ecotossicologici trova alcuni risvolti specifici. Ad esempio, alcuni protocolli richiedono di documentare l'identificazione tassonomica, l'origine e/o la preparazione degli organismi per il saggio. È il caso della Norma ISO 16712:2005 che, al punto 4.1.1 (General) prevede: *“One of the marine or estuarine sediment-dwelling amphipod species listed in Annex B should be used as test organism for the method in this International Standard. The species identification should be*

conducted using taxonomic keys[18] and confirmed by a qualified taxonomist familiar with identifying marine or estuarine amphipods”.

In questo caso, per confermare che l’identificazione tassonomica sia effettuata da operatori qualificati è necessario la compilazione di un *curriculum vitae* (normalmente in formato europeo), aggiornato almeno una volta all’anno con l’aggiunta di eventuali pubblicazioni, attestati di partecipazione a corsi specifici di formazione, e così via, a dimostrazione delle competenze specifiche acquisite.

La qualificazione dell’operatore è passaggio fondamentale per verificare la sua specifica abilità e viene valutata attraverso il soddisfacimento dei suoi requisiti per effettuare un determinato saggio biologico a partire dalla formazione (Diploma di Maturità/Laurea pertinente al ruolo lavorativo ricoperto). L’acquisizione di successivi titoli a seguito di eventi vari (master, corsi di formazione esterna, formazione interna/affiancamento, ecc.) può essere documentata mediante un modulo riassuntivo con il quale il Responsabile potrà agevolmente visionare il personale già in possesso degli eventuali requisiti specifici richiesti, ovvero programmare attività di formazione *ad hoc*, preliminarmente all’applicazione di determinati saggi biologici.

In secondo luogo si passerà alla qualificazione vera e propria, consistente nella verifica del rispetto dei criteri che sono riportati nella scheda integrativa al metodo di prova normalizzato o direttamente nel metodo di prova interno.

Le procedure che possono essere utilizzate per la verifica dei requisiti previsti per il mantenimento della qualifica possono essere:

- utilizzo delle carte di controllo;
- prove di ripetibilità;
- eventuale partecipazione a circuiti interlaboratorio.

Per quanto riguarda quest’ultimo punto si rileva una scarsa disponibilità sul mercato di circuiti per i vari tipi di saggio che possono essere oggetto di richiesta di accreditamento, contrariamente a quanto accade per numerosissimi metodi chimici.

Un criterio generale potrebbe essere quello di verificare la sensibilità di un organismo verso un tossico di riferimento, organico e/o inorganico, calcolando in condizioni di ripetibilità il valore dell’EC50 su 5 repliche, con successivo calcolo del CV %. Il valore del CV % dovrebbe essere inferiore al limite imposto dal laboratorio, che può essere ragionevolmente indicato come $\leq 25\%$. Inoltre, può essere richiesto che tutti i valori di EC50 calcolati in ciascuna delle cinque prove ricadano entro i limiti di cui alla carta di controllo del laboratorio per quel dato saggio, qualora disponibile.

La qualificazione ottenuta per la effettuazione di un dato saggio biologico dovrebbe essere periodicamente verificata con prove finalizzate al mantenimento in qualifica, ovvero alla sua sospensione in caso di mancato raggiungimento, del limite prestazionale previsto.

Di norma le attività contemplate per il mantenimento in qualifica sono meno gravose rispetto a quelle previste per la qualificazione, in quanto riservate al personale che già applica una data metodica. Per il mantenimento della qualifica di un operatore rispetto alla effettuazione di un dato saggio biologico, si potrebbe procedere secondo le seguenti modalità:

- esecuzione di un saggio in singolo con tossico di riferimento e calcolo dell’EC50, che dovrà ricadere entro i limiti di cui alla carta di controllo del laboratorio per quel dato saggio (qualora disponibile);
- esecuzione, in condizioni di ripetibilità, di una prova in doppio con una sola concentrazione del tossico di riferimento, per la quale la differenza tra la percentuale di effetto di ciascuna replica dovrà rispettare la relazione :

$$|X_1 - X_2| \leq R \quad (1)$$

dove R è il limite di ripetibilità calcolato in fase di validazione del metodo o riportato nel metodo normalizzato.

Il calcolo del limite di ripetibilità di un metodo ecotossicologico, analogamente a un metodo chimico, consiste nel calcolare la ripetibilità r ad almeno tre concentrazioni del tossico di riferimento, calcolando successivamente l'equazione della relazione esistente tra r e la percentuale di effetto riscontrata a ciascuna concentrazione saggia.

Di norma la relazione esistente tra le due variabili è lineare:

$$r = ax + b$$

ove x è sostituito con la media dei due risultati della prova in doppio per la verifica della relazione (1).

Per i calcoli sia della ripetibilità, sia della relazione tra essa e la percentuale di effetto, possono essere utilizzati i fogli di calcolo 30 e 39 di cui alle Linee Guida di ARPA ER (2002).

In caso di mancato raggiungimento dei requisiti previsti, il personale viene prontamente informato della sospensione temporanea della qualifica, che verrà ripristinata solo dopo esito positivo di una prova straordinaria.

La frequenza delle prove da effettuare per il mantenimento della qualifica dipenderà, per ciascun saggio, dal numero di campioni analizzati annualmente e soprattutto dal loro più o meno regolare afflusso al laboratorio.

Tutte le prove dovrebbero essere effettuate almeno con frequenza annuale ed il loro esito riportato su apposito modulo, onde permettere una regolare valutazione in sede di riesame del sistema qualità.

Per ciò che concerne le carte di controllo si tenga presente che solitamente tutti i metodi normalizzati prevedono una apposita sezione contenente i dati di riproducibilità ottenuti da circuiti interlaboratorio.

Visto che per la realizzazione di una carta di controllo sono necessari almeno venti risultati con i quali procedere alla definizione degli indici caratteristici della carta stessa da utilizzare per la valutazione dei singoli risultati, fino a quando la carta di controllo non è pronta, ciascun valore di EC50 ottenuto sperimentalmente dovrà rientrare nel range $EC50 \pm 2 ds$, utilizzando i dati riportati sulla norma.

CAPITOLO 5: CONFRONTO DEL RISULTATO CON I LIMITI DI LEGGE O DI SPECIFICA

Il paragrafo 9.7 della Guida EURACHEM/CITAC CG 4:2012 ed il documento EURACHEM/CITAC Guide (2007) descrivono esplicitamente l'approccio da seguire quando si deve stabilire la conformità del risultato ottenuto rispetto a valori prestabiliti, ad esempio limiti disposti per legge o specifiche del protocollo metodologico seguito. Allo scopo si segnala anche il documento ILAC G8:03/2009 “Guidelines on the Reporting of Compliance with Specification”.

Spesso il limite specificato per legge è un valore numerico al quale non è associata una variabilità. Al contrario, i protocolli metodologici solitamente riportano un range minimo – massimo, ad esempio un intervallo fiduciale.

A meno che una regola decisionale specifica stabilisca diversamente, la misura è considerata conforme:

- nel caso di un limite numerico (superiore od inferiore) per il misurando considerato, compreso nel campo del misurando $\pm U$;
- nel caso sia specificato un intervallo minimo – massimo, se uno dei valori (minimo o massimo) del campo misurando $\pm U$ rientra nell'intervallo dato.

Il trattamento statistico da utilizzare per effettuare una analisi di conformità con i valori limite di legge è descritto nel volume ISPRA “*L'analisi di conformità con i valori limite di legge: il ruolo dell'incertezza associata a risultati di misura*” (2009), nelle guide EPA QA/G-4 e QA/G-9S (2006), nonché in Lisinger (2005; vedere box).

Confronto di un risultato con il valore certificato

Linsinger, T. 2005. Comparazione di un risultato di misurazione con il valore certificato. *European Reference Materials*, Application Note 1.

La differenza assoluta tra valore medio misurato C_m e valore certificato C_{CRM} è:

$$\Delta_m = |C_m - C_{CRM}|$$

L'incertezza u_Δ della differenza è:

$$u_\Delta = \sqrt{u_m^2 + u_{CRM}^2}$$

dove,

u_Δ = incertezza combinata del risultato e del valore certificato (= incertezza di Δ_m);

u_m = incertezza del risultato di misurazione;

u_{CRM} = incertezza del valore certificato.

L'incertezza estesa U_Δ della differenza, per un intervallo fiduciale di circa il 95 %, usa un fattore di copertura $k = 2$

$$U_\Delta = 2 u_\Delta$$

Se $\Delta_m \leq U_\Delta$ non sussiste differenza significativa tra risultato della misura e valore certificato.

Agli enti di controllo (ARPA) viene comunemente richiesta una dichiarazione di conformità ai limiti di legge dai committenti (Provincia, istituzioni pubbliche, forze dell'ordine, ecc.) ed in caso in cui non siano previsti, un parere tecnico.

Nel caso di acque reflue occorre fare riferimento al Decreto Legislativo n. 152/2006 e s.m.i.; un esempio di “Dichiarazione di conformità” è la seguente: *“Il campione, relativamente ai parametri ecotossicologici considerati, risulta conforme ai limiti definiti in Tab.3, All.5 del D.lgs. 152/2006.”* A cui fa seguito una nota tecnica che viene richiesta dal metodo UNI EN ISO 6341:2013 per la determinazione dell'inibizione della mobilità di *Daphnia magna* Straus ed indicazioni su alcuni procedimenti operativi applicati in laboratorio.

Ad esempio:

- Gli allevamenti di *Daphnia magna* provengono da dafnidi forniti dal laboratorio ARPA Lombardia (Pavia).
- Data nascita dafnidi: 07/11/04.
- Sensibilità al test con bicromato di potassio: 0.8 mg/l (r.a.0.6-2.1).
- Il test con *Pseudokirchneriella subcapitata* è stata effettuato su campione filtrato.
- La determinazione della tossicità con *Daphnia magna* EC50 è stata effettuata su campione congelato.
- Della data e dell'ora inizio analisi la ditta è stata informata come da verbale di prelievo.
- La ditta non ha presenziato all'inizio ed all'esecuzione delle analisi (art. 223 delle norme di attuazione del C.P.P.)”

Nel caso in cui il campione non sia conforme viene redatta una “DICHIARAZIONE DI NON CONFORMITÀ” per il parametro o i parametri che superano il limite di legge. In questo caso è opportuno associare il valore dell'incertezza al parametro analizzato. Pertanto, la NOTA TECNICA, oltre alle indicazioni sopracitate, dovrà contenere anche il riferimento di come è stata calcolata l'incertezza del misurando.

Ad esempio:

DICHIARAZIONE DI NON CONFORMITÀ:

*“Relativamente alle determinazioni ecotossicologiche effettuate il campione risulta non conforme a quanto previsto dal D.Lgs. 152/2006 Parte III, All. 5, Tab. 3 “Scarichi in acque superficiali”, per il saggio di tossicità con *Pseudokirchneriella subcapitata*.”*

NOTA TECNICA

La stima dell'incertezza è stata effettuata secondo quanto descritto nei relativi protocolli di validazione. Per il calcolo dell'incertezza di misura è stato utilizzato lo scarto tipo di riproducibilità pool uguale a 8,40 con un fattore di copertura pari a 3,18 per il parametro I% e 6,61 con un fattore di copertura pari a 2,20 per il parametro EC50 con un livello di confidenza del 95%.

*Il test con *Pseudokirchneriella subcapitata* è stata effettuato su campione filtrato.*

*Gli allevamenti di *Daphnia magna* provengono da dafnidi forniti dal laboratorio ARPA Lombardia (Pavia).*

Data nascita dafnidi: 07/11/04

Sensibilità al test con bicromato di potassio: 0,8 mg/l (r.a.0,6-2,1).

Della data e dell'ora inizio analisi la ditta è stata informata come da verbale di prelievo.

La ditta non ha presenziato all'inizio ed all'esecuzione delle analisi (art. 223 delle norme di attuazione del C.P.P.)

Viene invece inserito un parere tecnico di tossicità o non tossicità laddove non esista un riferimento legislativo con le relative note tecniche.

CAPITOLO 6: CONCLUSIONI

Il presente volume rappresenta il frutto di una esperienza non conclusiva che raccoglie le esperienze di diversi gruppi di lavoro afferenti al mondo degli enti pubblici, della ricerca e del privato, volutamente sbilanciata verso gli aspetti tecnico/scientifici, quale presupposto essenziale per intraprendere anche il percorso della regolamentazione normativa.

In tal senso, la implementazione della UNICEI EN ISO/IEC 17025:2005 ha una rilevanza notevole sulla qualità del dato analitico, poiché specifica i requisiti generali che un laboratorio di prova deve soddisfare per dimostrare che attua un sistema di gestione qualità ed è quindi competente nel produrre risultati tecnicamente validi perché può dimostrare la riferibilità delle misure, documenti di validazione dei metodi accreditati e l'incertezza associata per ogni prova e/o taratura.

L'attuazione di un sistema di gestione qualità, pertanto, diviene condizione necessaria, soprattutto nel caso in cui i dati prodotti possano determinare scelte strategiche in situazioni critiche.

Dal punto di vista degli Enti di Ricerca, che prevedono tra le attività istituzionali anche lo sviluppo di metodologie innovative, quali appunto nuovi biosaggi, da proporre per un potenziale utilizzo su larga scala come innovazione frutto della ricerca pubblica, la maggiore difficoltà riscontrata è, come esposto nel capitolo 3, la mancanza di un percorso di riconoscimento dedicato alla fase di ricerca e sviluppo delle nuove metodologie e, di conseguenza, “l’obbligo” di seguire le stesse modalità di accreditamento previste per i soggetti che intendono semplicemente eseguire le metodologie sviluppate secondo le regole di mercato (servizi a pagamento). Tale assenza limita lo sviluppo di nuove metodologie, in quanto gli Enti Pubblici di Ricerca, non avendo un effettivo ritorno economico, hanno difficoltà a sostenere i costi economiche e di personale necessarie ad intraprendere l’attuale percorso di certificazione e accreditamento. Per questo motivo si sottolinea l’importanza di valutare e definire specifiche modalità di abilitazione/riconoscimento per il percorso di ricerca e sviluppo dei saggi ecotossicologici, stabilendo requisiti specifici per gli enti di ricerca che vogliono dedicarsi a tale attività e sviluppando un percorso di “certificazione/accreditamento” differente e dedicato.

Si sottolinea che il presente manuale è da considerarsi un primo strumento per la definizione di un percorso di accreditamento delle prove ecotossicologiche, in particolare per la conduzione di saggi ecotossicologici, ed è aperto ai contributi della comunità scientifica nazionale e soprattutto delle Agenzie nazionali per la Protezione dell’Ambiente, nonché di tutti i laboratori pubblici e privati.

In questo senso, si invitano tutti i potenziali fruitori a contribuire alla sua diffusione, aumentandone la visibilità all’interno dei propri siti web. L’obiettivo è quello di stimolare un percorso di revisione largamente condiviso e trasparente, che possa permettere un aggiornamento del manuale in grado di recepire gli apporti migliorativi che la comunità scientifica e tutti gli utilizzatori vorranno proporre. Si raccomanda quindi di inviare suggerimenti e modifiche che rispecchino il taglio, i contenuti e la strategia del presente manuale all’indirizzo e-mail ecotossicologia@isprambiente.it, segnalando come oggetto: “osservazioni al manuale ISPRA n. 121/15”.

BIBLIOGRAFIA

ACCREDIA DT-0002 Rev.1 . Guida per la valutazione e la espressione dell'incertezza nelle misurazioni.

Accredia DT-0002/6 Rev. 0. Guida al calcolo della ripetibilità di un metodo di prova ed alla sua verifica nel tempo.

ACCREDIA RT-08 Rev. 02. Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori di prova.

ACCREDIA RT-23 Rev 3 Prescrizioni per la definizione del campo di Accreditamento

ACCREDIA RT-24 Rev 1 Prove valutative

ACCREDIA RT-27 Rev 0. Prescrizioni per l'accreditamento degli organizzatori delle prove valutative interlaboratorio.

ARPA Emilia Romagna, 2002. Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura (a cura di Helga Tenaglia, Emanuela Venturini, Raffaella Raffaelli), ARPA Emilia Romagna, 2002.

CEN Guide 13: 2008. Validation of environmental test methods..

Desimoni E. e Brunetti E., 2004. Assicurazione di qualità nel laboratorio chimico. Validazione dei metodi di analisi (Elio Desimoni e Barbara Brunetti - CLUEB, 2004) (www.clueb.com).

EA-4/16 Rev. 0 EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing.

EA-4/18 rev.0 . Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation.

EPA QA/G-4. EPA/240/B-06/001 2006 Guidance on Systematic Planning Using the Data Quality Objectives Process.

EPA QA/G-9S. EPA/240/B-06/003 2006 Data Quality Assessment: Statistical Methods for Practitioners..

Eurachem Guide AML 2013 Accreditation for Microbiological Laboratories

EURACHEM/CITAC CG 4:2012 (third edition). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edition, (2012). S L R Ellison and A Williams (Eds). (Eurachem/CITAC guide ISBN 978-0-948926-30-3).

EURACHEM/CITAC Guide, 2007 (First edition). Use of uncertainty information in compliance assessment.

ILAC G8:03/2009 “Guidelines on the Reporting of Compliance with Specification”

ISO 11348-3:2007. Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria.

ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons.

ISO 16712:2005. Water quality -- Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods.

ISO 16820:2004. Sensory analysis -- Methodology -- Sequential analysis.

ISO 3534-2:2006. Statistics -- Vocabulary and symbols -- Part 2: Applied statistics

ISO 5667-14:1998. Water quality -- Sampling -- Part 14: Guidance on quality assurance of environmental water sampling and handling.

ISO 5667-16:1998. Water quality -- Sampling - Part 16: Guidance on biotesting of samples.

ISO 5725-1/Cor 1:1998. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions.

ISO 5725-6/Cor 1: 2001. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values.

ISO 6107-2:2006. Water quality -- Vocabulary.

ISO 6107-3:1993/Amd 1:2001. Water quality – Vocabulary.

ISO 6341:2012. Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test.

ISO 7870-1:2014 Control charts - General guide and introduction.

ISO 7870-2:2013. Control charts -- Part 2: Shewhart control charts.

ISO 7870-3:2012. Control charts -- Part 3: Acceptance control charts.

ISO 7870-4:2011. Control charts -- Part 4: Cumulative sum charts.

ISO 7870-5:2014. Control charts -- Part 5: Specialized control charts.

ISO 8692:2012. Water quality -- Fresh-water algal growth inhibition test with unicellular green algae.

ISO/TS 13530:2009. Water quality -- Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis.

ISO/TS 19036:2006/Amd 1: 2009. Measurement uncertainty for low counts.

ISO/TS 20281:2006. Water quality -- Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data.

ISPRA, 2009. L'analisi di conformità con i valori limite di legge: il ruolo dell'incertezza associata a risultati di misura. A cura di G. Sartori, R. Mufato, D. Argentini, P. Vannini, P. Ammazzalorso, B. Griselli, B.P. Andreini, M. Belli, M.G. Simeone. ISPRA, Manuali e linee guida 52/2009.

Lisinger T., 2005. Application Note 1–Comparison of a measurement result with the certified value. ERM European Reference Materials.

Regolamento (CE) n. 765/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 9 luglio 2008. Norme in materia di accreditamento e vigilanza del mercato per quanto riguarda la commercializzazione dei prodotti e che abroga il regolamento (CEE) n. 339/93.

Thursby G.B., Heltshe J., Scott K.J., 1997. Revised approach to toxicity test acceptability criteria using a statistical performance assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1322-1329.

UNI CEI EN ISO/IEC 17011:2004. Conformity assessment -- General requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005/Cor 1:2006. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010. Conformity assessment -- General requirements for proficiency testing.

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

UNI EN 16101:2012. Water quality -- Guidance standard on interlaboratory comparison studies for ecological assessment.

UNI EN ISO 16712:2007. Qualità dell'acqua -- Water Quality - Determination Of Acute Toxicity Of Marine Or Estuarine Sediment To Amphipods.

UNI EN ISO 6341:2012. Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Prova di tossicità acuta

UNI EN ISO 9000:2005. Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary.

UNI EN ISO 9001:2008. Quality management systems – Requirements.

UNI ENV ISO 13843:2003 Guida per la validazione di metodi microbiologici

UNI ENV ISO 13843:2003. Qualità dell'acqua -- Guida per la validazione di metodi microbiologici.

UNI ISO 5725-2:2004. Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione - Parte 2: Metodo base per determinare la ripetibilità e la riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato.

UNICHIM, 1999. Linee guida per la validazione di metodi analitici nei laboratori chimici. Criteri generali. Manuale UNICHIM N. 179/0 (Milano, 1999).

UNICHIM, 2001. Linee guida per la validazione di metodi analitici nei laboratori chimici - Valutazione della precisione (ripetibilità stretta) di un metodo analitico eseguito in un unico laboratorio da un solo operatore su di un unico strumento in un breve intervallo di tempo. UNICHIM 179/1:2011.

