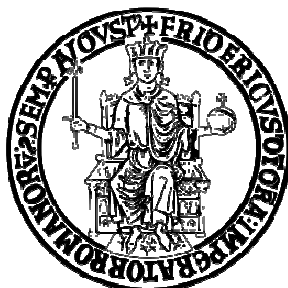


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Sanità Pubblica

DOTTORATO DI RICERCA IN SANITÀ PUBBLICA E MEDICINA PREVENTIVA

XXIX CICLO

TESI DI DOTTORATO

**Punti innovativi e criticità a garanzia del dato analitico
nell'applicazione sperimentale della norma**

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 ad un laboratorio di analisi

**CANDIDATO
DOTT. SALVATORE POLICHETTI**

**TUTOR
PROF. PAOLO MONTUORI**

**COORDINATORE
PROF. STEFANIA MONTAGNANI**

ANNO ACCADEMICO 2015-2016

INDICE

CAPITOLO 1	1
Introduzione	1
1.1 <i>L'Unione europea: aspetti normativi per l'accreditamento</i>	2
1.2 <i>Recepimento del Regolamento (CE) N. 765/2008 in Italia</i>	5
1.3 <i>La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005</i>	11
CAPITOLO 2 – Obiettivi	21
2.1 <i>Obiettivi generali</i>	21
2.2 <i>Obiettivi specifici</i>	22
CAPITOLO 3 - Materiali e metodi	23
3.1 <i>Applicazione metodi</i>	23
3.2 <i>Materiali di riferimento certificati (CRM) e non certificati (MR)</i>	25
3.2.1 <i>Metodo sperimentale nella gestione dei CRM E MR</i>	26
3.3 <i>Operatore</i>	27
3.3.1 <i>Abilitazione e convalida dell'Operatore all'esecuzione di prove</i>	29
3.4 <i>Rappresentatività del campione, conservazione del campione, interferenze dovute all'ambiente di lavoro</i>	30
3.5 <i>Validazione iniziale e conferma dei dati riportati nel metodo, controlli di qualità e controlli periodici</i>	31
3.5.1 <i>Validazione iniziale e conferma dei dati riportati nel metodo</i>	31
3.5.2 <i>Controlli di qualità e assicurazione di qualità</i>	34
3.5.2.1 <i>Controlli di qualità</i>	34

3.5.2.2	<i>Assicurazione di qualità</i>	35
3.6	<i>Conferma metrologica, taratura e manutenzione strumentale</i>	36
3.6.1	<i>Conferma metrologica</i>	36
3.6.2	<i>Taratura</i>	36
3.6.2.1	<i>Taratura Bilance</i>	36
3.6.2.2	<i>Taratura strumentale Ganimede N</i>	36
3.6.3	<i>Manutenzione strumentale</i>	37
3.6.4	<i>Stima dell'incertezza</i>	37
 CAPITOLO 4 - Risultati e Discussione		41
4.1	<i>Risultati</i>	41
4.1.1	<i>Materiale di riferimento</i>	41
4.1.2	<i>Abilitazione e convalida dell'Operatore all'esecuzione di prove</i>	43
4.1.3	<i>Validazione iniziale e conferma dei dati riportati nel metodo, controlli di qualità e controlli periodici</i>	45
4.1.4	<i>Assicurazione di Qualità</i>	46
4.1.5	<i>Stima dell'incertezza</i>	47
4.2	<i>Discussione</i>	48
 CAPITOLO 5 – Conclusioni		51
5.1	<i>Punti innovativi nell'applicazione della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025</i>	51
5.2	<i>Criticità nell'applicazione della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025</i>	51
5.3	<i>Conclusioni finali</i>	52
 Bibliografia		54

CAPITOLO 1

Introduzione

Nell'Unione Europea vengono prodotti giornalmente alcuni milioni di dati, tramite misure di carattere chimico e chimico fisico. Secondo uno studio del British Laboratory of the Government's Chemist, per il 20% questi dati non sono adatti allo scopo per il quale sono stati prodotti. Secondo la stessa fonte, il danno economico che ne consegue per l'Unione Europea è di 15 miliardi di euro all'anno [1]. Numerose sono le sorgenti di incertezza presenti nelle varie fasi della catena analitica, ciò comporta seri rischi che la qualità di un dato analitico possa essere inficiata ad un livello tale da renderla inadeguata al soddisfacimento dei bisogni o delle aspettative, implicite o esplicite, degli utilizzatori del dato stesso. Se consideriamo che molte decisioni in campo ambientale e sanitario vengono prese sulla base di dati analitici, è evidente la necessità che i dati stessi siano in possesso di una qualità adeguata.

Pertanto, il solo giudizio di conformità di un prodotto rispetto a dei limiti normativi non è sufficiente. Di conseguenza, è opportuno verificare che il laboratorio che ha rilasciato il dato analitico sia competente e lavori in conformità a dei requisiti specifici, ma soprattutto sia in grado di difendere i propri risultati analitici.

In questo contesto è incentrata la tesi del dottorato di ricerca in Sanità Pubblica e medicina preventiva. Pertanto escludendo i requisiti gestionali sui quali esistono una vastità di pubblicazioni sulla norma UNI EN ISO 9001 [2] a cui ricorrere per chiarirsi le idee, è necessario soffermarsi sui requisiti tecnici che un laboratorio deve possedere al fine di aumentare le proprie performance per garantire il dato analitico prodotto.

1.1 L'Unione europea: aspetti normativi per l'accreditamento

Il Parlamento Europeo e il Consiglio dell'Unione Europea, in data 9 luglio 2008 hanno emanato il Regolamento (CE) N. 765/2008 [3] che normalizza l'accreditamento e la vigilanza del mercato per quanto riguarda la commercializzazione dei prodotti e che abroga il Regolamento (CEE) N. 339/93 [4].

Il 13 agosto 2008, il Regolamento (CE) n. 765/2008 è stato pubblicato nella Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea. Il provvedimento è complementare alla Decisione 768/2008 [5], che definisce un quadro comune per la commercializzazione dei prodotti, e costituisce un pacchetto legislativo insieme al Regolamento 764 [6] in tema di procedure per l'applicazione di regole tecniche nazionali a prodotti commercializzati in altri Stati membri.

Il Regolamento (CE) N. 765/2008 dà delle risposte ad alcuni problemi presenti in ambito dell'Unione Europea e non ancora risolti, come:

- assicurare che i prodotti che beneficiano della libera circolazione 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;
- prevedere norme sull'accreditamento, la vigilanza del mercato, i controlli dei prodotti provenienti da paesi terzi e la marcatura CE;
- stabilire un quadro complessivo di regole e principi in materia di accreditamento e di vigilanza del mercato. Tale quadro non dovrebbe incidere sulle norme sostanziali della legislazione esistente che fissa le disposizioni da osservare ai fini della protezione degli interessi pubblici come la sanità, la sicurezza e la

protezione dei consumatori e dell'ambiente, ma dovrebbe mirare a migliorarne il funzionamento.

IL Regolamento (CE) N. 765/2008 stabilisce quale strada devono intraprendere gli stati dell'Unione Europea al fine di uniformare e armonizzare il processo di Accreditazione. L'accredimento fa parte di un sistema globale, che comprende la valutazione della conformità e la vigilanza del mercato, concepito al fine di valutare e garantire la conformità delle norme applicabili.

L'accredimento, pur non essendo stato disciplinato fino al 2008 a livello comunitario, è stato effettuato in tutti gli Stati membri. La mancanza di regole comuni per tale attività ha fatto sì che nella Comunità venissero adottati metodi e sistemi differenti, sicché il rigore applicato nell'esecuzione dell'accredimento varia da uno Stato membro all'altro. È dunque necessario elaborare un quadro generale per l'accredimento e stabilire a livello comunitario i principi per la sua gestione e organizzazione.

Un sistema di accreditamento, che funzioni con riferimento a regole vincolanti, aiuta ad accrescere la fiducia reciproca tra gli Stati membri relativamente alla competenza degli organismi di valutazione della conformità e, conseguentemente, alla validità dei certificati e dei rapporti di prova da questi rilasciati. In tal modo, rafforza il principio del riconoscimento reciproco e, pertanto, le disposizioni del Regolamento (CE) N. 765/2008 sull'accredimento si applicano agli organismi che effettuano la valutazione della conformità sia nel settore regolato che nel settore non regolato, poiché si tratta di garantire la qualità dei certificati e dei rapporti di prova indipendentemente dal fatto che rientrino nell'uno o nell'altro settore.

Poiché lo scopo dell'accredimento è attestare in modo autorevole la competenza di un organismo ad eseguire attività di valutazione della conformità, gli Stati membri non devono mantenere più di un organismo nazionale di accreditamento e devono garantire

che tale organismo sia organizzato in modo da salvaguardare l'obiettività e l'imparzialità delle sue attività. Tali organismi nazionali di accreditamento devono operare indipendentemente da attività commerciali di valutazione della conformità.

Nei casi in cui, dal punto di vista economico, per uno Stato membro l'istituzione di un organismo nazionale di accreditamento non abbia senso o non sia sostenibile, tale Stato membro dovrebbe ricorrere all'organismo nazionale di accreditamento di un altro Stato membro e dovrebbe essere incoraggiato a ricorrervi nella massima misura possibile.

Per assicurare l'equivalenza del livello di competenza degli organismi di valutazione della conformità, per facilitare il riconoscimento reciproco e per promuovere l'accettazione generale dei certificati di accreditamento e delle valutazioni di conformità effettuate dagli organismi accreditati, occorre che gli organismi nazionali di accreditamento usino un sistema di valutazione *inter pares* rigoroso e trasparente e si sottopongano regolarmente a tale valutazione.

Il Regolamento (CE) N. 765/2008 prevede il riconoscimento di una singola organizzazione a livello europeo per quanto riguarda alcune funzioni nel settore dell'accreditamento.

La cooperazione europea per l'accreditamento (di seguito chiamata EA), ha il compito di valutare la competenza degli organismi di valutazione della conformità in tutta Europa, attraverso un sistema trasparente e fondato sulla qualità. L'EA gestisce un sistema di valutazione *inter pares* fra gli organismi nazionali di accreditamento degli Stati membri e di altri paesi europei. Tale sistema ha dimostrato di essere efficiente e di incoraggiare la fiducia reciproca. Pertanto, l'EA è il primo organo riconosciuto a norma del Regolamento (CE) N. 765/2008 e gli Stati membri dovrebbero assicurarsi che i loro organismi nazionali di accreditamento aderiscano all'EA per tutto il tempo in cui essa sarà riconosciuta come tale.

1.2 Recepimento del Regolamento (CE) N. 765/2008 in Italia

Il 26 Gennaio 2010 viene pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana serie generale - n. 20 il Decreto 22 Dicembre 2009 dove Accredia viene designato come l'Ente unico nazionale di accreditamento in Italia [7], nato come Associazione riconosciuta, senza scopo di lucro dalla fusione di SINAL (Sistema Nazionale per l'Accreditamento di Laboratori) e SINCERT (Sistema Nazionale per l'Accreditamento degli Organismi di Certificazione e Ispezione) e con il contributo dell'Istituto Nazionale di ricerca metrologica (INRIM), del Servizio di taratura in Italia (SIT), dall'Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA) e dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

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, di ispezione, i laboratori di prova, i laboratori per la sicurezza alimentare, e quelli di taratura abbiano le competenze per valutare la conformità dei prodotti, dei processi e dei sistemi rispetto agli standard di riferimento [7].

Accredia opera sotto la vigilanza del Ministero dello Sviluppo Economico e svolge un servizio di pubblica autorità, in quanto l'accREDITamento è un servizio svolto nell'interesse pubblico ed un efficace strumento di qualificazione dei prodotti e servizi che circolano su tutti i mercati [7].

Con Accredia l'Italia si è adeguata al Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio n. 765 del 9 luglio 2008, che dal 1° gennaio 2010 è applicato per l'accREDITamento e la vigilanza del mercato in tutti i Paesi UE.

Ogni Paese europeo ha il suo Ente di accREDITamento. L'Ente Nazionale è responsabile per l'accREDITamento in conformità agli standard internazionali della serie ISO 17000 e

alle guide e alla serie armonizzata delle norme europee EN 45000. Tutti gli Enti operano senza fini di lucro.

Accredia valuta la competenza, l'indipendenza e l'imparzialità degli operatori di valutazione della conformità (Laboratori e Organismi), accertandone la conformità a regole obbligatorie e norme volontarie, per assicurare il valore e la credibilità delle certificazioni, ispezioni, prove e tarature.

Le attività dell'Ente si articolano in tre Dipartimenti:

- Certificazione e ispezione;
- Laboratori di prova;
- Laboratori di taratura.

L'accreditamento è un servizio svolto nell'interesse pubblico perché gli utenti business e i consumatori finali, ma anche la Pubblica Amministrazione quando ricorre a fornitori esterni, possano fidarsi, fino all'ultimo anello della catena produttiva e distributiva, della qualità e sicurezza dei beni e dei servizi che circolano su un mercato sempre più globalizzato.

La fiducia reciproca tra il produttore e l'acquirente di un bene, tra il fornitore e l'utente di un servizio è una conquista per il funzionamento efficiente del mercato, o meglio dei mercati contemporanei, sul piano sia pubblico che privato, in ambito nazionale e internazionale.

L'accreditamento garantisce che i rapporti di prova e di ispezione e le certificazioni (di sistema, prodotto e personale) che riportano il marchio Accredia siano rilasciate nel rispetto dei più stringenti requisiti internazionali in materia di valutazione della conformità, e dietro una costante e rigorosa azione di sorveglianza sul comportamento degli operatori responsabili (Laboratori e Organismi) [7].

Accredia è membro a pieno titolo di EA, e come tale è sottoposto al controllo del suo operato attraverso uno specifico e accurato processo di valutazione [8].

L'EA è composta da 36 membri effettivi a pieno titolo e 13 membri associati [9].

Nella tabella 1.1 sono riportati gli stati membri EA a pieno titolo con i relativi nominativi degli enti [9].

Tabella 1.1: Stati membri EA

Membri EA a pieno titolo	Nome dell'ente
Albania	DPA Directorate of Accreditation
Austria	AA Akkreditierung Austria
Belgium	BELAC Belgian Accreditation Council
Bulgaria	BAS Executive Agency Bulgarian Accreditation Service"
Cyprus	CYS-CYSAB Cyprus Organization for the Promotion of Quality
Czech Republic	CAI Czech Accreditation Institute
Denmark	DANAK Danish Accreditation
Estonia	EAK Estonian Accreditation Centre
Finland	FINAS Finnish Accreditation Service
France	COFRAC Comité français d'accréditation
Germany	DAkkS Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH
Greece	ESYD Hellenic Accreditation System
Hungary	NAH National Accreditation Authority
Iceland	ISAC Icelandic Board for Technical Accreditation
Ireland	INAB Irish National Accreditation Board
Italy	ACCREDIA Ente Italiano di Accreditamento
Latvia	LATAK Latvian National Accreditation Bureau
Lithuania	LA Lithuanian National Accreditation Bureau
Luxemburg	OLAS Office Luxembourgeois d'Accreditation et de Surveillance
Malta	NAB-Malta National Accreditation Board
Montenegro	ATCG Accreditation Body of Montenegro
Norway	NA Norsk akkreditering
Poland	PCA Polskie Centrum Akredytacji
Portugal	IPAC Instituto Português de Acreditação, I.P.
Republic Of Croatia	HAA Croatian Accreditation Agency
Romania	RENAR Romanian Association for Accreditation
Serbia	ATS Accreditation Body of Serbia
Slovakia	SNAS Slovak National Accreditation Service
Slovenia	SA Slovenska akreditacija
Spain	ENAC Entidad Nacional de Acreditación
Sweden	SWEDAC Swedish Board for Accreditation and Conformity Assessment
Switzerland	SAS Swiss Accreditation Service
The Former Yugoslav Republic Of Macedonia	IARM The Accreditation Institute of the former Yugoslav Republic of Macedonia
The Netherlands	RVA Raad voor Accreditatie
Turkey	TURKAK Turkish Accreditation Agency
United Kingdom	UKAS United Kingdom Accreditation Service

Nella tabella 1.2 sono riportati gli stati associati all'EA.

Tabella 1.2: Stati associati all'EA

Membri associati all'EA	Nome dell'ente
Algeria	ALGERAC Organisme algérien d'accréditation
Belarus	BSCA Belarusian State Centre for Accreditation
Bosnia & Herzegovina	BATA (BLA) Institute for Accreditation of Bosnia and Herzegovina
Egypt	EGAC Egyptian Accreditation Council
Georgia	GAC Unified National Body on Accreditation - Accreditation Centre
Israël	ISRAC (BLA) Israel Laboratory Accreditation Authority
Jordan	JAS-AU Jordan Accreditation & Standardization Systems – Accreditation Unit
Kosovo Under The Unsc Resolution 1244/1999	DAK Accreditation Directorate of Kosovo under the UNSC Resolution 1244/1999
Morocco	SEMAC Moroccan Accreditation Service
Republic Of Moldova	MOLDAC (former CAECP) National Center of Accreditation of the republic of Moldova
Tunisia	TUNAC (BLA) Tunisian Accreditation Council
Ukraine	NAAU (BLA) National Accreditation Agency of Ukraine
Armenia	ARMNAB Armeniam National Accreditation Body

In EA è stato firmato un accordo multilaterale (di seguito EA-MLA) tra i membri di EA, per cui i firmatari riconoscono e accettano (mutuo riconoscimento) l'equivalenza dei sistemi di accreditamento operati dai membri, l'affidabilità dei risultati forniti da organismi di valutazione della conformità accreditati dai membri firmatari.

Il marchio di un firmatario EA MLA su certificati e rapporti di prova rilasciati rappresenta un "passaporto per il commercio". La fiducia che questo accreditamento porta, elimina la necessità per i fornitori di essere certificati in ogni paese in cui vendono i loro prodotti o servizi e quindi fornisce il quadro for goods e servizi per attraversare le frontiere in Europa e in tutto il mondo [10].

Nella tabella 1.3 sono riportati gli schemi di accreditamento e le relative norme di riferimento che la EA MLA comprende [11].

Tabella 1.3: Schemi di accreditamento e norme di riferimento

Schema di accreditamento	Norma di accreditamento
Laboratori di prova	ISO/IEC 17025 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura”
Laboratori medici	ISO 15189 “Laboratori medici – Requisiti riguardanti la qualità e la competenza”
Laboratori di taratura	ISO/IEC 17025 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura”
Organismi di certificazione di prodotto	ISO/IEC 17065 “Valutazione della conformità - Requisiti per gli organismi di certificazione di prodotti, processi e servizi”
Organismi di certificazione del personale	ISO/IEC 17024 “Valutazione della conformità - Requisiti generali per gli organismi di certificazione delle persone che operano”
Organismi di certificazione di sistemi di gestione per la qualità e ambientale	ISO/IEC 17021” Valutazione della conformità - Requisiti per gli organismi che forniscono audit e certificazione di sistemi di gestione”
Organismi di ispezione	ISO/IEC 17020 “Valutazione della conformità - Requisiti per il funzionamento dei vari tipi di organismi che eseguono ispezioni “
Organismi di verifica	EN/ISO 14065 “Gas a effetto serra - Requisiti per gli organismi di validazione e verifica dei gas ad effetto serra per l'utilizzo nell'accREDITAMENTO o in altre forme di riconoscimento”

Nella tabella 1.4 sono riportati gli stati firmatari EA MLA per i diversi schemi di accreditamento [12].

Tabella 1.4: Stati firmatari EA MLA

Stato	Firmatario EA MLA per i seguenti schemi di accreditamento						
	Testing	Calibration	Product certification	Certification of persons	Management systems certification	Inspection	Verification
Albania	X						
Austria	X	X	X	X	X	X	X
Belgium	X	X	X	X	X	X	X
Bosnia & Herzegovina	X	X				X	
Bulgaria	X	X	X	X	X	X	X
Cyprus	X	X				X	
Czech Republic	X	X	X	X	X	X	X
Denmark	X	X	X	X	X	X	X
Estonia	X	X	X	X	X	X	X
Finland	X	X	X	X	X	X	X
France	X	X	X	X	X	X	X
Germany	X	X	X	X	X	X	X
Greece	X	X	X	X	X	X	X
Ireland	X	X	X		X	X	X
Israël	X	X				X	
Italy	X	X	X	X	X	X	X
Latvia	X	X	X	X	X	X	X
Lithuania	X	X	X	X	X	X	
Luxemburg	X	X	X		X	X	
Malta	X	X				X	
Norway	X	X	X	X	X	X	X
Poland	X	X	X	X	X	X	X
Portugal	X	X	X	X	X	X	X
Republic Of Croatia	X	X	X	X	X	X	X
Romania	X	X	X	X	X	X	X
Serbia	X	X	X	X	X	X	
Slovakia	X	X	X	X	X	X	X
Slovenia	X	X	X	X	X	X	X
Spain	X	X	X	X	X	X	X
Sweden	X	X	X	X	X	X	X

Switzerland	X	X	X	X	X	X	
The Former Yugoslav Republic Of Macedonia	X	X	X			X	
The Netherlands	X	X	X	X	X	X	X
Tunisia	X	X			X	X	
Turkey	X	X	X	X	X	X	
United Kingdom	X	X	X	X	X	X	X
Ukraine	X	X	X	X	X	X	

L'accordo multilaterale di mutuo riconoscimento EA MLA è riconosciuto a livello internazionale dall'ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperazione) e dall'IAF (International Accreditation Forum). Ciò significa che un rapporto di prova o un certificato accreditato da un firmatario EA MLA è riconosciuto anche dai firmatari degli accordi multilaterali IAF e ILAC. In questo modo, l'EA MLA agisce come un passaporto internazionale al commercio [13].

L'ILAC è l'organizzazione internazionale per gli organismi di accreditamento che operano in conformità con ISO/IEC 17011 [14] e coinvolti nell'accREDITAMENTO degli organismi di valutazione della conformità tra cui laboratori di taratura (con ISO/IEC 17025), laboratori di prova (con ISO/IEC 17025), laboratori di prova medica (utilizzando ISO 15189) [15] e gli organismi di controllo (usando ISO/IEC 17020) [16]. Gli accordi internazionali sono gestiti dall'ILAC nei settori delle tarature, delle prove, dei test medici e dell'accREDITAMENTO di ispezione, mentre dall'IAF nel campo dei sistemi di gestione, dei prodotti, dei servizi, del personale e da altri programmi simili di valutazione della conformità. Entrambe le organizzazioni, ILAC e IAF, lavorano insieme per coordinare i loro sforzi al fine di migliorare l'accREDITAMENTO e la valutazione della conformità in tutto il mondo.

Gli accordi regionali sono gestiti dagli organismi di cooperazione regionali riconosciute che lavorano in armonia con ILAC e IAF. Gli organismi regionali di cooperazione coinvolti nel riconoscimento sono: EA in Europa, APLAC nella regione Asia-Pacifico,

IAAC nelle Americhe, AFRAC in Africa, SADCA in Sud Africa, e ARAC nella regione araba [17].

Lo scopo principale dell'ILAC è di stabilire un accordo internazionale tra gli organismi di accreditamento membri, sulla base di valutazione *inter pares* e accettazione reciproca. Oltre 90 organismi di accreditamento da oltre 80 economie hanno firmato l'accordo ILAC reciproco riconoscimento (ILAC MRA). Gli organismi di accreditamento firmatari del ILAC MRA sono stati sottoposti ad una valutazione della conformità alla norma ISO/IEC 17011 per dimostrare la loro competenza [18].

1.3 La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005

La prima edizione della norma internazionale 17025 fu elaborata sulla base di una considerevole esperienza acquisita nell'attuazione della Guida ISO/IEC 25 e della EN 45001, entrambe da essa sostituite. La norma conteneva tutti i requisiti che devono essere soddisfatti dai laboratori di prova e di taratura per dimostrare che attuano un sistema di gestione e sono tecnicamente competenti e capaci di produrre risultati tecnicamente validi.

La prima edizione si riferiva alla ISO 9001:1994 ed alla ISO 9002:1994. Queste norme sono state sostituite dalla ISO 9001:2000, che ha reso necessario un allineamento della ISO/IEC 17025. Nell'edizione del 2005 sono stati modificati o aggiunti punti soltanto quando ritenuto necessario alla luce della ISO 9001:2000.

La conformità del sistema di gestione per la qualità, all'interno del quale opera il laboratorio in accordo ai requisiti della ISO 9001, non costituisce da sé prova della competenza del laboratorio a produrre dati e risultati tecnicamente validi. La conformità dimostrata alla norma 17025 non implica la conformità del sistema di gestione per la qualità attuato dal laboratorio a tutti i requisiti della ISO 9001 [19].

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 è entrata a far parte del corpo normativo nazionale il 26 Settembre 2005 e sostituisce la EN ISO/IEC 17025:2000. È uno standard comprensivo di requisiti gestionali e tecnici, impiegato in tutto il mondo per conseguire l'accreditamento dei laboratori di prova e taratura da parte dell'organismo nazionale Accredia.

Il termine "accreditamento" viene utilizzato al posto di quello più noto di "certificazione" in quanto nel contesto del Sistema nazionale per la Qualità i laboratori di prova e taratura vengono classificati come Operatori specializzati nella valutazione della conformità, qualificati a svolgere prove e tarature in cui vengono garantite l'adeguatezza ed accuratezza delle misure che vengono eseguite grazie all'impiego di strumentazione "tarata".

A differenza della certificazione che viene conseguita rispettando i requisiti della norma UNI EN ISO 9001 e che viene riferita al sistema di qualità implementato da una qualsiasi azienda per fornire prodotti o servizi che soddisfino le richieste del cliente, l'accreditamento viene conseguito per ogni prova o taratura a seguito del superamento di una visita ispettiva da parte dell'organismo competente, in cui viene verificato che siano stati soddisfatti i requisiti della norma.

Pertanto un laboratorio che vanta l'accreditamento da parte di Accredia non ha acquisito automaticamente tale riconoscimento per tutte le prove o tarature che offre, ma solo per quelle per cui ne ha fatto richiesta e superato la visita ispettiva.

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 al capitolo quattro descrive i requisiti gestionali che un laboratorio di prove e tarature deve avere, mentre nel capitolo cinque sono descritti i requisiti tecnici che il laboratorio di prove e tarature deve possedere per l'ottenimento dell'accreditamento.

In questo paragrafo, saranno presi in esame i requisiti tecnici. Infatti lo scopo del presente lavoro di tesi di dottorato, così come riportato negli obiettivi, è incentrato sui requisiti tecnici della norma che sono:

a) Il personale del laboratorio

La competenza di tutto il personale tecnico che effettua le prove, utilizza le apparecchiature, valuta i risultati e firma i rapporti di prova deve essere garantita e certificata dalla direzione del laboratorio.

I direttori di laboratorio, i tecnici e il personale di supporto coinvolto in qualsiasi ruolo nell'attività di prova e/o taratura devono essere qualificati secondo il titolo di studio, l'esperienza accertata e l'addestramento interno o esterno, e di ciascuno è necessario mantenere aggiornato il mansionario.

Infine il laboratorio deve avvalersi di personale dipendente, o con un rapporto regolato da contratto [19].

b) L'ambiente di laboratorio

È richiesto che tutte le attrezzature del laboratorio, così come le condizioni di illuminazione e dell'ambiente di lavoro, forniscano un adeguato supporto alla corretta esecuzione delle prove e/o delle tarature.

Per questo è importante verificare la rispondenza dei parametri ambientali ai requisiti riportati nei metodi di prova e/o nei manuali delle apparecchiature.

Il laboratorio deve mantenere sotto controllo, attraverso un attento monitoraggio, le condizioni ambientali presenti durante le attività di prova per accertare che queste non influenzino la qualità dei risultati. Gli aspetti più importanti di cui avere cura sono: la sterilità biologica, la polvere, i disturbi elettromagnetici, le eventuali radiazioni,

l'umidità, l'alimentazione elettrica, la temperatura, i livelli sonori e le vibrazioni. Occorre ripetere le prove ogni qualvolta le condizioni ambientali abbiano un effetto tale da compromettere i risultati [19].

c) Scelta dei metodi di prova

È preferibile avvalersi di metodi di prova reperibili nelle norme internazionali, nazionali o regionali. In questo caso, il laboratorio deve imporre l'utilizzo dell'edizione più recente. È buona regola integrare il metodo con dettagli e note che ne garantiscano la corretta applicazione e nel caso in cui non si possa far riferimento a norme standard, è possibile ricorrere ad articoli o pubblicazioni tecniche autorevoli [19].

d) Validazione dei metodi di prova

La validazione dei metodi di prova è richiesta quando si utilizzino metodi o procedure non normate. Il primo e più importante requisito è che essi siano integralmente documentati.

Accredia richiede che i metodi di prova interni riportino tutti i riferimenti bibliografici dei documenti utilizzati per la loro elaborazione. Inoltre devono risultare disponibili i risultati di eventuali prove comparative effettuate con metodi analoghi internamente al laboratorio o grazie a circuiti interlaboratorio e ogni altra documentazione ritenuta utile per dimostrare la validità del metodo. Il laboratorio deve infine garantire la ripetibilità dei metodi di prova interni, conservandone adeguata documentazione.

Accredia richiede inoltre che il laboratorio sottoponga a validazione i metodi non normati, i metodi sviluppati o progettati internamente e i metodi normati che sono utilizzati al di fuori del proprio campo di applicazione, così come le eventuali estensioni e modifiche; questo al fine di confermare che i metodi siano adatti all'impiego previsto.

È compito del laboratorio registrare i risultati ottenuti, le procedure utilizzate per la validazione e dichiarare infine l'idoneità del metodo all'utilizzo previsto [19].

e) L'incertezza nelle misure

Ogni laboratorio deve stimare l'incertezza di misura associabile ai risultati delle prove eseguite. Analogamente deve essere stimata l'incertezza di misura associata al risultato di taratura quando esegue internamente le proprie tarature. Pertanto deve predisporre e applicare una procedura per stimare l'incertezza di ogni misura. Tale procedura deve necessariamente prendere in considerazione, utilizzando opportuni metodi di analisi, tutte le componenti dell'incertezza inerenti ogni specifica misura.

I fattori che determinano l'incertezza di una misura sono: i materiali e i campioni di riferimento, le apparecchiature e i metodi utilizzati, le condizioni ambientali e gli operatori stessi [19].

f) Il trattamento dei dati

Se l'azienda dispone di software per il trattamento dei dati, il sistema di elaborazione deve essere dettagliatamente documentato e sottoposto a validazione.

E' inoltre necessario disporre di procedure che siano finalizzate a proteggere adeguatamente i dati. In particolare esse devono garantire l'integrità e la riservatezza dei dati, la loro conservazione nel tempo, e la correttezza della trasmissione e del trattamento degli stessi. I calcoli devono essere soggetti a controlli appropriati condotti in modo sistematico [19].

g) Apparecchiature e strumenti

Al fine di una corretta esecuzione della prova, è necessario che il laboratorio sia dotato di tutte le attrezzature per il campionamento e per le misure coinvolte.

Tutte le apparecchiature ed i sistemi software utilizzati per la prova devono consentire il raggiungimento dell'accuratezza richiesta e devono essere conformi alle specifiche relative alla prova o alle tarature correlate.

La norma prevede inoltre che siano predisposte procedure di taratura per gli strumenti e le grandezze chiave quando queste proprietà determinano un effetto significativo sui risultati. Prima di essere poste in servizio, le apparecchiature devono essere tarate o controllate per accertare che soddisfino le specifiche [19].

h) Conferma metrologica

La conferma metrologica è una verifica che le prestazioni del sistema di misura sono soddisfacenti, cioè che le caratteristiche metrologiche del sistema di misura siano adeguate all'uso previsto. Nella sostanza, ciò significa controllare la validità delle tarature di tutte le grandezze, misurando le grandezze di influenza che compongono la catena di misura del sistema. La maggior parte dei laboratori ha grandi difficoltà nell'effettuare questa attività per diverse ragioni:

1. I campioni di misura di cui il laboratorio generalmente dispone riguardano solo il misurando.

2. Le competenze specifiche da mettere in campo che, spesso, non sono proprie di un laboratorio di prova.

3. I campioni di misura che riguardano le grandezze di influenza non sono normalmente in possesso del laboratorio per i seguenti motivi: il costo, l'utilizzo, la

manutenzione e la conservazione (operazioni per le quali sarebbero necessarie competenze che esulano da quelle normalmente presenti nei laboratori).

4. Eseguire le tarature di una o più grandezze di influenza o la loro verifica, significa andare al cuore del funzionamento di un sistema di misura e ciò non può essere fatto senza la dovuta competenza che è patrimonio esclusivo del costruttore.

Un'apparecchiatura può ritenersi adeguata, quando, note le sue caratteristiche metrologiche di misurazione (CMA), attraverso l'effettuazione di un processo di conferma metrologica, si dà evidenza che l'apparecchiatura di misurazione soddisfa i requisiti metrologici richiesti (RMC) [20].

Le caratteristiche metrologiche di misurazione (CMA) sono proprie delle apparecchiature in quanto associate alle prestazioni derivanti dalle caratteristiche costruttive che il fabbricante ha voluto ottenere nel progettare l'apparecchiatura stessa. Caratteristiche costruttive tipiche dell'apparecchiatura che consentono alla stessa di erogare una prestazione.

I requisiti metrologici richiesti (RMC) appartengono specificatamente alle esigenze di misurazione che occorre soddisfare. In genere tali caratteristiche sono associate al prodotto, ad esempio un metodo di prova. Dal confronto tra CMA e RMC ne deriva che l'apparecchiatura può essere confermata metrologicamente dal fabbricante, ma dichiarata non idonea poiché non ha i requisiti di misurazione del metodo.

i) *La riferibilità delle misure*

La riferibilità si ottiene per mezzo di una corretta taratura degli strumenti. Accredia richiede che il laboratorio implementi un programma di taratura e che questo sia adeguatamente documentato.

In generale devono essere predisposti:

- uno scadenziario che preveda la taratura degli strumenti ad intervalli regolari;
- l'uso di etichette per identificare lo stato di taratura degli strumenti;
- il riferimento alle procedure di taratura adottate;
- le istruzioni per la compilazione dei rapporti di taratura;
- la valutazione dei risultati;
- le azioni correttive da intraprendere in caso di risultati non conformi alle specifiche;
- la registrazione di eventuali riparazioni o regolazioni.

I materiali di riferimento devono essere riferibili all'unità SI, o a materiali di riferimento certificati. I materiali di riferimento interni devono essere controllati. Il laboratorio deve gestire le scadenze dei materiali di riferimento e dei reagenti critici, definendole ove non indicate dal fornitore. A questo riguardo, si chiarisce che ogni laboratorio deve avere dei criteri per la definizione delle date di scadenza delle confezioni aperte di materiali di riferimento e reagenti [19].

j) I campionamenti

Qualora il laboratorio effettui campionamenti, la norma richiede che siano approntate opportune procedure per il campionamento. Accredia accredita esclusivamente procedure di campionamento descritte in norme nazionali ed internazionali e solo nel caso in cui venga accreditato anche il relativo metodo di prova.

Anche la manipolazione dei campioni sottoposti a prova è attentamente regolamentata. Il laboratorio deve identificare opportunamente i campioni, e prevedere procedure per il trasporto, l'accettazione, la manipolazione, la conservazione e l'eliminazione degli stessi [19].

k) Assicurazione della qualità dei risultati

Il risultato analitico dipende da diversi fattori, detti anche variabili di ingresso, che, possono assumere un'importanza significativa e un impatto critico sul risultato stesso della misura. Solo una gestione preventiva di tali fattori può minimizzare il rischio di misure analitiche non affidabili. Tutte le attività che tendono a garantire, in modo preventivo, che il risultato analitico sia realmente rappresentativo della caratteristica misurata possono essere viste come “Attività di Assicurazione Qualità”.

Il laboratorio deve tenere sotto controllo la validità delle prove e delle tarature effettuate e devono essere applicate tecniche statistiche per riesaminare i risultati [19].

l) I rapporti di prova

Il rapporto di prova è il risultato finale di tutta l'attività del laboratorio e rappresenta l'evidenza del lavoro svolto che viene consegnata al cliente. La norma indica quali sono i requisiti che il rapporto di prova deve soddisfare.

Oltre ai requisiti classici, quali il nome e l'indirizzo del laboratorio ed il luogo dove le prove sono state eseguite, la norma richiede una identificazione univoca del rapporto di prova e l'identificazione dei metodi usati.

È necessario indicare nel rapporto di prova:

- una descrizione e l'identificazione non ambigua del campione;
- la data di ricevimento dei campioni;
- la data di esecuzione della prova;
- il riferimento a piani e procedure di campionamento;
- il nome, la funzione e la firma della persona che autorizza l'emissione del rapporto di prova;

- scostamenti, aggiunte o esclusioni relative ai metodi di prova e informazioni su specifiche condizioni di prova come le condizioni ambientali;
- una dichiarazione circa la conformità o non conformità ai requisiti;
- una dichiarazione circa l'incertezza di misura stimata [19].

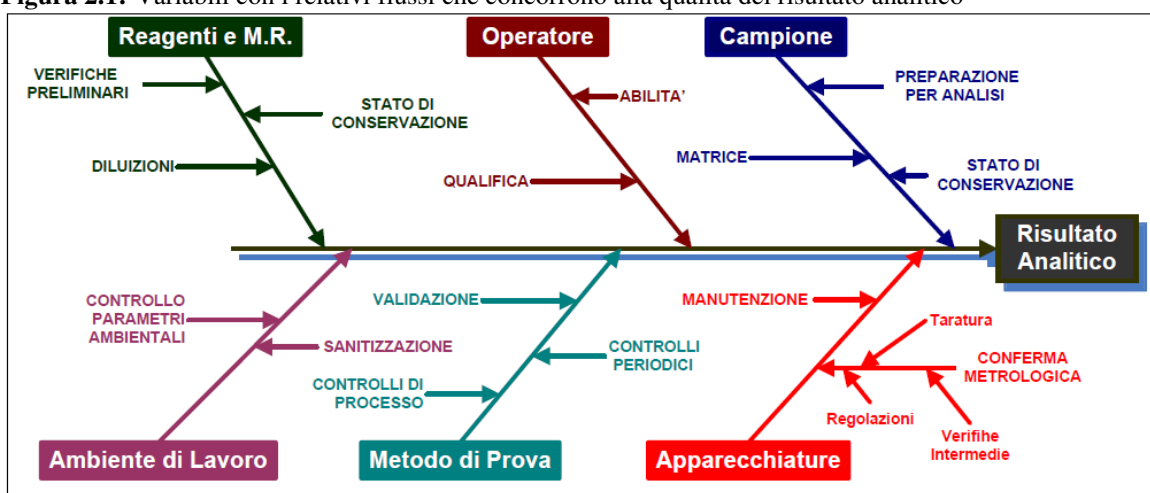
Nella progettazione di un sistema di gestione secondo la UNI CEI EN ISO/IEC 17025, finalizzato all'accreditamento del laboratorio, è necessario integrare i requisiti direttamente riportati nella norma con quelli richiesti da Accredia riportati nei documenti relativi ai requisiti aggiuntivi emessi dall'Ente di Accreditamento come il documento prescrittivo RT08 "Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori di prova" [21].

CAPITOLO 2 – Obiettivi

2.1 Obiettivi generali

L'obiettivo generale della tesi di dottorato è quello di creare un iter procedurale tecnico volto all'aumento delle performance di un laboratorio di prove inteso a garantire la qualità del risultato analitico, attraverso l'individuazione e la gestione di processi critici legati ai requisiti tecnici. A tal fine è necessaria l'impostazione di un modus operandi che permette una corretta e snella applicazione di tutti i fattori che concorrono alla produzione di dati certi, difendibili rispetto ad eventuali contestazioni da enti esterni o dal legislatore. Per tale obiettivo sono state individuate tutte le variabili con i relativi flussi che concorrono alla qualità del risultato analitico. Allo scopo, nella figura 2.1 sono riportati i fattori che concorrono a tale obiettivo.

Figura 2.1: Variabili con i relativi flussi che concorrono alla qualità del risultato analitico



2.2 Obiettivi specifici

Nell'ambito dell'obiettivo principale del presente lavoro, l'aumento delle performance del laboratorio di prove è stato effettuato applicando diverse metodologie, in diversi casi con nuove sperimentazioni finalizzate a salvaguardare il dato attraverso i seguenti obiettivi specifici:

- a) Gestione dei materiali di riferimento certificati e dei materiali di riferimento non certificati e verifica nel tempo del titolo.
- b) Qualifica, formazione e abilitazione del personale all'utilizzo delle apparecchiature e all'esecuzione delle prove.
- c) Rappresentatività del campione, conservazione del campione e preparazione all'analisi.
- d) Controllo dell'interferenza dovuta all'ambiente di lavoro non idoneo all'esecuzione delle prove.
- e) Applicazione dei metodi di prova: validazione iniziale o conferma dei dati riportati nei metodi utilizzati, controlli di qualità e controlli periodici;
- f) Conferma metrologica, taratura e manutenzione delle apparecchiature utilizzate per l'esecuzione dell'analisi.

La corretta gestione degli obiettivi specifici sopra riportati ci permettono di garantire il dato e di difenderlo nelle sedi opportune. Un ulteriore obiettivo specifico è legato alla stima dell'incertezza estesa da attribuire alla misura.

In questo caso la stima dell'incertezza estesa attribuita al risultato analitico garantisce l'acquirente o l'utilizzatore finale rispetto alla presenza di limiti di legge.

CAPITOLO 3 - *Materiali e metodi*

3.1 *Applicazione metodi*

Nell'ambito del progetto di tesi del dottorato di ricerca è stato applicato il metodo UNICHIM M.U. n. 2441:2012 per la determinazione dell'azoto totale nella matrice acque reflue [22]. Lo strumento utilizzato per la determinazione dell'azoto totale è il Ganimede N costruito dalla Società Hach-Lange, riportato nella figura 3.1.

Figura 3.1: Ganimede N

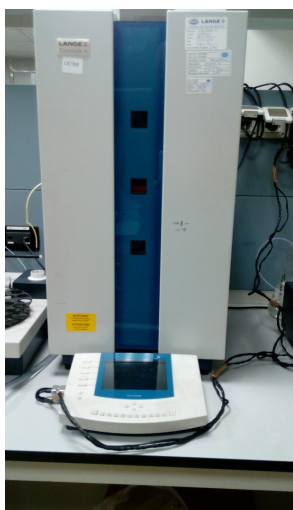


Figura 3.2: Ganimede N con sportello aperto



Di seguito viene descritto brevemente il funzionamento del Ganimede N riportato nella figura 3.2 con lo sportello di protezione aperto.

Il Ganimede N è uno strumento automatico, dove grazie all'uso di pompe peristaltiche munite di motore a micropasso, che provvedono all'aspirazione e al trasporto di 4,8 ml del campione e all'aspirazione e al trasporto dei reattivi attraverso l'utilizzo di tubicini flessibili forniti dalla casa costruttrice (Hach-Lange). I reattivi utilizzati, anch'essi forniti dalla casa costruttrice sono:

- ✓ miscela ossidante contenente perossidissolfato di sodio e metaborato di sodio;
- ✓ soluzione di acido solforico.

Al campione aspirato vengono aggiunti 2 ml di soluzione ossidante, il tutto trasportato in una cella chiusa ermeticamente. La cella è provvista di un termometro a termoresistenza Pt100 per il controllo della temperatura durante la fase di digestione. Un primo riscaldamento della cella avviene a 150°C per 90 secondi, seguito da raffreddamento a 95°C. Il secondo riscaldamento avviene a 150°C per 90 secondi, seguito da raffreddamento a 95°C. Queste fasi di digestione sono attuate a circa 8 atmosfere di pressione. Le condizioni di digestione sono tali da consentire la decomposizione delle sostanze organiche più resistenti come la glicina, acido nicotinic, EDTA. Durante la fase di digestione avviene la trasformazione di tutte le forme azotate organiche e inorganiche nella forma azotata maggiormente ossidata cioè lo ione nitrato. In seguito alla digestione, attraverso una pompa peristaltica, 2 ml di soluzione sono introdotte in una cuvetta di misura in quarzo, con cammino ottico di 20 mm. Successivamente vengono aggiunti automaticamente 0,5 ml della soluzione di acido solforico. A questo punto avviene la miscelazione mediante aria trasportata dall'esterno attraverso la pompa peristaltica. La misura dell'assorbanza, per la determinazione dello ione nitrato, viene eseguita alla lunghezza d'onda di 210 nm. Lo strumento esegue anche una lettura a 228 nm, per la verifica dell'eventuale presenza di sostanza organica non decomposta [22].

Prima di intraprendere nel dettaglio le diverse attività che concorrono al buon funzionamento di un laboratorio, è opportuno specificare che in ogni contesto lavorativo, vuoi industriale, artigianale, alimentare, ambientale e sanitario ci sono delle attività primarie che vanno gestite e tutelate, al fine di poter garantire tutta la filiera

della lavorazione. Queste attività sono ritenute fondamentali per poter assicurare che le attività all'interno di un laboratorio inizino in maniera corretta.

Nell'ambito di un laboratorio di prova, i processi o prodotti da controllare in maniera stringente sono:

- ✓ la qualità dell'acqua deionizzata o ultrapura; normalmente nei metodi analitici viene richiesta con resistività intorno ai 18 MΩ. L'acqua deionizzata viene utilizzata come solvente per la preparazione delle soluzioni standard, direttamente da sali o attraverso diluizioni di materiale di riferimento. Le soluzioni standard a diverso titolo saranno poi utilizzate per la taratura strumentale, verifica della taratura strumentale e conferma metrologica.
- ✓ Garantire il titolo e la purezza dei materiali di riferimento certificati e non certificati, attraverso il monitoraggio delle condizioni di stoccaggio indicate dal fornitore e nella verifica del titolo con cadenza definita dal laboratorio.
- ✓ Verificare all'uso che la bilancia sia messa in bolla. Inoltre, con cadenza definita dal laboratorio, verificare il corretto peso restituito dalle bilance di precisione, attraverso una verifica eseguita con campioni di riferimento (masse) certificati da un Laboratorio di Taratura Accredia (LAT).

3.2 Materiali di riferimento certificati (CRM) e non certificati (MR)

Nelle aziende farmaceutiche i farmaci (vedi compresse) sono confezionati singolarmente, di conseguenza la data di scadenza riportata sulla confezione riguarda ogni singola compressa contenuta nel blister. Nei CRM e nei MR utilizzati nei laboratori di prova, le informazioni riportate nel certificato di analisi e sulla confezione sono:

- data di scadenza del prodotto integro;
- condizioni di conservazione del prodotto.

Per gli utilizzatori, nasce il problema della garanzia del titolo dei CRM e dei MR in seguito all'apertura del contenitore.

Anche il collirio, che, come prodotto è paragonabile ai materiali di riferimento, riporta sulla confezione la data di scadenza del prodotto integro e la data di scadenza del prodotto in seguito all'apertura. Le date di scadenza sono rispettate affinché il prodotto venga conservato nel rispetto delle indicazioni fornite dalla società produttrice.

3.2.1. Metodo sperimentale nella gestione dei CRM E MR

Per la valutazione del titolo del materiale di riferimento utilizzato nel tempo (per l'applicazione del metodo M.U. n. 2441), è stato sperimentato e applicato un metodo interno.

Al fine di garantire il titolo del MR nel tempo, ad ogni taratura strumentale del parametro azoto totale è stato eseguito il seguente controllo: la soluzione a titolo noto alla concentrazione nominale di 30 mg L^{-1} di N-NO₃ preparata dal sale Nitrato di sodio NaNO₃ (produttore Carlo Erba) aperto il 03/07/2012 con scadenza il 28/02/2017 è verificata analizzandola come campione incognito. La taratura con cui viene analizzato il campione incognito è stata generata da soluzioni preparate dallo stesso sale "Nitrato di sodio". Il limite di accettabilità previsto, affinché il sale di partenza possa essere ritenuto ancora conforme e quindi utilizzato per la preparazione delle soluzioni a titolo noto per costruire una nuova taratura, è pari all'8% del valore nominale e il risultato deve essere compreso tra 27.6 mg L^{-1} e 32.4 mg L^{-1} . La concentrazione riscontrata nel tempo è stata riportata in apposita carta di controllo [23-24], elaborata per monitorare

nel tempo la conformità del titolo del sale NaNO_3 . Con questo metodo, è stato possibile monitorare la conformità del sale nel tempo ai requisiti prefissati dal laboratorio.

Poiché la taratura strumentale del parametro azoto totale viene eseguita ogni tre mesi, il tempo risulta essere un fattore di rischio da tenere sotto controllo. Per ridurre il rischio legato all'intervallo tra una taratura strumentale e la successiva, di conseguenza, al fine di abbattere il tempo tra una verifica e l'altra (trimestrale), è stata inserita ad ogni sessione analitica una verifica della taratura alla concentrazione nominale di 30 mg L^{-1} . Anche quest'ultimo valore è stato inserito nella carta di controllo riportata nel paragrafo 4 fig. 4.1.

3.3 Operatore

L'abilitazione degli operatori all'esecuzione della prova è stata realizzata in seguito alle prove di ripetibilità stretta [25] eseguite durante la validazione del metodo M.U. 2441. Nella tabella 3.1 sono riportati i dati di precisione ottenuti in fase di validazione del metodo: la media, la varianza, lo scarto tipo e il coefficiente di variazione ottenuti in seguito alla determinazione di dieci repliche di campione in matrice reale con aggiunta del materiale di riferimento.

Tutti i calcoli sono stati verificati con il software validato Unichim "Software applicativo per l'elaborazione dei risultati di convalida dei metodi di prova" Edizione 2008.

Tabella 3.1: Dati di precisione ottenuti in fase di validazione del metodo Unichim M.U. n. 2441

Ripetibilità Azoto Totale in matrice reale con aggiunta							
Numero di ripetizioni	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
1	0,59	7,45	25,1	34,2	52,2	72,0	101,2
2	0,59	7,31	25,3	34,6	52,8	73,0	100,8
3	0,58	7,55	25,2	34,5	52,9	72,0	100,1
4	0,59	7,47	25,0	34,1	53,4	72,4	100,9
5	0,58	7,47	25,3	34,2	53,5	71,8	99,7
6	0,59	7,37	25,1	34,3	53,3	72,3	99,1
7	0,59	7,34	25,0	34,3	53,2	71,0	100,9
8	0,60	7,36	25,0	34,1	53,2	72,0	101,2
9	0,59	7,27	24,9	34,2	53,0	72,4	102,3
10	0,59	7,42	25,1	34,1	52,9	73,2	100,5
Media	0,59	7,4	25,1	34,3	53,0	72,2	100,7
Varianza	0,000052	0,00737	0,01778	0,02933	0,14044	0,38322	0,78900
Scarto tipo	0,0072	0,0858	0,1333	0,1713	0,3748	0,6190	0,8883
Coefficiente di Variazione in %	1,2	1,2	0,5	0,5	0,7	0,9	0,9

Dai risultati ottenuti, attraverso la seguente formula:

$$\text{Scarto tipo} \cdot t_p \cdot \sqrt{2} \quad [26]$$

dove: t_p è la variabile di Student

è stato calcolato il limite di ripetibilità della prova in doppio.

$$|X_1 - X_2| \leq \text{Scarto tipo} \cdot 2,26 \cdot \sqrt{2} \quad [26]$$

dove:

X_1 e X_2 sono i risultati delle due prove ripetute.

Nella tabella 3.2 sono riportati i limiti delle prove in doppio (in mg L⁻¹ e in %) ottenuti a diverse concentrazioni.

Tabella 3.2: Limite prova in doppio metodo M.U. n. 2441

Limite di Ripetibilità per la prova in doppio							
Media (10 repliche) in mg L ⁻¹	0,59	7,4	25,1	34,3	53,0	72,2	100,7
Limite di ripetibilità prova in doppio in mg L ⁻¹	0,02	0,3	0,4	0,5	1,2	2,0	2,8
Limite di ripetibilità prova in doppio in %	3,9	3,7	1,7	1,6	2,3	2,7	2,8

3.3.1 Abilitazione e convalida dell'Operatore all'esecuzione di prove

In fase di prima abilitazione o di convalida di un nuovo operatore all'esecuzione della prova, è stato verificato che la differenza tra due prove eseguite in successione sullo stesso campione, oppure nella stessa sequenza analitica, era \leq del limite stabilito dal laboratorio per la prova in doppio.

Nella tabella 3.3 sono riportate 106 prove in doppio effettuate a diverse concentrazioni su matrice reale in un intervallo temporale che va da Ottobre 2014 a Dicembre 2016.

Tabella 3.3: Prove in doppio azoto totale su matrice reale metodo Unichim M.U. n. 2441

Data	1° risultato in mg L ⁻¹	2° risultato in mg L ⁻¹	Differenza in mg L ⁻¹	Limite prova in doppio in mg L ⁻¹	Data	1° risultato in mg L ⁻¹	2° risultato in mg L ⁻¹	Differenza in mg L ⁻¹	Limite prova in doppio in mg L ⁻¹
16/10/14	6,15	6,04	0,11	0,30	06/04/16	4,16	4,14	0,02	0,30
20/10/14	2,59	2,57	0,02	0,30	07/04/16	2,72	2,76	0,04	0,30
14/11/14	5,14	5,10	0,04	0,30	20/04/16	17,90	18,10	0,20	0,40
17/11/14	9,25	9,11	0,14	0,30	21/04/16	20,80	21,00	0,20	0,40
22/11/14	6,69	6,74	0,05	0,30	27/04/16	2,39	2,40	0,01	0,02
28/11/14	5,10	5,05	0,05	0,30	29/04/16	5,45	5,54	0,09	0,30
09/12/14	5,95	5,74	0,21	0,30	04/05/16	5,56	5,54	0,02	0,30
16/12/14	5,19	5,16	0,03	0,30	11/05/16	1,27	1,25	0,02	0,02
22/12/14	9,11	9,01	0,10	0,30	12/05/16	4,59	4,58	0,01	0,30
09/02/15	9,63	9,57	0,06	0,30	18/05/16	9,86	9,83	0,03	0,30
13/04/15	30,40	30,60	0,20	0,40	19/05/16	3,12	3,14	0,02	0,30
23/07/15	2,82	2,79	0,03	0,30	25/05/16	1,01	1,03	0,02	0,02
30/07/15	8,54	8,31	0,23	0,30	26/05/16	3,06	3,04	0,02	0,30
03/08/15	5,01	4,96	0,05	0,30	01/06/16	6,23	6,22	0,01	0,30
04/08/15	13,10	12,80	0,30	0,30	08/06/16	5,73	5,74	0,01	0,30
05/08/15	4,04	4,03	0,01	0,30	15/06/16	28,80	28,90	0,10	0,40
06/08/15	19,20	19,20	0,00	0,40	17/06/16	12,70	12,90	0,20	0,30
07/08/15	9,55	9,52	0,03	0,30	22/06/16	25,90	26,10	0,20	0,40
13/08/15	12,60	12,60	0,00	0,30	23/06/16	4,52	4,52	0,00	0,30
20/08/15	15,20	15,00	0,20	0,30	24/06/16	3,75	3,76	0,01	0,30
24/08/15	12,40	12,20	0,20	0,30	29/06/16	26,10	26,10	0,00	0,40
26/08/15	18,10	17,90	0,20	0,40	06/07/16	14,80	15,00	0,20	0,30
27/08/15	4,57	4,51	0,06	0,30	07/07/16	1,48	1,50	0,02	0,02
14/09/15	1,01	1,02	0,01	0,02	08/07/16	21,20	21,30	0,10	0,40
15/09/15	20,30	20,30	0,00	0,40	20/07/16	8,98	9,01	0,03	0,30
18/09/15	4,42	4,45	0,03	0,30	21/07/16	13,50	13,80	0,30	0,30
28/09/15	11,10	11,20	0,10	0,30	22/07/16	25,20	25,00	0,20	0,40
02/10/15	9,47	9,42	0,05	0,30	27/07/16	6,45	6,45	0,00	0,30
06/10/15	5,61	5,50	0,11	0,30	28/07/16	2,41	2,43	0,02	0,02
08/10/15	5,40	5,43	0,03	0,30	29/07/16	5,89	5,93	0,04	0,30
22/10/15	10,90	10,70	0,20	0,30	03/08/16	9,78	9,80	0,02	0,30
27/10/15	2,76	2,66	0,10	0,30	04/08/16	5,53	5,58	0,05	0,30
28/10/15	7,17	7,12	0,05	0,30	05/08/16	5,93	6,11	0,18	0,30
29/10/15	3,03	2,89	0,14	0,30	09/08/16	2,66	2,62	0,04	0,30
10/11/15	3,66	3,50	0,16	0,30	11/08/16	3,77	3,81	0,04	0,30
19/11/15	5,44	5,36	0,08	0,30	17/08/16	5,67	5,63	0,04	0,30
22/01/16	3,68	3,72	0,04	0,30	18/08/16	5,05	5,10	0,05	0,30
26/01/16	11,70	11,40	0,30	0,30	19/08/16	4,21	4,17	0,04	0,30

03/02/16	2,59	2,62	0,03	0,30	24/08/16	13,70	13,80	0,10	0,30
05/02/16	3,64	3,61	0,03	0,30	25/08/16	8,77	8,80	0,03	0,30
11/02/16	29,90	29,60	0,30	0,40	26/08/16	8,08	8,04	0,04	0,30
17/02/16	13,41	13,40	0,01	0,30	31/08/16	9,04	9,06	0,02	0,30
18/02/16	2,90	2,92	0,02	0,30	01/09/16	9,39	9,34	0,05	0,30
23/02/16	3,11	3,13	0,02	0,30	02/09/16	10,70	10,70	0,00	0,30
09/03/16	4,80	4,82	0,02	0,30	07/09/16	18,40	18,30	0,10	0,40
11/03/16	24,50	24,60	0,10	0,40	08/09/16	17,30	17,40	0,10	0,40
11/03/16	11,40	11,40	0,00	0,30	15/09/16	7,53	7,55	0,02	0,30
18/03/16	10,60	10,80	0,20	0,30	16/09/16	13,20	13,20	0,00	0,30
18/03/16	2,83	2,84	0,01	0,30	22/09/16	11,50	11,50	0,00	0,30
23/03/16	7,65	7,66	0,01	0,30	23/09/16	3,91	3,90	0,01	0,30
24/03/16	2,71	2,73	0,02	0,30	29/09/16	3,28	3,31	0,03	0,30
30/03/16	0,59	0,60	0,01	0,02	06/10/16	6,84	6,80	0,04	0,30
31/03/16	6,02	6,25	0,23	0,30	07/10/16	18,20	18,30	0,10	0,40

3.4 Rappresentatività del campione, conservazione del campione, interferenze dovute all'ambiente di lavoro

La rappresentatività del campione è legata all'esecuzione del campionamento non oggetto dello studio.

I campioni sono stati prelevati in bottiglie di polietilene e conservati a $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$ in frigorifero. Per garantire la conservazione a temperatura controllata, è stata verificata la catena termometrica dei frigoriferi attraverso un sistema di monitoraggio che trasmette dati di temperatura ogni 30 minuti da un trasmettitore ad un ricevitore attraverso un sistema wireless. L'intero processo è gestito da un software: Spylog realizzato dalla società AHSL.

La determinazione analitica è stata eseguita entro e non oltre le 24 ore dal campionamento.

L'ambiente di lavoro risulta essere idoneo all'esecuzione delle prove in quanto è un ambiente condizionato e non ci sono interferenze dovute ad altre prove. La strumentazione utilizzata "Ganimede N" può lavorare tra i 15°C e i 35°C come riportato nel manuale tecnico operativo dello strumento [27].

3.5 Validazione iniziale e conferma dei dati riportati nel metodo, controlli di qualità e controlli periodici

3.5.1 Validazione iniziale e conferma dei dati riportati nel metodo

Il metodo Unichim M.U. n. 2441 al paragrafo 12 “Parametri di precisione” riporta i dati di precisione ottenuti da nove laboratori che hanno partecipato ad un circuito interlaboratorio eseguendo tre ripetizioni dello stesso campione. I parametri elaborati secondo la norma UNI EN ISO 5725-2, sono riportati nella tabella 3.4 [22].

Tabella 3.4: Parametri di precisione del metodo Unichim M.U. n. 2441:2012

Parametro di prestazione	Risultato ottenuto
Media generale	18,87 mg L ⁻¹
Scarto tipo di ripetibilità	0,2494 mg L ⁻¹
Coefficiente di variazione di ripetibilità	1,32%
Scarto tipo di riproducibilità	0,608 mg L ⁻¹
Coefficiente di variazione di riproducibilità	3,22%

Prima di effettuare il confronto dei dati prestazionali, ottenuti dal presente lavoro con i dati prestazionali riportati nel metodo M.U. n.2441, è stata verificata l’applicabilità del modello normale secondo Shapiro-Wilk [25]. Inoltre è stata verificata la presenza di dati anomali attraverso la regola di Huber [25] prevista dal software Unichim.

Il confronto dei dati è stato fatto attraverso l’applicazione della regola riportata nella UNI ISO 5725-6 [28].

Tabella 3.5: Parametri prestazionali del laboratorio “metodo Unichim M.U. n. 2441”

Ripetibilità Azoto Totale in matrice reale con aggiunta							
Numero di ripetizioni	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	mg L ⁻¹
1	0,59	7,45	25,1	34,2	52,2	72,0	101,2
2	0,59	7,31	25,3	34,6	52,8	73,0	100,8
3	0,58	7,55	25,2	34,5	52,9	72,0	100,1
4	0,59	7,47	25,0	34,1	53,4	72,4	100,9
5	0,58	7,47	25,3	34,2	53,5	71,8	99,7
6	0,59	7,37	25,1	34,3	53,3	72,3	99,1
7	0,59	7,34	25,0	34,3	53,2	71,0	100,9
8	0,60	7,36	25,0	34,1	53,2	72,0	101,2
9	0,59	7,27	24,9	34,2	53,0	72,4	102,3
10	0,59	7,42	25,1	34,1	52,9	73,2	100,5
Media	0,59	7,4	25,1	34,3	53,0	72,2	100,7
Varianza	0,000052	0,00737	0,01778	0,02933	0,14044	0,38322	0,78900
Scarto tipo	0,0072	0,0858	0,1333	0,1713	0,3748	0,6190	0,8883
Esattezza/Recupero in %	–	97	98	96	95	96	100
Coefficiente di Variazione in %	1,2	1,2	0,5	0,5	0,7	0,9	0,9
Shapiro Wilk	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
Test Huber	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

Lo scarto tipo di ripetibilità alla concentrazione di 25,1 mg L⁻¹ risulta essere di 0,133 mg L⁻¹, mentre lo scarto tipo di ripetibilità del metodo è pari a 0,2494 mg L⁻¹.

Il rapporto tra lo scarto tipo di ripetibilità avuto dal laboratorio e lo scarto tipo di ripetibilità del metodo è pari a:

$$\frac{0,1333}{0,2494} = 0,5345$$

Dalla tabella 3.6, ripresa dal documento tecnico ACCREDIA DT002/6 [26], si può osservare che in corrispondenza del numero di gradi di libertà ($v = n - 1 = 9$ dove n è il numero di prove effettuate) l'intervallo in cui deve essere compreso il valore è tra 0,548 e 1,454.

Tabella 3.6: Limiti di fiducia minimi e massimi del rapporto tra la ripetibilità del laboratorio e del metodo in funzione dei gradi di libertà $\nu=n-1$ dove n è il numero di prove.

Gradi di libertà $\nu=n-1$	Valore minimo $p = 0,025$	Valore massimo $p = 0,975$
1	0,0316	2,241
2	0,160	1,921
3	0,268	1,765
4	0,348	1,669
5	0,408	1,602
6	0,454	1,551
7	0,491	1,512
8	0,522	1,480
9	0,548	1,454
10	0,570	1,431
11	0,589	1,412
15	0,646	1,354
20	0,692	1,307
25	0,724	1,275
30	0,748	1,251

L'utilizzo del metodo M.U. n. 2441 non prevede ulteriori confronti o test valutativi, ma sono stati valutati altri dati prestazionali come riportato nella tabella 3.7.

Tabella 3.7: Parametri prestazionali

Parametri di prestazione e definizione	Valutato	
Esattezza: Grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da un grande insieme di risultati di prova e un valore di riferimento accettato (UNI ISO 5725-1:2004) [29].	SI	
Precisione di misura: Grado di concordanza tra risultati di prova indipendenti ottenuti nelle condizioni stabilite. (UNI ISO 5725-1:2004) [29].	SI	
Specificità: La specificità di un metodo ne individua l'abilità a misurare unicamente ciò che si vuole misurare anche in presenza di molti composti affini dal punto di vista chimico-fisico.		NO
Limite di rilevabilità: Il limite di rilevabilità (LOD) è la più bassa concentrazione di un analita che può essere rilevata all'interno di un campione mediante confronto con il relativo bianco ad un dato grado di rischio. (UNI ISO 11843-2:2009) [30].	SI	
Limite di quantificazione: Il limite di quantificazione (LOQ) è la concentrazione di analita misurata con una precisione corrispondente a un coefficiente di variazione intorno al 10%. (UNI ISO 11843-2:2009) [30].	SI	
Limite di ripetibilità: Valore al disotto o in corrispondenza del quale dovrebbe cadere, con una probabilità del 95%, la differenza assoluta tra due risultati di prova ottenuti in condizioni di ripetibilità (UNI ISO 5725-1:2004) [29].	SI	
Linearità: La linearità di un metodo analitico è la sua abilità di dare risultati che sono direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni all'interno di un determinato campo di validità.	SI	
Campo di applicazione: Il campo di applicazione è l'intervallo di concentrazione per il quale è stato verificato che tutti i parametri caratteristici del metodo appena elencati hanno valori accettabili [31].	SI	
Incertezza di misura: parametro non negativo che caratterizza la dispersione dei valori che sono attribuiti a un misurando, sulla base delle informazioni utilizzate (VIM 2.26) [32].	SI	
Robustezza: La robustezza di un metodo di prova è la capacità dello stesso di non venire influenzato nei risultati finali da variazioni deliberate introdotte nelle sue fasi di realizzazione [31].		NO

3.5.2 Controlli di qualità e assicurazione di qualità

3.5.2.1 Controlli di qualità

Ad ogni sessione analitica sono stati eseguiti una serie di controlli finalizzati a garantire l'affidabilità dell'intero procedimento analitico. Tali controlli vengono di seguito descritti.

All'inizio di ogni serie analitica e ogni venti campioni analizzati sono stati eseguiti i seguenti controlli di qualità:

- ✓ bianco campione utilizzato anche per le diluizioni;
- ✓ due verifiche taratura con concentrazioni nominali di azoto totale vicine rispettivamente al limite inferiore e quello superiore dell'intervallo di applicazione delle due tarature. Per la prima taratura, la verifica è stato effettuata alla concentrazione nominale di 1,0 mg L⁻¹ e 30 mg di mg L⁻¹, mentre per la seconda taratura alla concentrazione nominale di 25 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹;
- ✓ ad ogni taratura, è stato controllato il processo di ossidazione eseguito dallo strumento, attraverso la determinazione dell'azoto totale a partire da una soluzione di glicina alla concentrazione nominale di 30 mg L⁻¹.

I criteri di accettazione dei controlli di qualità sono stati:

- ✓ il valore del bianco campione non deve superare la concentrazione di 0,3 mg L⁻¹;
- ✓ per le verifiche delle tarature sono accettati gli scostamenti riportati nella tabella 3.8;
- ✓ il criterio di accettazione del processo ossidativo eseguito attraverso la glicina è del 10% rispetto al valore nominale.

Tabella 3.8: Scostamenti accettati per la verifica taratura

Concentrazione nominale in mgL ⁻¹	Scostamento in %	Limite superiore in mgL ⁻¹	Limite inferiore in mgL ⁻¹
1.0	10	1.1	0.90
25.0	5	26.3	23.7
30.0	5	31.5	28.5
100.0	5	105	95

3.5.2.2 Assicurazione di qualità

La dimostrazione di aver effettuato correttamente il processo analitico viene eseguita mediante l'utilizzo di protocolli di Assicurazione Qualità (QA).

I protocolli di QA sono costituiti dall'insieme delle procedure che regolamentano le diverse fasi del processo analitico, le relative registrazioni e le dimostrazioni di capacità di eseguire correttamente le analisi. Normalmente le analisi di campioni "Performance Evaluation Samples" forniti nei circuiti interlaboratorio organizzati da Enti Accreditati secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17043 [33], sono un ottimo sistema per valutare la performance del laboratorio nell'esecuzione della prova.

Nel presente lavoro, è stato definito un piano di assicurazione qualità necessario per dare evidenza della coerenza tra gli obiettivi e i risultati.

I risultati ottenuti con il metodo M.U. 2441 sono stati confrontati attraverso la partecipazione al circuito interlaboratorio organizzato da LGC Standard nel 2015 e da Unichim nel 2016.

3.6 Conferma metrologica, taratura e manutenzione strumentale

3.6.1 Conferma metrologica

L'apparecchiatura Ganimede N viene confermato metrologicamente dal fabbricante con cadenza biennale e controllata indirettamente ad ogni sessione analitica attraverso i controlli qualità di processo.

3.6.2 Taratura

Tutte le apparecchiature che hanno preso parte al processo di misura dell'azoto totale sono state tarate con cadenze definite nei piani di taratura elaborati secondo le esigenze del laboratorio, in considerazione della valutazione del rischio legata alla variabile "tempo".

3.6.2.1 Taratura Bilance

La taratura delle bilance, utilizzate per la preparazione delle soluzioni di riferimento, viene eseguita con cadenza biennale da un laboratorio di taratura Accredia (LAT).

Il laboratorio, ha verificato con cadenza bisettimanale, attraverso un controllo effettuato con masse certificate con caratteristiche E2 confermate con cadenza quinquennale dal laboratorio di taratura Accredia, il corretto funzionamento delle bilance.

3.6.2.2 Taratura strumentale Ganimede N

La taratura strumentale dell'azoto totale è stata eseguita ogni tre mesi. Sono state eseguite due tarature con diversi campi di misura:

- la prima taratura da 0,5 mg L⁻¹ a 30 mg L⁻¹;
- la seconda taratura da 25 mg L⁻¹ a 100 mg L⁻¹.

Il limite di accettabilità del fattore di correlazione r^2 in seguito alla taratura è stato ≥ 0.995 . Ad ogni taratura, è stata eseguita una verifica sul corretto funzionamento dello strumento, attraverso la determinazione di una soluzione standard a concentrazione nominale di 30 mg L^{-1} di Glicina (Panreac), tale da assicurare che l'intero processo ossidativo funzioni correttamente.

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento sono state utilizzate bilance analitiche con risoluzione 0.0001 g e bilance tecniche con risoluzione 0.01 g . Tutta la vetreria utilizzata è di classe A.

3.6.3 Manutenzione strumentale

La manutenzione del Ganimede N è stata eseguita due volte l'anno dai tecnici della Società costruttrice, mentre ogni tre mesi è stata eseguita la manutenzione interna che consiste nella pulizia della cuvetta in quarzo e la sostituzione dei tubicini flessibili utilizzati dalle pompe peristaltiche per il trasporto del campione.

3.6.4 Stima dell'incertezza

L'incertezza composta è stata stimata attraverso l'approccio metrologico, sommando tutti i contributi derivanti dai materiali utilizzati e dal processo.

Nel dettaglio:

- U_1 Incertezza di ripetibilità relativa a vari livelli di concentrazione del campione (a $25,1 \text{ mg L}^{-1}$ è $0,00531$);
- U_2 Incertezza relativa associata allo scostamento utilizzato durante la verifica taratura (a $25,1 \text{ mg L}^{-1}$ è $0,001150$);
- U_3 Incertezza relativa della vetreria utilizzata (a $25,1 \text{ mg L}^{-1}$ è $0,005247$);

- U_4 Incertezza relativa delle pesate con relativa incertezza delle bilance (a 25,1 mg L⁻¹ è 0,001674);
- U_5 Incertezza relativa materiale di riferimento (a 25,1 mg L⁻¹ è 0,000952).

I singoli contributi al quadrato sono stati sommati per determinare l'incertezza combinata relativa (U_c):

$$U_c = \text{Radq} (U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2 + U_5^2)$$

Ossia: U_c azoto totale a 25,1 mg L⁻¹ = radq (0,00531² + 0,001150² + 0,005247² + 0,001674² + 0,000952²) = 0,2

Mentre l'incertezza estesa (U_e) con fattore di copertura pari a 2 ad un livello di fiducia del 95,45% è:

$$U_e = U_c \cdot 2$$

Ossia: U_e azoto totale a 25,1 mg L⁻¹ = 0,2 · 2 = 0,4

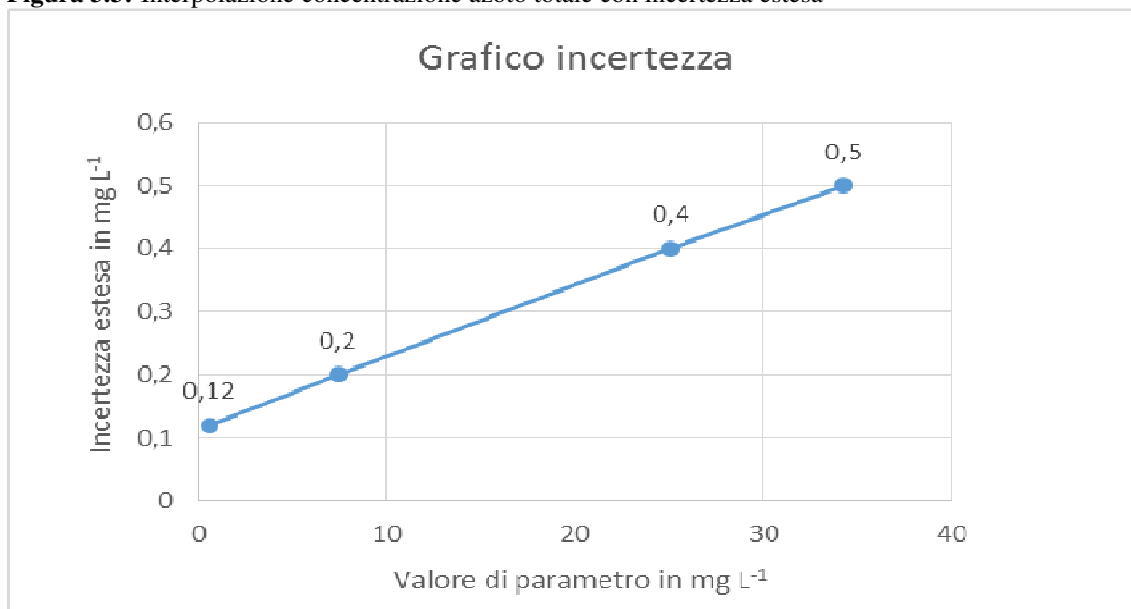
Nella tabella 3.9 è riportata la stima dell'incertezza combinata ed estesa per ogni singolo valore di parametro.

Tabella 3.9: Valore di parametro con stima dell'incertezza estesa e combinata

Valore di parametro in mg L ⁻¹	0,59	7,4	25,1	34,3	53,0	100,7
Incertezza composta in mg L ⁻¹	0,06	0,1	0,2	0,3	0,5	1,1
Incertezza estesa in mg L ⁻¹	0,12	0,2	0,4	0,5	1,1	2,1
Percentuale incertezza estesa in fase di validazione	20,3	2,7	1,6	1,5	2,1	2,1
Percentuale incertezza estesa del metodo		6,44	6,44	6,44	6,44	6,44
Differenza incertezza in %		-3,7	-4,8	-5,0	-4,4	-4,4

Dall'interpolazione dell'incertezza estesa con la concentrazione di azoto totale, attraverso l'equazione della retta, riscontriamo una buona linearità fino alla concentrazione di 35 mg L⁻¹. Questo ci permette di ottenere un grafico (Figura 3.3) dove si evince una buona correlazione dei punti (0,99994) con una pendenza (coefficiente angolare della retta) di 0,01129 ed un'intercetta (quota all'origine) di 0,11502.

Figura 3.3: Interpolazione concentrazione azoto totale con incertezza estesa



Una volta nota la concentrazione di qualsiasi campione incognito, grazie alla pendenza e all'intercetta, è possibile calcolare attraverso l'equazione della retta il valore dell'incertezza estesa.

Ad esempio: avendo una concentrazione di azoto totale pari a $18,9 \text{ mg L}^{-1}$, l'incertezza estesa si calcola moltiplicando la pendenza con la concentrazione per poi sommare l'intercetta. In questo caso otterremo $18,9 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$.

CAPITOLO 4 - *Risultati e Discussione*

4.1 Risultati

In questa parte del lavoro di ricerca sono riportati i risultati relativi agli studi condotti sui materiali di riferimento, sull'operatore, sulla validazione del metodo M.U.2241 e sull'assicurazione di qualità. Per rendere il lavoro ancora più robusto, lo stesso iter procedurale è stato applicato ad altri metodi qui di seguito riportati:

1. ISO 15705:2002 [35] Determinazione della richiesta chimica di ossigeno (COD).
2. Metodo ISS.DAA.003 2007/31 [36] Determinazione dell'arsenico nelle acque destinate al consumo umano.
3. Metodo APAT CNR IRSA 3020 Man 29 2003 [37] Determinazione di elementi metallici.

4.1.1 Materiale di riferimento

Il materiale di riferimento certificato CRM e il materiale di riferimento non certificato MR, fornito con la corretta documentazione, controllato in fase di accettazione, conservato adeguatamente secondo le indicazioni del fornitore ed utilizzato secondo l'iter procedurale riportato nel par. 3.2.1, ha portato ad un ottimo sistema di controllo da eseguire nel tempo per confermare il corretto titolo. L'iter procedurale per il controllo dei materiali di riferimento è stato applicato a diverse tipologie di materiali di riferimento nella forma solida e liquida. Nella tabella 4.1 sono riportati i materiali di riferimento monitorati.

Tabella 4.1: Materiali di riferimento monitorati

Materiali di riferimento in forma solida	Materiali di riferimento in soluzione
Nitrato di sodio	Nitrato – Fluoruri – Solfati – Cloruri
Ftato acido di potassio	Arsenico – Antimonio
Fenolo cristallino	Cloroformio – Tricloroetilene

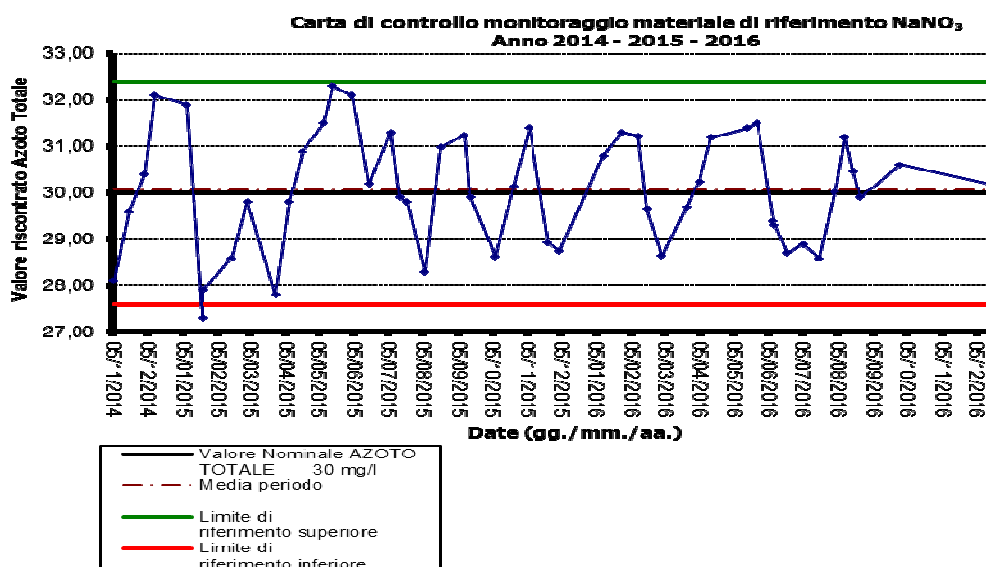
I risultati riportati in questo lavoro di ricerca mettono in evidenza che, durante il periodo di osservazione, non sono state identificate particolari criticità.

Questo tipo di controllo del materiale di riferimento è risultato idoneo anche nel valutare il titolo e la purezza di sali o soluzioni utilizzate dal laboratorio come materiale di riferimento certificato e non certificato in fase di accettazione ed utilizzo di un nuovo lotto di produzione.

Nella figura 4.1 si riporta la carta di controllo per il monitoraggio del titolo del nitrato di sodio (NaNO_3) utilizzato come materiale di riferimento non certificato per la taratura strumentale del parametro azoto totale.

Il periodo del monitoraggio va da Novembre 2014 a Dicembre 2016.

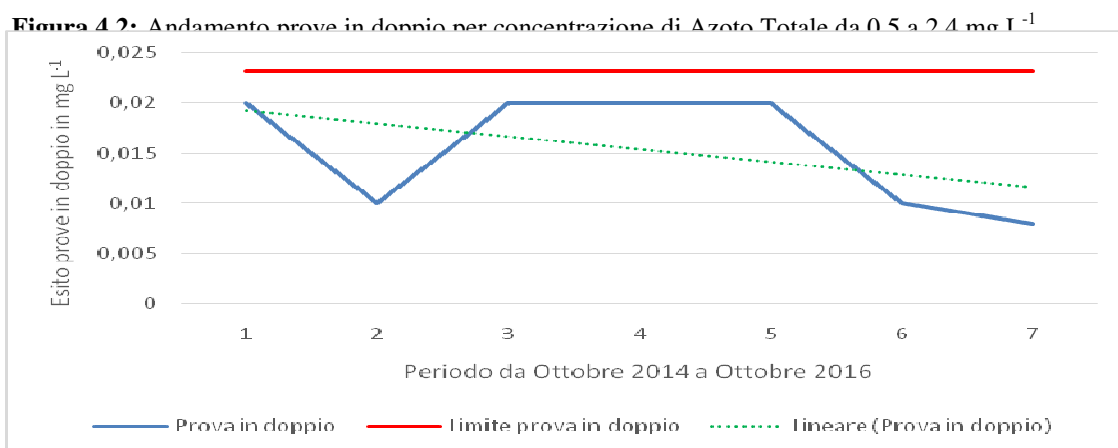
Figura 4.1: Carta di controllo per il monitoraggio del titolo del NaNO_3 .



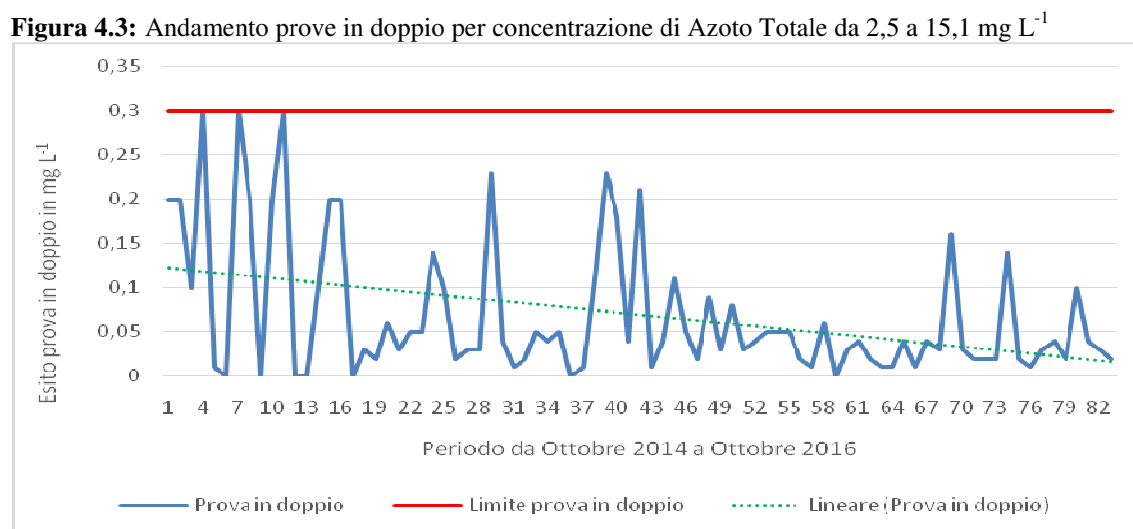
4.1.2 Abilitazione e convalida dell'Operatore all'esecuzione di prove

Dai risultati delle prove in doppio, eseguite a diverse concentrazioni e riportati nella tabella 3.3, sono stati generati diversi grafici.

Nella figura 4.2 viene riportato l'andamento delle prove in doppio per concentrazioni da 0,5 a 2,4 mg L⁻¹. Il limite della prova in doppio è 0,023 mg L⁻¹.

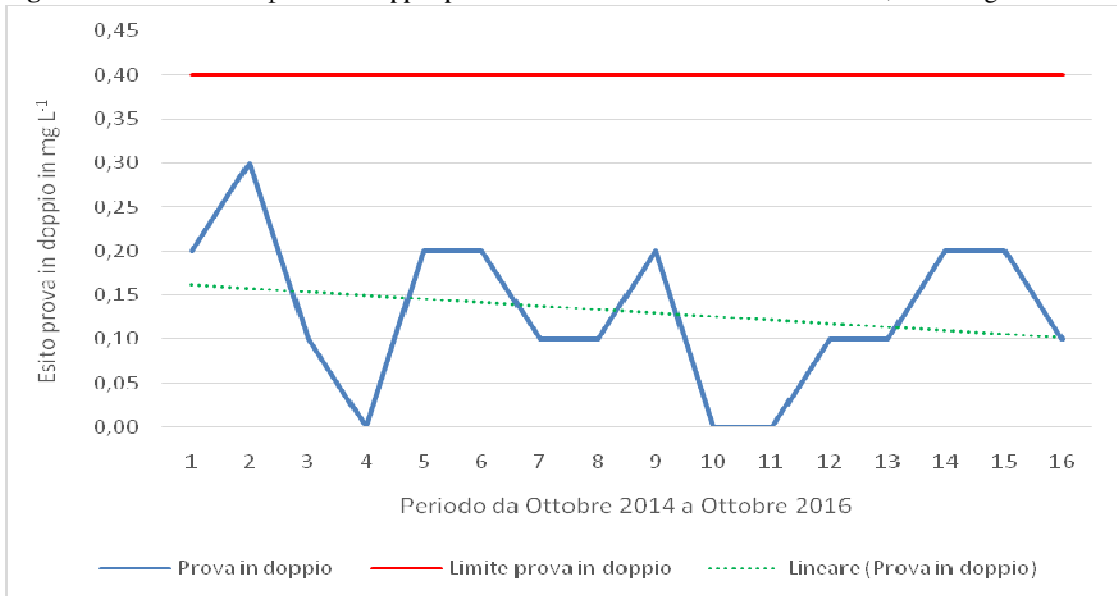


Nella figura 4.3 viene riportato l'andamento delle prove in doppio per concentrazioni da 2,5 a 15,2 mg L⁻¹. Il limite della prova in doppio è 0,30 mg L⁻¹.



Nella figura 4.4 viene riportato l'andamento delle prove in doppio per concentrazioni da 15.2 a 30 mg L⁻¹. Il limite della prova in doppio è 0,4 mg L⁻¹.

Figura 4.4: Andamento prove in doppio per concentrazione di Azoto Totale da 15,3 a 30 mg L⁻¹



L'andamento dei grafici evidenzia che non ci sono state situazioni critiche. I risultati delle prove in doppio sono sempre inferiori al limite di ripetibilità stretta ottenuta in fase di validazione del metodo. Tali risultati ci tranquillizzano rispetto all'abilitazione degli operatori ma anche rispetto alla ripetibilità del metodo, poiché la prova in doppio risulta essere la meno onerosa in termini di tempo e di costi per il laboratorio.

Per poter ridurre l'impegno del laboratorio nella gestione dell'abilitazione dell'operatore e nel mantenimento della qualifica dell'operatore all'esecuzione delle determinazioni analitiche, è possibile armonizzare le tecniche analitiche in gruppi omogenei. I gruppi omogenei devono essere individuati tra metodi di prova che presentano le stesse criticità nell'esecuzione delle varie fasi in termini di manipolazione del campione, utilizzo delle apparecchiature di prova, elaborazione dei dati, in modo tale che, l'esecuzione di una prova in doppio o la partecipazione ad un circuito

interlaboratorio eseguito da un operatore, gli permette di estendere la prova a tutti i parametri del gruppo omogeneo di quella prova. Ad esempio: gruppo omogeneo N.1 “*Ottico*” comprendente i parametri determinati attraverso la tecnica della spettrofotometria UV-VIS come l’ammonio, cianuri, aldeidi, fenolo, tensioattivi anionici, non ionici e cationici.

4.1.3 Validazione iniziale e conferma dei dati riportati nel metodo, controlli di qualità e controlli periodici

Nella validazione del metodo M.U. n. 2441 sono stati verificati i parametri prestazionali ottenuti attraverso il confronto con i parametri prestazionali riportati nel metodo. Il confronto dei parametri prestazionali non basta ad avere tutte le informazioni necessarie per la corretta gestione del metodo. Nella tabella 4.2 sono riportati i parametri prestazionali eseguiti per una prima conferma dei parametri prestazionali riportati nel metodo M.U. n. 2441 e i parametri prestazionali per una più completa validazione.

Tabella 4.2: Parametri prestazionali

Parametri Prestazionali	Parametri Prestazionali riportati nel metodo	Parametri Prestazionali da verificare	Parametri Prestazionali da valutare
Esattezza			Sì
Precisione di misura	Sì	Sì	
Specificità	Sì		
Limite di rilevabilità			Sì
Limite di quantificazione			Sì
Limite di ripetibilità			Sì
Linearità			Sì
Campo di applicazione	Sì	Sì	
Incertezza di misura	Sì		
Robustezza	Sì		

Il rapporto tra lo scarto tipo di ripetibilità avuto dal laboratorio e lo scarto tipo di ripetibilità riportato nel metodo M.U. n. 2441 è pari a 0,5345.

Il risultato ottenuto è inferiore al valore minimo 0,548 riportato nella tabella 3.6. Ne consegue che le prestazioni ottenute dal laboratorio sono superiori alle prestazioni riportate nel metodo M.U. n. 2441. Questo miglioramento, nella maggior parte dei casi, è legato all'evoluzione tecnologica strumentale, che fornisce dati prestazionali migliori rispetto ai dati prestazionali dei metodi.

4.1.4 Assicurazione di Qualità

Nel 2015 e nel 2016, attraverso la partecipazione ai circuiti interlaboratorio riportati nella Tabella 4.3 è stata verificata l'esattezza e la precisione del metodo M.U. n. 2441.

Tabella 4.3: Partecipazione circuiti interlaboratorio metodo M.U. 2441:2012

Matrice	Prova	Metodo	Anno	Ente	Z-score
Acque reflue	Azoto totale	M.U. n.2441:2012	2015	LGC Standard	0,1
Acque reflue	Azoto totale	M.U. n.2441:2012	2016	Unichim	0,88

In accordo con quanto indicato dalla norma ISO 13528 [34], la prestazione del laboratorio è "adeguata" solo quando il valore di *zscore* si colloca nell'intervallo $-2 \div +2$. Valori al di fuori di tale intervallo sono segnalati nel Rapporto di Prova con l'annotazione:

- **W** (Warning), se il valore è compreso tra $+2 \div +3$ o $-2 \div -3$
- **A** (Action), se il valore è < -3 o $> +3$. In tal caso, il laboratorio è tenuto a mettere in atto un'azione correttiva.

I risultati ottenuti, ci rassicurano della corretta gestione di tutti i processi attuati per l'applicazione e l'esecuzione del metodo.

Lo stesso iter procedurale per l'assicurazione di qualità è stato eseguito su altri metodi, ad esempio nell'applicazione del metodo ISO 15705:2002 [35] per la determinazione della richiesta chimica di ossigeno (COD) nella matrice acque reflue. Nella tabella 4.4 sono riportati i risultati degli esiti dei circuiti interlaboratorio ottenuti per la determinazione del COD.

Tabella 4.4: Partecipazione circuiti interlaboratorio metodo ISO 15705:2002

Matrice	Prova	Metodo	Anno	Ente	Z-score
Acque reflue	Richiesta chimica di ossigeno (COD)	ISO 15705:2002	2015	Quality Consult	0,50
Acque reflue	Richiesta chimica di ossigeno (COD)	ISO 15705:2002	2015	Qualitycheck	1,20
Acque reflue	Richiesta chimica di ossigeno (COD)	ISO 15705:2002	2016	Unichim	0,61
Acque reflue	Richiesta chimica di ossigeno (COD)	ISO 15705:2002	2016	LGC Standards	0,29

4.1.5 Stima dell'incertezza

L'incertezza composta, stimata attraverso l'approccio metrologico [38] alla concentrazione nominale 18,9 mg L⁻¹ di azoto totale è risultata pari a 0,2 mg L⁻¹. Mentre l'incertezza estesa (con un fattore di copertura ad un livello di fiducia del 95,45% pari a 2) è risultata pari a 0,4 mg L⁻¹.

Analizzando i risultati, riscontriamo che l'incertezza stimata è inferiore all'incertezza ottenuta attraverso i dati di riproducibilità del metodo. Infatti l'incertezza composta del metodo M.U. n. 2441 risulta essere alla concentrazione di 18,9 mg L⁻¹ pari a 0,6 mg L⁻¹ mentre l'incertezza estesa è 1,2 mg L⁻¹.

4.2 Discussione

Come abbiamo visto, nel caso del metodo M.U. n. 2441 per la determinazione dell'azoto totale, abbiamo riscontrato un'incertezza estesa da associare al dato analitico inferiore all'incertezza stimata dai dati pubblicati nel metodo. Quest'aumento della performance del laboratorio rispetto ai dati prestazionali del metodo è dovuto soprattutto all'evoluzione delle componenti strumentali, che ci permettono di avere una precisione e un'esattezza maggiore. A questo punto, il laboratorio deve decidere quali dati prestazionali utilizzare.

È comune prassi nei laboratori stimare l'incertezza dei propri risultati dai dati prestazionali riportati nei metodi. Generalmente, si pensa che mantenere nel tempo delle performances così spinte, possa rendere difficoltoso il normale svolgimento della prova/processo. Le difficoltà possono consistere in:

- tempi maggiori nell'esecuzione della prova,
- maggiori costi;
- il committente spesso non riconosce o non necessita di tali prestazioni.

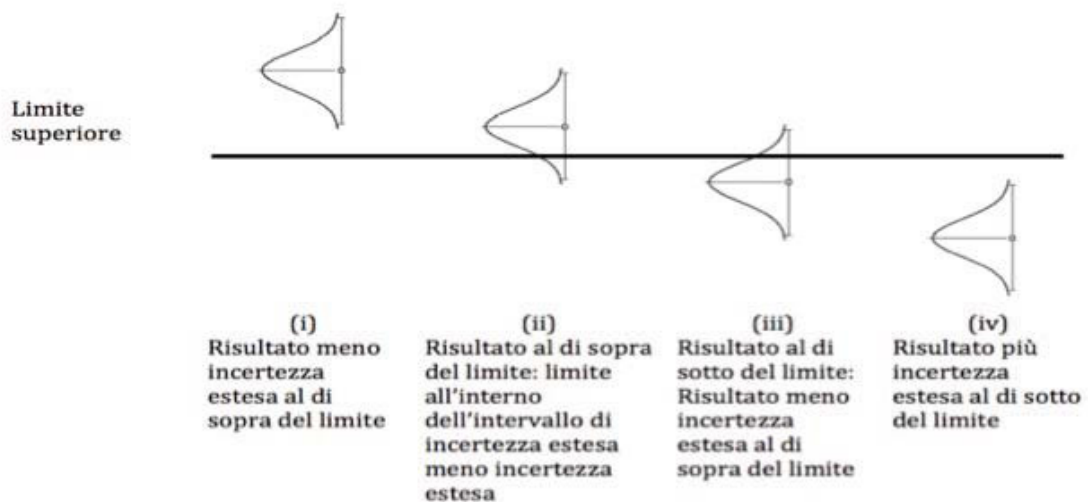
Ma per quanto riguarda i costi e i tempi, abbiamo visto che il laboratorio nella convalida dei dati prestazionali del metodo, esegue una serie di parametri tra cui la ripetibilità stretta ad una o più concentrazioni. Normalmente per poter utilizzare il metodo all'interno del laboratorio, abbiamo bisogno di determinare ulteriori parametri prestazionali. La stessa ripetibilità stretta è stata calcolata a diverse concentrazioni all'interno del campo di misura, come anche l'esattezza (verificata a diverse concentrazioni), il limite di rivelabilità, il limite di quantificazione, la linearità, il campo di misura e l'incertezza a diverse concentrazioni e al limite di legge. Tutto ciò ha un costo ed un tempo, che il laboratorio deve comunque sostenere, con un riscontro

positivo, poiché associare una stima dell'incertezza estesa ad un risultato analitico è fondamentale affinché il committente o il valutatore possa orientarsi non su un dato puntuale ma su di un range entro il quale il mio risultato può rientrare.

Infatti, in presenza di limiti di legge, il valutatore che deve certificare o deve prendere delle decisioni sulla conformità o meno di un prodotto, si accinge a leggere i riscontri analitici riportati nel rapporto di prova.

Capita spesso di trovarsi nella situazione riportata nella figura 4.4 [39].

Figura 4.4: Dato analitico con incertezza confrontato con i limiti di riferimento



Dove:

(i) il risultato della determinazione meno l'incertezza estesa è al di sopra del limite di riferimento;

(ii) il risultato della determinazione è sopra il limite di riferimento, ma, il limite è entro l'incertezza estesa;

(iii) il risultato della determinazione più l'incertezza estesa è al di sotto del limite di riferimento;

(iv) il risultato della determinazione è al di sotto del limite di riferimento, ma, il limite è entro l'incertezza estesa.

È evidente che diventa difficile esprimere un giudizio di conformità. Di conseguenza esprimere un risultato analitico dove si cerca di contenere l'incertezza estesa attraverso l'aumento delle proprie performance sia in fase di validazione del metodo che in fase di conferma nel tempo, diminuisce la probabilità che il committente possa trovarsi nella situazione descritta al punto (ii) e (iii).

CAPITOLO 5 – Conclusioni

5.1 Punti innovativi nell'applicazione della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025

La norma UNI EN CEI ISO/IEC 17025 [39] è un pilastro per la gestione del laboratorio.

Essa:

- introduce nuove attività per una corretta applicazione e gestione dei processi;
- rafforza la formazione per una maggior competenza degli operatori;
- consiglia l'uso di metodi normati ISO, UNI, ecc.;
- diversifica la convalida dei metodi normati da quelli non normati e da quelli interni;
- obbliga i laboratori alla stima dell'incertezza di misura da attribuire al dato analitico;
- pone attenzione all'uso e alla conservazione dei campioni e dei materiali di riferimento;
- è scrupolosa nella compilazione dei rapporti di prova.

5.2 Criticità nell'applicazione della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025

Nell'applicazione della UNI EN CEI ISO/IEC 17025 [39] sono state riscontrate diverse criticità. Ad esempio: non definisce un iter procedurale e non indica una linea guida rivolta al controllo del titolo dei materiali di riferimento certificati e non certificati in seguito alla loro apertura.

L'utilizzo dei dati prestazionali dei metodi normati, in alcuni casi, può essere limitante per il laboratorio ma anche per l'utilizzatore dei dati. Inoltre non stimola il laboratorio a ridurre il valore stimato dell'incertezza da riportare insieme al dato analitico.

5.3 Conclusioni finali

L'implementazione e l'accreditamento del laboratorio di prove e taratura alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 [39] fornisce una serie di vantaggi analitici e commerciali:

- accesso a un maggior numero di contratti per le analisi e le tarature, considerato che alcune organizzazioni pubbliche e private stipulano contratti solo con Laboratori accreditati;
- l'Accreditamento, consente di ottenere un maggior numero di contratti da organizzazioni che, pur non ritenendo indispensabile l'accreditamento, preferiscono affidarsi a laboratori accreditati;
- accesso ad un maggior numero di gare pubbliche, considerato che nella maggior parte dei capitolati tecnici viene richiesto che il laboratorio deve essere accreditato e che il numero di prove accreditate sia almeno il 50% delle determinazioni richieste dalla normativa. È il caso della Delibera della Giunta Regionale della Campania n. 239 del 24/05/2016 pubblicata sul Bollettino Ufficiale della Regione Campania n. 34 del 30 Maggio 2016 riguardante le determinazioni da eseguire per l'utilizzo agronomico dei fanghi di depurazione.

Alla luce di quanto esposto finora, si può concludere affermando che il regolare e corretto uso dei CRM insieme ad una metodologia di verifica del titolo del CRM, come riportato al paragrafo 3.2.1, è lo strumento più semplice e sicuro per verificare l'accuratezza di una misura di cui possa disporre un laboratorio che operi in condizioni di qualità. Per quanto un'analisi possa essere effettuata in maniera rigorosa ed attenta, questa può risultare falsata se lo standard di riferimento non è affidabile.

La criticità predominante, nonostante una determinazione possa essere effettuata da personale tecnico competente, risulta essere la possibile disattenzione in una qualsiasi

fase/attività del processo analitico, nonostante le abilitazioni concesse e i meccanismi di controllo eseguiti sull'operato dei tecnici.

Investire nella qualità di un'analisi attraverso l'aumento delle performance del laboratorio, garantendo dei dati ambientali tecnicamente difendibili e utilizzabili dal committente al fine di fare le giuste valutazioni, è una strategia che certamente ripaga in termini di credibilità ed inoltre può consentire spesso un effettivo ritorno economico non solo per il laboratorio, ma anche per il committente e soprattutto per la Società!

Bibliografia

[1] Unichim. Manuale n. 197 Guida alla scelta e all'uso dei materiali di riferimento. Milano: Unichim; 2003. 1.

[2] UNI EN ISO 9001:2015 Sistemi di gestione per la qualità – Requisiti

[3] REGOLAMENTO (CE) N. 765/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 9 luglio 2008 che pone 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

[4] REGOLAMENTO (CEE) N. 339/93 DEL CONSIGLIO dell'8 febbraio 1993 relativo ai controlli sulla conformità delle merci importate da paesi terzi alle norme in materia di sicurezza dei prodotti

[5] DECISIONE N. 768/2008/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 9 luglio 2008 relativa a un quadro comune per la commercializzazione dei prodotti e che abroga la decisione 93/465/CEE

[6] REGOLAMENTO (CE) N. 764/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 9 luglio 2008 che stabilisce procedure relative all'applicazione di determinate regole tecniche nazionali a prodotti legalmente commercializzati in un altro Stato membro e che abroga la decisione n. 3052/95/CE

[7] Accredia.it (Internet) ACCREDIA (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: http://www.accredia.it/context.jsp?ID_LINK=76&area=6

[8] Accredia.it (Internet) Accordi internazionali (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: http://www.accredia.it/context.jsp?ID_LINK=12&area=6

[9] European-accreditation.org (Internet) EA Members Full members (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: <http://www.european-accreditation.org/ea-members>

[10] European-accreditation.org (Internet) The MLA (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: <http://www.european-accreditation.org/the-mla>

[11] European-accreditation.org (Internet) EA MLA Coverage (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: <http://www.european-accreditation.org/scopes#1>

[12] European-accreditation.org (Internet) MLA &BLA Signatories (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: <http://www.european-accreditation.org/mla-and-bla-signatories#3>

[13] European-accreditation.org (Internet) IAF/ILAF Recognition (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: <http://www.european-accreditation.org/iaf-and-ilac>

[14] International Organization for Standardization. 2004. ISO/IEC 17011:2004 "Conformity assessment" – General requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies

[15] International Organization for Standardization. 2012. ISO 15189:2012 "Medical laboratories" – Requirements for quality and competence.

[16] International Organization for Standardization. 2012. ISO/IEC 17020:2012 "Conformity assessment" - Requirements for the operation of various types of bodies performing inspection.

[17] Ilac.org (Internet) Recognised Regional cooperation bodies (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: <http://ilac.org/ilac-mra-and-signatories/recognised-regional-cooperation-bodies/>

[18] Ilac.org (Internet) ILAC MRA Signatory Search (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: <http://ilac.org/signatory-search/>

[19] UNI Ente Italiano di normazione. 2005. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prove e tarature. Italia: UNI; 2005. 3: 26-52

[20] UNI Ente Italiano di normazione. 2004. UNI EN ISO 10012:2004 Sistemi di gestione della misurazione: Requisiti per i processi e le apparecchiature di misurazione Italia: UNI; 2004

[21] ACCREDIA L'Ente Italiano di Accreditamento 2015. RT-08 Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori di prova. Italia: Accredia; 2015

[22] Unichim. Metodo M.U. n. 2441:2012 Qualità dell'acqua - Determinazione dell'azoto totale - Metodo mediante spettrometria UV dopo digestione ossidativa con persolfato di sodio utilizzando una apparecchiatura che opera in sequenza analitica coordinata. Milano: Unichim; 2012

[23] UNI Ente Italiano di normazione. 2014. UNI ISO 7870-1:2014 Carte di Controllo Parte 1: Linee guida generali. Italia: UNI; 2014

[24] UNI Ente Italiano di normazione. 2014. UNI ISO 7870-2:2014 Carte di Controllo Parte 2: Carte di controllo di Shewart. Italia: UNI; 2014

[25] Unichim. Manuale n. 179/1 Edizione 2011 Linee Guida per la convalida 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. Milano: Unichim; 2011

[26] Sinal - Sistema Nazionale per l'accreditamento di laboratori. DT-0002/6 - Guida al calcolo della ripetibilità di un metodo di prova ed alla sua verifica nel tempo. Italia: Sinal; 2007

[27] HACH. 2013. GANIMEDE P and GANIMEDE N laboratory machine User manual. Germany: HACH; 2013. Edition 1A. 5

[28] UNI Ente Italiano di normazione. 2004. UNI ISO 5725-6:2004 Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione - Parte 6: uso nella pratica dei valori di accuratezza. Italia: UNI; 2004. 30

[29] UNI Ente Italiano di normazione. 2004. UNI ISO 5725-1:2004 Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione Parte 1: Principi generali e definizioni. Italia: UNI; 2004.

[30] UNI Ente Italiano di normazione. 2009. UNI ISO 11843-2:2009 Capacità di rivelazione Parte 2: Metodologia nel caso di taratura lineare. Italia: UNI; 2009

[31] Unichim. Manuale n. 179/0 Edizione 2011 Linee Guida per la convalida di metodi analitici nei laboratori chimici –Criteri Generali. Milano: Unichim; 2011

[32] Ceinorme.it (Internet) Vocabolario Internazionale di Metrologia (VIM) Concetti di base e generali e termini associati (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: <http://www.ceinorme.it/it/lavori-normativi-it/vim/vim-contenuti.html>

[33] UNI Ente Italiano di normazione. 2010. UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010 Valutazione della conformità – Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio. Italia: UNI; 2010

[34] International Organization for Standardization. 2015. ISO 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison.

[35] International Organization for Standardization. 2002. ISO 15705:2002 Water quality – “Determination of the chimica oxygen demand index (ST-COD) – Small-scale sealed-tube method”

[36] Istituto Superiore di Sanità. 2007. Rapporti ISTISAN 2007/31 Metodo ISS.DAA.003 Determinazione dell'arsenico nelle acque destinate al consumo umano - Metodo per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica

[37] Istituto di Ricerca sulle Acque. 2003. Metodo APAT CNR IRSA 3020 Man 29 2003 Determinazione di elementi chimici “Metalli e specie metalliche” mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES)

[38] Sinal - Sistema Nazionale per l'accreditamento di laboratori. DT-0002/3 - Avvertenze per la valutazione dell'incertezza el campo dell'analisi chimica. Italia: Sinal; 2007

[39] Accredia.it. (Internet). Guida ACCREDIA – ISS per i laboratori di prova - Il controllo ufficiale e l'autocontrollo dei prodotti alimentari: la scelta dei metodi di prova chimici 2014. 43. (Consultato a Gennaio 2017). Disponibile all'indirizzo web: http://www.accredia.it/news_detail.jsp?ID_NEWS=1730&areaNews=95>emplate=default.jsp