

Istruzioni per l'uso dei fogli di calcolo per la validazione e verifica di un metodo analitico quantitativo mediante cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata alla spettrometria di massa in medicina di laboratorio

Introduzione

Il file è stato sviluppato nell'ambito del corso teorico-pratico SIBIOC "Validazione e verifica di un metodo analitico quantitativo mediante cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata alla spettrometria di massa in medicina di laboratorio – II^a edizione" tenutosi presso il Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria "Scuola Medica Salernitana" a settembre 2026. Il foglio di calcolo è strutturato in dodici fogli di lavoro, ciascuno dedicato a uno specifico parametro di validazione, più uno relativo al report finale di validazione.

Il foglio di calcolo è protetto da password e consente all'operatore di compilare le celle evidenziate in grigio. Le celle contenenti formule di calcolo risultano quindi volutamente non modificabili, ma le formule rimangono comunque visibili all'utente e possono includere funzioni di gestione degli errori e della visualizzazione dei dati (ad esempio SE.ERRORE per la gestione delle celle vuote), finalizzate a migliorare la leggibilità del foglio di lavoro. In ogni foglio di calcolo è presente anche un riquadro "Note" liberamente compilabile.

Nei fogli di calcolo, ad esclusione di quello per la valutazione del LOD e LLOQ e dell'incertezza di misura, le celle dei risultati relativi al parametro di validazione vengono automaticamente evidenziate in verde (risultato conforme) o in rosso (risultato non conforme) mediante formattazione condizionale, sulla base dei limiti di accettabilità riportati nelle linee guida di riferimento citate nel foglio di calcolo stesso. Vengono inoltre forniti ulteriori parametri di valutazione che, sebbene non siano definiti in maniera univoca nelle linee guida, possono essere di supporto per la valutazione dei risultati. Un risultato non conforme a questi criteri di accettabilità definiti sulla prassi della comunità scientifica viene evidenziato in arancione. Tali parametri sono il coefficiente di determinazione R^2 della retta di calibrazione (foglio 1), il coefficiente di variazione e la deviazione percentuale dei coefficienti angolari per la valutazione dell'effetto matrice (foglio 4) e il recupero assoluto e di estrazione (foglio 6).

Nell'ultimo foglio, relativo al report di validazione, è presente una tabella riepilogativa con due colonne principali (Risultato e Commenti). I valori riportati nella colonna "Risultato" sono collegati tramite riferimenti diretti ai fogli corrispondenti, ad eccezione dei campi relativi all'intervallo di misura (range ed equazione), selettività, cross-talk, specificità, carry-over, integrità della diluizione e stabilità, che richiedono la compilazione manuale.

Prima di procedere con l'utilizzo del foglio di calcolo è necessario verificare il corretto funzionamento sul PC in cui viene utilizzato mediante inserimento di dati (vedi sezione finale di ogni paragrafo) e verifica dei risultati.

1. Intervallo di Misura e Linearità

Il foglio raccoglie i parametri dell'equazione della retta di calibrazione (pendenza m, intercetta q, coefficiente di determinazione R²) e, sulla base dei valori attesi ed estrapolati dei calibratori (LLOQ, CAL1–CAL8) inseriti dall'operatore, calcola l'inaccuratezza percentuale secondo la seguente formula:

$$\text{Inaccuratezza (\%)} = \left(\frac{\text{Conc}_{\text{retrocalcolata}}}{\text{Conc}_{\text{nominale}}} \times 100 \right) - 100$$

Verifica foglio di calcolo

				LLOQ	CAL1	CAL2	CAL3	CAL4	CAL5	CAL6	CAL7	CAL8										
				Concentrazione NOMINALE del calibratore																		
EQUAZIONE RETTA				10	20	30	40	50	60	70	80	90	% INACCURATEZZA CALIBRATORI									
DATA	PENDENZA (m)	INTERCETTA (q)	R ²	Concentrazione RETRACALCOLATA del calibratore									LLOQ	CAL1	CAL2	CAL3	CAL4	CAL5	CAL6	CAL7	CAL8	
xx	0.112	0.002	0.998	12	16	35	48	58	58	75	81	100	20.0	-20.0	16.7	20.0	16.0	-3.3	7.1	1.3	11.1	
				13	17	37	49	55	55	77	80	110	30.0	-15.0	23.3	22.5	10.0	-8.3	10.0	0.0	22.2	
				11	18	38	47	54	54	71	82	120	10.0	-10.0	26.7	17.5	8.0	-10.0	1.4	2.5	33.3	
xx	0.117	0.005	0.995	12	16	35	48	58	58	75	81	100	20.0	-20.0	16.7	20.0	16.0	-3.3	7.1	1.3	11.1	
				13	17	37	49	55	55	77	80	110	30.0	-15.0	23.3	22.5	10.0	-8.3	10.0	0.0	22.2	
				11	18	38	47	54	54	71	82	120	10.0	-10.0	26.7	17.5	8.0	-10.0	1.4	2.5	33.3	
xx	0.113	0.007	0.992	12	16	35	48	58	58	75	81	100	20.0	-20.0	16.7	20.0	16.0	-3.3	7.1	1.3	11.1	
				13	17	37	49	55	55	77	80	110	30.0	-15.0	23.3	22.5	10.0	-8.3	10.0	0.0	22.2	
				11	18	38	47	54	54	71	82	120	10.0	-10.0	26.7	17.5	8.0	-10.0	1.4	2.5	33.3	
MEDIA	0.1140	0.0047	0.995										MEDIA	20.0	-15.0	22.2	20.0	11.3	-7.2	6.2	1.3	22.2
DS	0.0026	0.0025	0.003										DS	8.7	4.3	4.4	2.2	3.6	3.0	3.8	1.1	9.6

2. Limite di Rilevabilità (LOD) e Limite di Quantificazione (LLOQ)

In seguito all'inserimento della concentrazione del bianco (matrice priva o a bassa concentrazione di analita) di n replicati, il foglio calcola media e deviazione standard e quindi deriva LOD e LLOQ applicando le seguenti formule:

$$\text{LOD} = \bar{X}_{\text{bianco}} + 3 \times \frac{DS}{\sqrt{n}} \quad \text{LLOQ} = \bar{X}_{\text{bianco}} + 10 \times \frac{DS}{\sqrt{n}}$$

dove $\bar{X}_{\text{bianco}}$ è la concentrazione media dei bianchi, n è il numero dei replicati e DS è la deviazione standard delle misure ripetute. È fondamentale considerare la concentrazione del bianco per le analisi di matrici complesse o metodi con fondo elevato, ovvero nei metodi in cui il bianco contribuisca con una concentrazione residua apprezzabile.

Verifica foglio di calcolo

DATA	[BIANCO]
xx	0.010
xx	0.012
xx	0.015
xx	0.025
xx	0.013
xx	0.010
xx	0.012
xx	0.015
xx	0.025
xx	0.013
xx	0.010
xx	0.012
xx	0.015
xx	0.025
xx	0.013
MEDIA	0.015
DS	0.005

n°= 15

LOD 0.019

LLOQ 0.029

Unità di misura: ng/L

3. Selettività, Cross-talk e Specificità

Il foglio è articolato in tre sezioni: selettività (segnale al tempo di ritenzione dell'analita e dello standard interno in matrice bianca), cross-talk (segnale al tempo di ritenzione dell'analita generato da interferenza spettrale di un qualunque altro analita co-eluyente, dello standard interno o viceversa) e specificità (segnale di molecole interferenti al tempo di ritenzione dell'analita e dello standard interno). Le tipologie di matrice testate per la valutazione della selettività includono iperlipemica, emolizzata e itterica.

Il foglio di calcolo confronta la media dei segnali (area) con quella misurata nel LLOQ utilizzando un limite di accettabilità calcolato come percentuale (20% per l'analita e 5% per lo standard interno).

Verifica foglio di calcolo

		SELETTIVITÀ			CROSS-TALK		SPECIFICITÀ		
LLOQ		MATRICE BIANCA			MATRICE + IS		DATA	AREA ANALITA	AREA IS
AREA ANALITA	AREA IS	DATA	AREA RT ANALITA	AREA RT IS	DATA	AREA RT ANALITA	xx	300	700
1200	12000	xx	300	700	xx	300	xx	250	650
1500	15000	xx	250	650	xx	250	xx	290	690
1700	17000	xx	290	690	xx	290	xx	300	700
1500	15000	xx	300	700	MEDIA	280	xx	250	650
1400	14000	xx	250	650	DS	26	xx	290	690
1460	14600	xx	290	690	MATRICE + ANALITA		xx	300	700
MEDIA	182	MEDIA	280	680	DATA	AREA RT IS	xx	250	650
DS	182	DS	24	24	xx	700	xx	290	690
20% AREA	5% AREA	MATRICE IPERLIPEMICA			xx	650	xx	300	700
292	730	xx	350	820	xx	690	xx	250	650
		xx	300	700	MEDIA	680	xx	290	690
		MEDIA	325	760	DS	26	xx	300	700
		DS	35	85			xx	250	650
		MATRICE EMOLIZZATA					xx	290	690
		xx	350	700			xx	300	700
		xx	300	650			xx	250	650
		MEDIA	325	675			xx	290	690
		DS	35	35			xx	300	700
		MATRICE ITTERICA					xx	250	650
		xx	200	820			xx	290	690
		xx	250	700			MEDIA	280	680
		MEDIA	225	760			DS	22	22
		DS	35	85					

4. Effetto Matrice

Il foglio di calcolo quantifica l'effetto matrice assoluto (EM%) e normalizzato (nEM%) su 6 matrici normali e 2 matrici alterate, a tre livelli di concentrazione.

Nei parametri preceduti dal simbolo Δ , il fattore "-1" viene usato esclusivamente a fini descrittivi, al fine di rappresentare in modo intuitivo la direzionalità del EM: ad esempio, un rapporto tra segnali del 98% viene descritto come -2% di effetto matrice medio.

Nel calcolo viene considerata l'area media relativa all'analisi della matrice in triplicato secondo le seguenti formule:

$$\Delta EM\% = \left(\frac{Area\ analita_{matrice}}{Area\ analita_{solvente}} - 1 \right) \times 100$$

$$nEM\% = \left(\frac{\frac{Area\ analita_{matrice}}{Area\ IS_{matrice}}}{\frac{Area\ analita_{solvente}}{Area\ IS_{solvente}}} - 1 \right) \times 100$$

$$\Delta nEM\% = \left(\frac{\frac{Area\ analita_{matrice}}{Area\ IS_{matrice}}}{\frac{Area\ analita_{solvente}}{Area\ IS_{solvente}}} - 1 \right) \times 100$$

Una sezione aggiuntiva esegue la comparazione dei coefficienti angolari delle rette di calibrazione in solvente e in matrice attraverso il calcolo della differenza percentuale tra le pendenze.

Verifica foglio di calcolo

DATA		XX	
[LIVELLO 3]		XX	

SOLVENTE	
AREA ANALITA	AREA IS
1000	2000
900	2500
1250	2200

MATRICE					
AREA ANALITA	AREA IS	Δ EM%	nEM%	Δ nEM%	
Matrice 1	900	2000	-3.2	96.8	-3.2
	900	2500			
	1250	2200			
Matrice 2	800	2000	-28.6	71.4	-28.6
	700	2500			
	750	2200			
Matrice 3	1200	2000	11.1	111.1	11.1
	1000	2500			
	1300	2200			
Matrice 4	1200	3000	11.1	70.9	-29.1
	1000	3500			
	1300	4000			
Matrice 5	900	3000	-3.2	61.8	-38.2
	900	3500			
	1250	4000			
Matrice 6	1200	1800	11.1	148.9	48.9
	1000	1700			
	1300	1500			
MEDIA		-0.3	93.5	-6.5	
CV			35.1		

Matrice	900	3000	-3.2	61.8	-38.2	
"alterata" 1	900	3500				
	1250	4000				
Matrice	1200	1800	11.1	148.9	48.9	
	"alterata" 2	1000				1700
		1300				1500
MEDIA *		0.8	96.5	-3.5		
CV *			38.0			

COMPARAZIONE COEFFICIENTI ANGOLARI **		
DATA	XX	
PENDENZA RETTA in SOLVENTE	0.056	
		DEVIAZIONE %
PENDENZA RETTA in MATRICE	0.055	-1.8
	0.049	-12.5
	0.057	1.8
	0.055	-1.8
	0.055	-1.8
MEDIA	0.054	-3.2
CV	5.6	
PENDENZA RETTA in MATRICE "ALTERATA"	0.034	-39.3
	0.045	-19.6
	0.022	-60.7
MEDIA *	0.047	-17.0
CV *	26.9	

5. Precisione ed Esattezza

Il foglio di calcolo valuta la ripetibilità ($CV_{within-run}$), la riproducibilità (CV_{total}) e l'esattezza (bias %) su cinque livelli di concentrazione (Livello 1 – LLOQ, Livello 2 – 3×LLOQ, Livello 3 – intermedio LLOQ e ULOQ, Livello 4 – 80% ULOQ, Livello 5 – ULOQ), con due protocolli sperimentali: 5×5 (5 serie × 5 repliche) e 2×20 (2 serie × 20 repliche).

Nei calcoli relativi al protocollo 5x5 vengono usate le seguenti formule:

$$Deviazione\ standard_{within-run} (S_r) = \sqrt{\frac{\sum (replicato - media_{within-run})^2}{D \times (n - 1)}}$$

$$Varianza_{between-run} (S_b^2) = \frac{\sum (media_{within-run} - media_{total})^2}{D - 1}$$

$$Deviazione\ standard_{total} (S_t) = \sqrt{\frac{n - 1}{n} \times S_r^2 + S_b^2}$$

dove D sono il numero dei giorni e n il numero dei replicati per giorno.

Il bias % viene calcolato considerando la media delle misurazioni effettuate dal laboratorio rispetto al valore nominale dichiarato utilizzando la seguente formula:

$$Bias\ (\%) = \left(\frac{Media_{Total}}{Conc_{nominale}} \times 100 \right) - 100$$

Verifica foglio di calcolo

[LIVELLO 1] LLOQ	145							
		PROTOCOLLO 5x5					PROTOCOLLO 2x20	
DATA							DATA	REPLICATI
REPLICATI	140	140	140	141	139		140	139
	139	143	138	144	140		139	140
	138	141	136	142	141		138	141
	138	143	141	143	138		138	138
	140	137	136	144	141		140	141
MEDIA _{within-run}	139.0	140.8	138.2	142.8	139.8		140	139
MEDIA _{Total}	140.1						143	140
$\sum (repl-media)^2$	4.0	24.8	20.8	6.8	6.8		141	141
Var _{within-run}	3.16						143	138
Var _{between-run} (S_b^2)	3.17						137	141
DS _{within-run} (S_r)	1.78						140	139
CV _{within-run}	1.27						138	140
DS _{Total} (S_t)	2.39						136	141
CV _{Total}	1.70						141	138
							136	141
							141	139
							144	140
							142	141
							143	138
							144	141
							MEDIA	139.9
							DS	1.9
							CV	1.4
							BIAS %	-3.5

6. Recupero

Il foglio è suddiviso in due macrosezioni: recupero assoluto (confronto tra spike in matrice vs standard puro iniettato direttamente nello strumento) e di estrazione (confronto spike pre- e post-estrazione, valutato sia per l'analita che per lo standard interno). Il recupero relativo non è stato incluso poiché nella pratica di laboratorio viene valutato raramente. Per ciascuna sezione sono presenti due livelli di concentrazione (Livello 1 e Livello 2), con 6 matrici e 5 repliche per matrice.

$$\text{Recupero assoluto \%} = \frac{\text{Area spike matrice (precessato)}}{\text{Area standard puro (non processato)}} \times 100$$

$$\text{Recupero estrazione \%} = \frac{\text{Area spike pre - estrazione}}{\text{Area spike post - estrazione}} \times 100$$

Verifica foglio di calcolo

RECUPERO ASSOLUTO							
DATA		XX		DATA		XX	
[LIVELLO 1]		XX		[LIVELLO 2]		XX	
ANALITA							
	AREA SPIKE	AREA STANDARD PURO	RECUPERO ASSOLUTO %		AREA SPIKE	AREA STANDARD PURO	RECUPERO ASSOLUTO %
Matrice 1	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
	2300.00	2500.00	92.0		2300.00	2500.00	92.0
	2450.00	2500.00	98.0		2450.00	2500.00	98.0
	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
Matrice 2	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
	2100.00	2500.00	84.0		2100.00	2500.00	84.0
	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
	2250.00	2500.00	90.0		2250.00	2500.00	90.0
	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
Matrice 3	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
	2300.00	2500.00	92.0		2300.00	2500.00	92.0
	2450.00	2500.00	98.0		2450.00	2500.00	98.0
	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
Matrice 4	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
	2100.00	2500.00	84.0		2100.00	2500.00	84.0
	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
	2250.00	2500.00	90.0		2250.00	2500.00	90.0
	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
Matrice 5	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
	2300.00	2500.00	92.0		2300.00	2500.00	92.0
	2450.00	2500.00	98.0		2450.00	2500.00	98.0
	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
	2400.00	2500.00	96.0		2400.00	2500.00	96.0
Matrice 6	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
	2100.00	2500.00	84.0		2100.00	2500.00	84.0
	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
	2250.00	2500.00	90.0		2250.00	2500.00	90.0
	2200.00	2500.00	88.0		2200.00	2500.00	88.0
MEDIA			91.6	MEDIA			91.6
DS			4.5	DS			4.5

7. Carry-over

Il foglio di calcolo verifica la contaminazione da “trascinamento” dell'analita e dello standard interno a seguito dell'iniezione di un campione ad alta concentrazione. La media dei segnali (area) del bianco (n=5) analizzato a seguito dell'iniezione di un campione ad alta concentrazione viene confrontata con quella misurata nel LLOQ utilizzando un limite di accettabilità calcolato come percentuale (20% per l'analita e 5% per lo standard interno).

Verifica foglio di calcolo

LLOQ		MATRICE BIANCA		
AREA ANALITA	AREA IS	DATA	AREA RT ANALITA	AREA RT IS
2400	2000		350	200
2300	1950		360	190
2450	2150		400	210
2400	2000		380	200
2300	2100		390	200
MEDIA	2370		376	200
DS	67		21	7
20% AREA	5% AREA			
474	102			

8. Integrità della Diluizione

Il foglio di calcolo verifica che la diluizione del campione non alteri la misura, confrontando il risultato corretto per il fattore di diluizione con il valore non diluito di riferimento. Per ciascun fattore di diluizione (fattori 2, 3 e 4 sono preimpostati ma modificabili), vengono raccolte 5 repliche del campione diluito. Il risultato di ciascuna replica viene moltiplicato per il fattore di diluizione e confrontato con il valore non diluito secondo la seguente formula:

$$\text{Bias (\%)} = \left(\frac{\text{Conc} \times \text{fatt. diluiz.}}{\text{Conc}_{\text{nominale}}} \times 100 \right) - 100$$

Verifica foglio di calcolo

DATA	xx	Unità di	
[NON DILUITO]	110	misura: ng/L	

FATTORE DILUIZIONE	2		
	RISULTATO REPLICATI	CORRETTO FATT. DILUIZ.	BIAS %
	55	110	0.0
	56	112	1.8
	45	90	-18.2
	56	112	1.8
	45	90	-18.2
MEDIA	102.8		-6.5
DS	11.7		

9. Stabilità di Reagenti e Soluzioni

Il foglio di calcolo consente di valutare la stabilità di un reagente o di una soluzione in diverse condizioni di temperatura, intervalli di tempo e cicli di congelamento/scongelamento. Per testare la stabilità di più soluzioni, è necessario utilizzare copie dello stesso foglio. La stabilità della soluzione viene valutata in maniera indiretta confrontando la concentrazione di controlli di qualità analizzati utilizzando la soluzione preparata al momento (T0) con quella ottenuta analizzando la stessa soluzione dopo conservazione. Il confronto viene fatto su 3 aliquote indipendenti ad almeno 2 concentrazioni differenti (low e high) dell'analita.

Il bias percentuale viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{Bias (\%)} = \left(\frac{\text{Conc QC}}{\text{Conc QC}_{\text{media T0}}} \times 100 \right) - 100$$

Verifica foglio di calcolo

PREPARATA AL MOMENTO		CONSERVAZIONE							
TEMPO	T0	1°				2°			
DATA	xx	xx				xx			
[LOW QC]	5.2	xx				xx			
	5.1	BIAS %				BIAS %			
	4.9	4.9				4.9			
MEDIA	5.1	-3.3				-3.3			
[HIGH QC]	12.0	4.5				4.5			
	12.3	-11.2				-11.2			
	12.5	4.6				4.6			
MEDIA	12.3	-3.3				-3.3			
Unità di misura: ng/L		MEDIA				MEDIA			
		-36.4				-36.4			

CICLI CONGELAMENTO/SCONGELAMENTO [indicare temperatura di conservazione campione]									
DATA	1°	2°	3°	xx	xx	xx	xx	xx	xx
	BIAS %	BIAS %	BIAS %	BIAS %	BIAS %	BIAS %	BIAS %	BIAS %	BIAS %
[LOW QC]	4.9	-3.3	4.7	-7.2	3.6	-28.9			
	4.5	-11.2	4.5	-11.2	4.0	-21.1			
	5.3	4.6	4.1	-19.1	4.3	-15.1			
MEDIA	-3.3		-12.5		-21.7				
[HIGH QC]	8.0	-34.8	8.0	-34.8	8.0	-34.8			
	7.5	-38.9	7.5	-38.9	7.5	-38.9			
	7.9	-35.6	7.9	-35.6	7.9	-35.6			
MEDIA	-36.4		-36.4		-36.4				

10. Stabilità dei Campioni

Il foglio di calcolo valuta la stabilità del campione considerando le diverse condizioni di conservazione del prelievo, della matrice (inclusi i cicli congelamento/scongelo) e in seguito a processamento. Per ogni condizione di conservazione (indicare tempo, temperatura ed esposizione alla luce) vengono testati due livelli di concentrazione (low e high), ciascuno in triplicato.

Il bias percentuale rispetto il campione appena prelevato (T0) viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\text{Bias (\%)} = \left(\frac{\text{Conc}_{\text{conservato}}}{\text{Conc}_{\text{media T0}}} \times 100 \right) - 100$$

Verifica foglio di calcolo

CAMPIONE PRIMARIO	
TEMPO	T0
DATA	xx
[LOW]	5.2
	5.1
	4.9
MEDIA	5.1
[HIGH]	12.0
	12.3
	12.5
MEDIA	12.3

Unità di misura: ng/L

CONSERVAZIONE PRELIEVO		
T°	xx	
LUCE	xx	
TEMPO	xx	
DATA	xx	
[LOW]		BIAS %
	4.9	-3.3
	4.5	-11.2
MEDIA	5.3	4.6
		-3.3
[HIGH]	8.0	-34.8
	7.5	-38.9
	7.9	-35.6
MEDIA		-36.4

CONSERVAZIONE MATRICE							
T°	4-8°C				<20°C		
LUCE	Buio/Luce non diretta/diretta				Buio/Luce non diretta/diretta		
TEMPO	xx		xx		xx		xx
DATA	xx		xx		xx		xx
[LOW]		BIAS %		BIAS %		BIAS %	BIAS %
	4.9	-3.3					
	4.5	-11.2					
MEDIA	5.3	4.6					
		-3.3					
[HIGH]	8.0	-34.8					
	7.5	-38.9					
	7.9	-35.6					
MEDIA		-36.4					

CICLI CONGELAMENTO/SCONGELAMENTO MATRICE [indicare temperatura]					
DATA	1°		2°		3°
	xx		xx		xx
[LOW]		BIAS %		BIAS %	BIAS %
	4.9	-3.3			
	4.5	-11.2			
MEDIA	5.3	4.6			
		-3.3			
[HIGH]	8.0	-34.8			
	7.5	-38.9			
	7.9	-35.6			
MEDIA		-36.4			

11. Incertezza di Misura

Il foglio di calcolo consente di stimare in via preliminare l'incertezza di misura utilizzando i risultati dei CQI analizzati nelle prove relative alla valutazione della precisione del metodo. Si precisa che, per una stima definitiva, è necessario considerare la variabilità su un periodo di osservazione di almeno sei mesi, al fine di includere tutte le possibili variazioni delle condizioni operative (ad esempio, diversi lotti di reagenti, operatori, ecc.). Questo foglio di calcolo non è invece applicabile considerando i risultati delle VEQ che invece devono essere elaborati secondo il modello di calcolo NORTEST.

L'incertezza di misura composta (u_c) viene calcolata su tre livelli di concentrazione (Livello 1, 2 e 3) considerando le due componenti della variabilità (casuale e sistematica) sommate secondo la legge di propagazione degli errori.

La componente casuale è relativa alla imprecisione del laboratorio (u_{RW}) e corrisponde alla deviazione standard calcolata durante la valutazione della precisione. La componente sistematica (u_{bias}) è a sua volta composta dall'errore quadratico medio del bias e dall'incertezza del valore assegnato come riferimento (u_{cRef}).

Di seguito sono riportate le formule impostate nel foglio di calcolo:

$$u_{cRef} = \frac{U_{Ref}}{2}$$

dove U_{ref} è l'incertezza espansa del materiale certificato con fattore di copertura $k = 2$.

$$Bias = Conc_{laboratorio} - Conc_{nominale}$$

$$u_{bias} = \sqrt{\left(\frac{Bias}{\sqrt{3}}\right)^2 + u_{cRef}^2}$$

$$u_c = \sqrt{u_{RW}^2 + u_{bias}^2}$$

L'incertezza espansa (U) viene ottenuta moltiplicando l'incertezza composta per un fattore di copertura (k), che risulta essere pari a 2 per un livello di confidenza (1- α) corrispondente al 95% e viene poi espressa come percentuale utilizzando le seguenti formule:

$$U = u \times 2$$

$$U\% = \frac{U}{Conc_{laboratorio}} \times 100$$

Verifica foglio di calcolo

MATERIALE DI RIFERIMENTO	CONCENTRAZIONE	LIVELLO 1	LIVELLO 2	LIVELLO 3
		10	30	50
		0.5	1	1
LABORATORIO	INCERTEZZA (u_{cRef})	0.25	0.5	0.5
	MEDIA	12	31	52
	IMPRECISIONE (u_{RW})	0.5	1.0	1
	BIAS	2.0	1.0	2.0
	INCERTEZZA BIAS (u_{bias})	1.18	0.76	1.26
	INCERTEZZA COMPOSTA (u_c)	1.28	1.26	1.35
	INCERTEZZA ESPANSA (U)	2.57	2.52	2.71
	INCERTEZZA ESPANSA RELATIVA (U%)	21.4	8.1	5.2