

Valutazione dell'incertezza di misura: esperienza di un laboratorio accreditato per gli OGM



*Dott. Stefano De Martin ARPA Friuli Venezia Giulia RGQ
Dipartimento di Pordenone*

**L'accreditamento dei laboratori per la sicurezza
alimentare**

Istituto Superiore di Sanità - Roma 25-26- ottobre 2005

Principio del metodo ...

Il metodo consiste nell'estrazione del DNA dalla matrice e successiva amplificazione e quantificazione del gene (parte di DNA) di interesse



La quantificazione del gene avviene attraverso la tecnica chiamata

PCR real time

....cenni sulla tecnica PCR: Polymerase Chain Reaction



Reazione di Polimerizzazione a catena in vitro in grado di amplificare fino 10^8 una sequenza di DNA. Essa sfrutta l'azione dell'attività enzimatica di una DNA POLYMERASI (TAQ) per duplicare uno specifico frammento di DNA delimitato alle sue estremità da due PRIMERS (oligonucleotidi). L'analisi consiste nel sottoporre il campione di reazione a cicli termici successivi per ottenere l'amplificazione sfruttando la proprietà di resistenza alla temperatura (95°C) della TAQ polimerasi.



FORMULA DELLA PCR

Correlazione tra la quantità di DNA amplificato e quello iniziale

$$Y = X (1 + E)^{n - 1}$$

Y = Quantità di DNA amplificato in PCR

X = Quantità di DNA iniziale

E = Efficienza dell' Amplificazione

n = numero di cicli

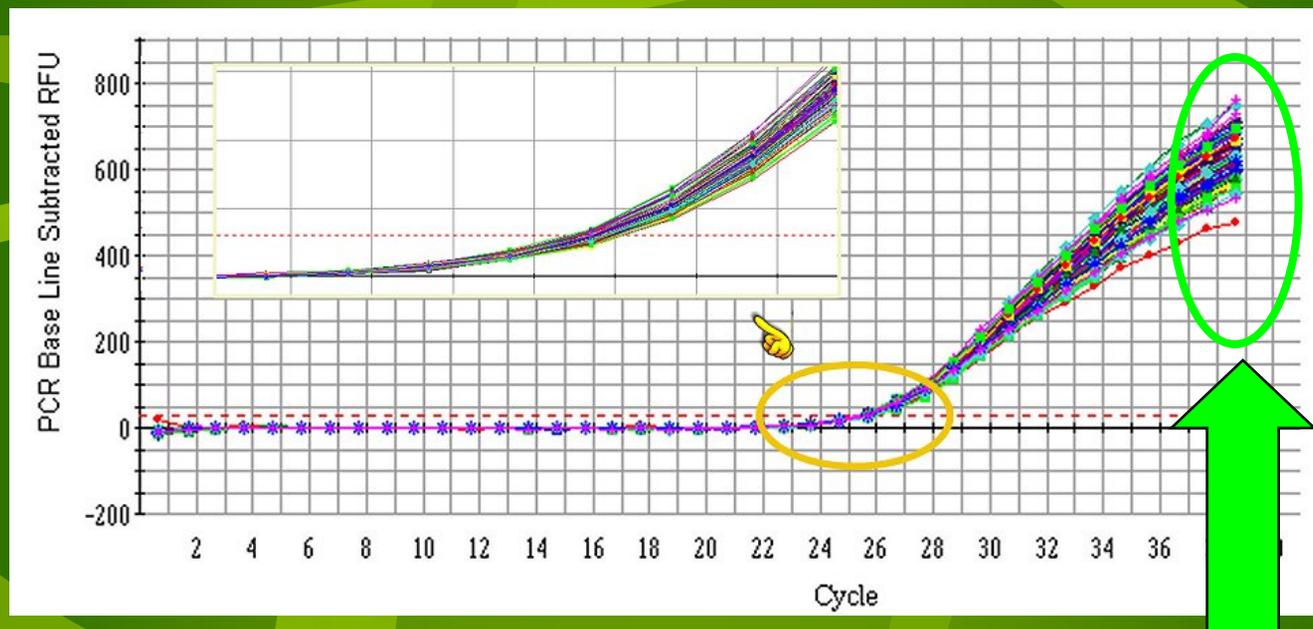


**FORMULA
TEORICA**

Nella realtà durante l'AMPLIFICAZIONE l'ENZIMA e i PRIMERS perdono la loro efficacia cui consegue una variazione dell'EFFICIENZA - E. Ad ogni piccola variazione di E, durante l'AMPLIFICAZIONE, segue una grande variazione di Y(DNA) Amplificato. **PERCIO' PER QUANTIFICARE IL DNA SI RICORRE AD ALTRE TECNICHE TRA CUI LA PCR REAL-TIME**

Esempio di un Grafico di PCR Real -Time

Il grafico indica come 96 repliche di reazioni identiche hanno differenti valori di EFFICIENZA alla fine della reazione. Il DNA viene perciò quantificato nella fase esponenziale dell' Amplificazione



Qual'è il migliore momento per ottenere informazioni QUANTITATIVE?

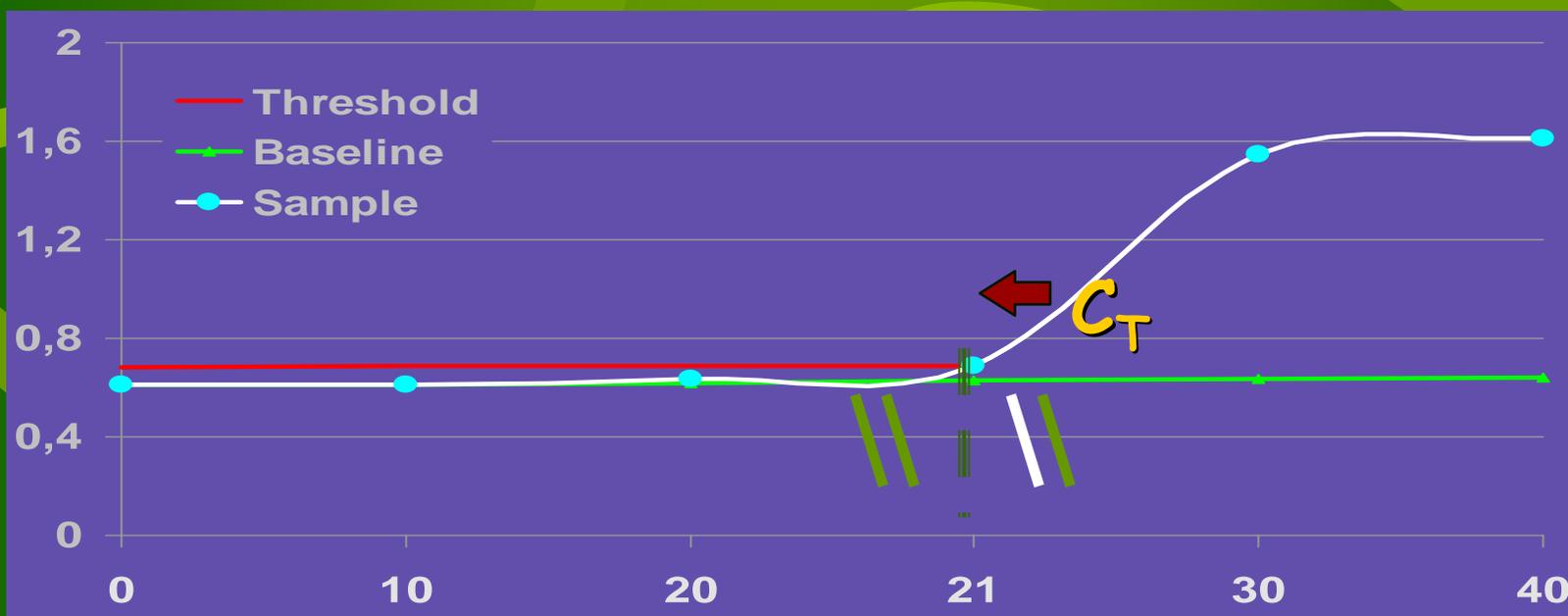
- Durante la fase esponenziale
 - Non ci sono fattori limitanti (la TAQMan e I PRIMERS funzionano)

...ma qual'è il momento migliore per effettuare la lettura spettrofluorimetrica al fine di quantificare il DNA ???

Introduzione al Threshold

Definizioni:

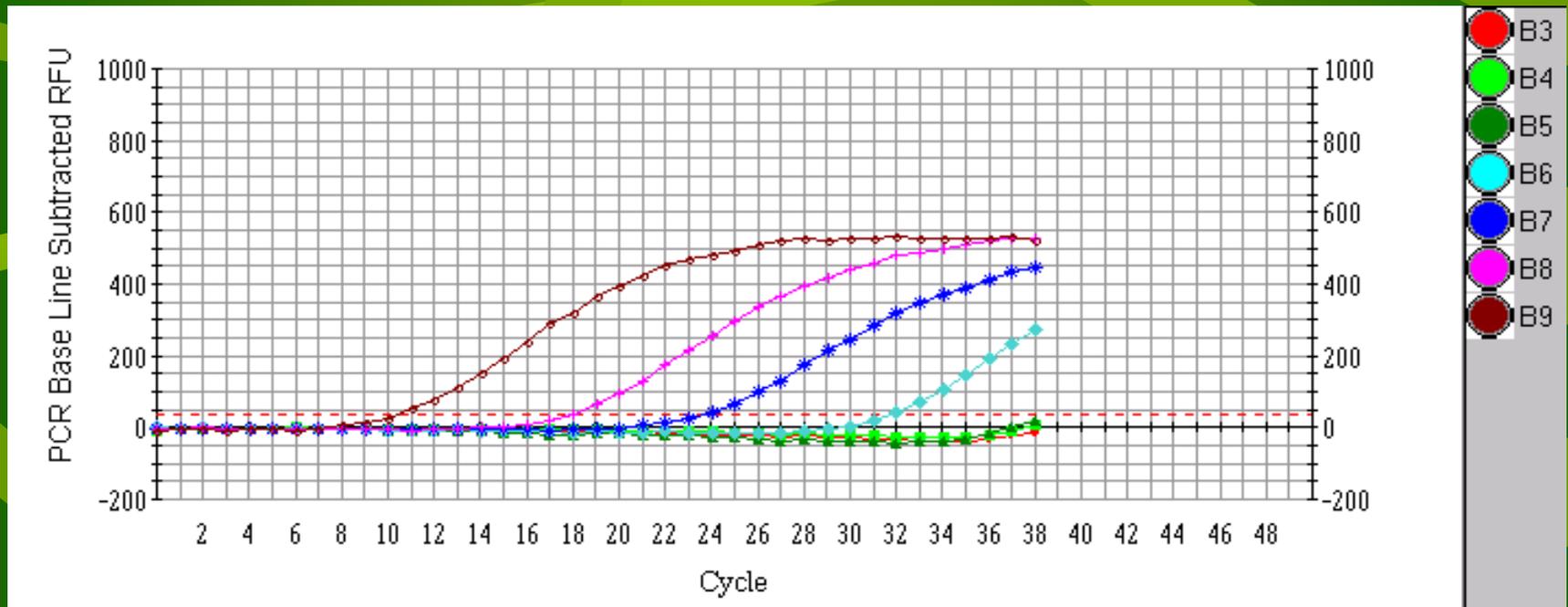
- Linea di Base: calcolata sulla fluorescenza nei primi 15 cicli di tutti i pozzetti di reazione.
- Threshold: Soglia. Calcolato sulla fluorescenza nei primi 15 cicli + 10 deviazioni standard.
- CT: ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione supera il Threshold ed esso dipende dalla concentrazione del gene ricercato.



Il Ciclo di Threshold, C_T

■ E' strettamente correlato con la quantità iniziale di DNA

- ◆ Dal Grafico si evince: se l'amplificato è il doppio il C_T ha un valore minore;
- ◆ Se l'amplificato è la metà il C_T si raggiunge un ciclo prima.



Il Ciclo Threshold, CT, è correlabile con il DNA del campione

Correlation Coefficient: 0.999 Slope: -3.515 Intercept: 40.422 $Y = -3.515X + 40.422$

□ Unknowns
○ Standards



PCR Standard Curve: C:\PROGRAMMI\BIO-RAD\CYCLER\User1\Fano.opd

Calcolo della concentrazione % di OGM

PERCENTUALE DI MATERIALE TRANSGENICO

La percentuale di materiale transgenico è determinata come rapporto tra il DNA transgenico e quello endogeno

$$\% \text{ Transgenico} = \frac{\text{SQ sistema transgenico}}{\text{SQ sistema endogeno}} \times 100$$

VALIDAZIONE DEL METODO

OGM parametri caratteristici di un metodo analitico

- Specificità e selettività
- Limite di rilevabilità (LOD)
- Limite di quantificazione (LOQ)
- Intervallo di lavoro ed intervallo di linearità
- Esattezza
- Precisione (ripetibilità e riproducibilità)
- Sensibilità
- Robustezza
- Incertezza
- Recupero

Conseguenze del calcolo per gli OGM

- Risultato espresso come rapporto
- Quale gene scegliere come quantificatore (35 S, Bt176, Bt11, Mon810.....)
- Il risultato è la combinazione di due determinazioni simultanee di due "analiti" distinti (endogeno ed esogeno)

approccio alla validazione del metodo analitico **CRITICITA'**

- Assenza di metodi normalizzati (metodo validato da CRL per Bt 11)
- Difficoltà di reperimento standard per tarare lo strumento della PCR
- Taratura eseguita con CRM
- Materiali di riferimento certificati già con una significativa incertezza

**VALIDAZIONE DEL METODO
PER LA DETERMINAZIONE
DI ORGANISMI
GENETICAMENTE
MODIFICATI (OGM) IN
MAIS ED ALIMENTI A BASE
DI MAIS**

p.i. Antonella Felice, Dott. Sandro Ceccone

METODO RT PCR

PARAMETRI VALIDAZIONE

Curva di taratura del gene endogeno Zeina

	Conc. standard (ng)	Log conc.	Replica Nr.	Segnale Ct
1° punto curva	170	2,23	1	22,72
	170	2,23	2	22,64
	170	2,23	3	22,90
2° punto curva	56,7	1,75	1	24,23
	56,7	1,75	2	24,10
	56,7	1,75	3	24,10
3° punto curva	18,9	1,28	1	26,01
	18,9	1,28	2	26,01
	18,9	1,28	3	26,02
4° punto curva	6,3	0,80	1	27,66
	6,3	0,80	2	27,59
	6,3	0,80	3	27,76
5° punto curva	2,1	0,32	1	29,36
	2,1	0,32	2	29,19
	2,1	0,32	3	29,22

PARAMETRI DELLA REGRESSIONE LOGARITMICA

Retta non passante per l'origine

Punti della curva	15		
Nr. Repliche	3		
scarto tipo residui	0,131		
Pendenza b (sensibilita')	-3,47		
scarto tipo di b: s_b	0,0501		
Intercetta a	30,4		
scarto tipo di a: s_a	0,0723		
Coefficiente di correlazione r	-0,99864		
Coefficiente di determinazione R^2	0,99729		
Analisi dei residui	favorevole		
ANOVA (95%,1,n-2)	SI	4782,54	F tabulato (95%,1,n-2) 4,67

PARAMETRI VALIDAZIONE

PARAMETRI DELLA REGRESSIONE LOGARITMICA

Retta non passante per l'origine

Punti della curva	15	<p>Curva di taratura del gene esogeno (promotore) 35 S</p>	
Nr. Repliche	3		
scarto tipo residui	0,307		
Pendenza b (sensibilita')	-3,55		
scarto tipo di b: s_b	0,118		
Intercetta a	32,9		
scarto tipo di a: s_a	0,0938		
Coefficiente di correlazione r	-0,99294		
Coefficiente di determinazione R^2	0,98593		
Analisi dei residui	favorevole		
ANOVA (95%,1,n-2)	SI	910,93	F tabulato (95%,1,n-2) 4,67

PARAMETRI DELLA REGRESSIONE LOGARITMICA

Retta non passante per l'origine

Punti della curva	13	<p>Curva di taratura del gene esogeno Bt 176</p>	
scarto tipo residui	0,316		
Pendenza b (sensibilita')	-3,57		
scarto tipo di b: s_b	0,135		
Intercetta a	30,6		
scarto tipo di a: s_a	0,102		
Coefficiente di correlazione r	-0,99230		
Coefficiente di determinazione R^2	0,98466		
Analisi dei residui	favorevole		
ANOVA (95%,1,n-2)	SI		

PARAMETRI VALIDAZIONE

valutati sul gene esogeno (promotore 35 S)

	<i>IRMM</i> 413S-2	<i>IRMM</i> 413S-3	<i>IRMM</i> 413S-5.	Test Shapiro-Wilk (5%)			
Nr. Ripetizioni	6	5	6	SQ	0,05893	0,06622	1,7600
Conc. teorica (%)	0,50	1,0	5,0	b	0,2392	0,2354	1,2534
Incertezza dichiarata	± 0,04	± 0,05	± 0,2	W	0,971	0,837	0,893
				Z	1,18	1,01	0,52
Repliche				Esito	accett.	accett.	accett.
1	0,54	1,04	5,9	Test Dixon (1%)			
2	0,49	0,83	4,5	R(basso)	0,37	0,11	0,38
3	0,58	1,02	5,1	Esito	accett.	accett.	accett.
4	0,71	1,08	5,1	R(alto)	0,39	0,14	0,13
5	0,52	0,8	5,1	Esito	accett.	accett.	accett.
6	0,38		6,1				
Conc. media sperimentale	0,54	0,95	5,3				
Scarto tipo	0,11	0,13	0,59				
Esattezza (t test)							
Lim. Conf. Superiore (95 % n-1)	0,65	1,11	5,92				
Lim. Conf. Inferiore (95 % n-1)	0,42	0,79	4,67				
Calcolo funz. discrim. (t calc)	0,76	0,73	1,15				
Metodo esatto ?	SI	SI	SI				
Precisione							
Limite di ripetibilità	0,39	0,50	2,15				
C.V. %	20,0	13,5	11,2				



PARAMETRI VALIDAZIONE

valutati sul gene esogeno (promotore 35 S)

Limite di quantificazione (LOQ)

		Test Shapiro-Wilk (5%)	
Nr. Ripetizioni	6	SQ	0,00109
Conc. Teorica (%)	0,1	b	0,0318
t di Student (95 % n-1)	2,571	W	0,928
		Z	0,03
Prova nr.		Esito	positivo
1	0,08	Test Dixon (1%)	
2	0,11	R(basso)	0,25
3	0,09	Esito	accett.
4	0,09		
5	0,095	R(alto)	0,25
6	0,12	Esito	accett.
Conc. Media sperimentale	0,0975		
Scarto tipo	0,0147		
Esattezza (test t)			
lim conf. Superiore (95 % n-1)	0,1130		
lim conf. Inferiore (95 % n-1)	0,0820		
Test t esatto ?	SI		
Precisione (S)			
CV%	15,12		



PARAMETRI VALIDAZIONE

valutati sul gene esogeno Bt 176

	IRMM 411R-2	IRMM 411R-3	IRMM 411R-5.	Test Shapiro-Wilk (5%)			
Nr. Ripetiz ioni	5	6	5	SQ	4,8000	0,25653	38,7480
Conc. teorica (%)	0,50	1,0	5,0	b	1,9875	0,4574	6,1677
Incertezza dichiarata	± 0,06	± 0,08	± 0,18	W	0,827	0,816	0,982
				Z	1,13	1,39	1,42
repliche				Esito	accett.	accett.	accett.
1	0,40	1,10	4,40	Test Dixon (1%)			
2	0,58	1,06	5,20	R(basso)	0,04	0,04	0,35
3	0,50	1,54	4,30	Esito	accett.	accett.	accett.
4	0,40	1,00	7,0	R(alto)	0,67	0,26	0,33
5	0,35	1,02	4,85	Esito	accett.	accett.	accett.
6		1,40					
Conc. media sperimentale	0,446	1,167	5,150				
Scarto tipo	0,093	0,225	1,095				
Esattezza (t test)							
Lim. Conf. Superiore (95 % n-1)	0,561	1,402	6,510				
Lim. Conf. Inferiore (95 % n-1)	0,331	0,930	3,790				
Calcolo funz. discrim. (t calc)	1,06	1,66	0,30				
Metodo esatto ?	SI	SI	SI				
Precisione							
Limite di ripetibilità	0,36	0,81	4,30				
C.V. %	20,8	19,3	21,3				



PARAMETRI VALIDAZIONE

valutati sul gene esogeno Bt 176
limite di quantificazione LOQ

		Test Shapiro-Wilk (5%)	
Nr. Ripetizioni	5	SQ	0,00212
Conc. Teorica (%)	0,1	b	0,0447
Incertezza	$\pm 0,029$	W	0,943
t di Student (95 % n-1)	2,77	Z	0,26
Prova nr.		Esito	positivo
1	0,10	Test Dixon (1%)	
2	0,08	R(basso)	0,17
3	0,09	Esito	accett.
4	0,11	R(alto)	0,50
5	0,14	Esito	accett.
Conc. Media sperimentale	0,105		
Scarto tipo	0,0223		
Esattezza (test t)			
lim conf. Superiore (95 % n-1)	0,1328		
lim conf. Inferiore (95 % n-1)	0,0772		
Test t esatto ?	SI		
Precisione (S)			
CV%	21,30		



OSSERVAZIONI AL METODO...

- Metodo PCR utilizza dei reagenti (primer, sonde fluorescenti, oligonucleotidi, dna-polimerasi, proteine) che sono facilmente soggetti a degradazioni, inattivazioni, contaminazioni ecc
- Fondamentale l'estrazione del DNA, la sua qualità e la sua quantità iniziale nel pozzetto della PCR influenzano in modo significativo l'andamento dell'amplificazione e quindi della quantificazione
- Amplificazione tempo-dipendente di difficile ripetibilità (segnale transiente)
- Quantificazione in base a tecniche fluorescenti
- Curva di taratura logaritmica
- Materiale di riferimento certificato (CRM) già con discreta incertezza

PARAMETRI VALIDAZIONE

confronto tra risultati ottenuti dei due geni esogeni 35 S(promotore) e Bt 176 (transgenico)

Test t per dati appaiati

	Bt 176	35S	differenze
Replica 1	1,22	1,1	0,12
Replica 2	1,06	1,06	0
Replica 3	0,86	1,54	0,68
Replica 4	0,7	1	0,3
Replica 5	0,97	1,02	0,05
Replica 6	1,22	1,4	0,18
scarto tipo	0,21	0,23	0,25
media	1,01	1,19	0,22

$$t_{calc} = \frac{\bar{D} - 0}{S_{\bar{D}} / \sqrt{n}} = 2,19$$

$$t_{tab(95\%, 6)} = 2,57$$



La quantificazione del 35 S e del Bt 176 è equivalente dal punto di vista statistico

CRITERI ACCETTATI PER LA VALUTAZIONE DELL'INCERTEZZA

- Approccio classico metrologico (GUM o bottom up) UNI CEI ENV 13005
- Approccio olistico o decostruttivo (tradizionale chimico o top-down), sperimentazione secondo ISO 5725
- Approccio secondo Horwitz

APPROCCIO METROLOGICO

VALIDAZIONE DEL METODO PER LA
DETERMINAZIONE DI ORGANISMI
GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM) IN MAIS ED
ALIMENTI A BASE DI MAIS

CONTRIBUTI SIGNIFICATIVI ALL'INCERTEZZA

Criterio metrologico

- Contributo di ripetibilità;
- Contributo della variabilità della taratura strumentale per il gene endogeno (Zeina);
- Contributo della variabilità della taratura strumentale per il gene esogeno (35 S o Bt 176);
- Contributo dell'incertezza del materiale di riferimento;

CONTRIBUTI SIGNIFICATIVI ALL'INCERTEZZA (valori relativi)

Critero metrologico, calcolo per il 35 S OGM 1 % (IRMM)

- Contributo di ripetibilità
0,13684
- Contributo della variabilità della taratura
strumentale per il gene endogeno (Zeina)
0,0112
- Contributo della variabilità della taratura
strumentale per il gene esogeno (35 S)
1,15
- Contributo dell'incertezza del materiale di
riferimento
0,025

CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA (I)

Critério metrologico

Legge generale di propagazione delle
incertezze

$$\dot{u}_s = \sqrt{\sum \dot{u}_i^2}$$

$$\dot{u}_s = \sqrt{\dot{u}_{rip}^2 + \dot{u}_{tar35S}^2 + \dot{u}_{tarBt176}^2 + \dot{u}_{CRM}^2}$$

CALCOLO DELL'INCERTEZZA DI MISURA (II)

Criterio metrologico

Incertezza composta relativa per 35 $s = 1,1224$

Incertezza estesa (95%) per 35 $s = 2,14$

**RISULTATO DECISAMENTE
"IMPROPONIBILE"**

APPROCCIO OLISTICO

Approccio classico di tipo chimico

**VALIDAZIONE DEL METODO PER LA
DETERMINAZIONE DI ORGANISMI
GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM) IN MAIS ED
ALIMENTI A BASE DI MAIS**

APPROCCIO OLISTICO: FONDAMENTI

LA GRANDEZZA SIGNIFICATIVA
PRESA IN CONSIDERAZIONE
COME PARAMETRO
FONDAMENTALE PER LA
VALUTAZIONE DELL'INCERTEZZA
È LA RIPRODUCIBILITÀ DEL
METODO

ESERCIZI DI INTERCALIBRAZIONE: TIPOLOGIE

Critério olistico

TRA GLI ESERCIZI INTERLABORATORIO DISTINGUIAMO TRE TIPOLOGIE:

- ✓ Method Performance Study (Collaborative Trial);
- ✓ Certification Study;
- ✓ Proficiency Study (ring-test).

Dati del metodo a disposizione

Critério olistico

- Ring test TECNA F109-1/1 MAIS (MON 810) →
- Ring test TECNA F109-2/1 MAIS (MON 810) →
- Ring test GEMMA (FAPAS) M 1 Bt 176 →
- Risultati studio collaborativo Mais Bt 11
(metodo validato da CRL per Bt 11)

Dati del metodo a disposizione (II)

Criterio olistico

o Ring test TECNA F109-1/1 MAIS
(MON 810)

Valore riferimento = 0,15 %

Valore medio ring test = 0,16 %

Ring test accurato numero laboratori 10

Scarto tipo delle medie $S_M = 0,0984$

Incertezza estesa utilizzando $S_M = 0,197$

Incertezza 0,20% per 0,16 % di concentrazione

Dati del metodo a disposizione (III)

Criterio olistico

o Ring test TECNA F109-2/1 MAIS (MON 810)

Valore riferimento = 0,25 %

Valore medio ring test = 0,23 %

Ring test accurato numero laboratori 10

Scarto tipo delle medie $S_M = 0,1266$

Incertezza estesa utilizzando $S_M = 0,2532$

Incertezza 0,25% per 0,23 % di concentrazione

Dati del metodo a disposizione (IV)

Criterio olistico

o Ring test GEMMA M 1MAIS (MON 810)

Valore riferimento = 2 %

Valore medio ring test = 1,813 %

Ring test accurato numero laboratori 30

Scarto tipo delle medie $S_M = 0,6361$

Incertezza estesa utilizzando $S_M = 1,27$

Incertezza 1,27 % per 2 % di concentrazione

Metodi PCR quantitativa oggetto di studi collaborativi

tratta da Documento tecnico 01 "rilevazione e quantificazione di OGM nei prodotti da agricoltura biologica e fonti di rischio - federazione italiana agricoltura organica

Matrici	Nr. Lab.	% OGM testate	Tecnica	Performances	Rif.to
Sfarinato e proteine di soia	28	0,1% 0,5% 1% 2% 5%	Real-time PCR	Per OGM 1%: RSDr 16,8 RSD 26,8	Bgvv (EU tender report 2000 Buone performances
Sfarinati di mais	19	0% 0,1% 0,5% 1,7% 2%	PCR/ELISA semiquant.	0%: 86,6% ris corretti 0,1%: 29% risultati corretti 1%: 100% risultati corretti 2% risultati corretti	DMFI-GEN, 1999
Soia e Mais semi	20	0% 0,1% 0,5% 1% 5% 10%	Real-time PCR		NFRI, Japan (Shindo et al. 2002)
Sfarinati di soia e Mais (event 176)	23	0,1% 0,5% 1% 2% 5%	Double Competitive PCR	MAIS: 0% 0,1% 0,5% 1%: 85% di risultati corretti 2%: 46% risultati corretti 5%: 23% risultati corretti SOIA: 70-75% risultati corretti	JRC (van den Eede et aal, 2000)
Farina di mais (event 176) e soia (RRS)	26	0,7% 1% 1,4% 1,8% 3%	QC/PCR con ispezione visiva	CaMV 35S per 0,7% 1%: 85% risultati corretti CaMV 35S per 1,4% 1,8% 3%: 89% risultati corretti Gene specifico: 0,7% 1%: 41% risultati corretti Gene specifico: 1,4% 1,8% 3%: 92% risultati corretti	BAG (Pauli et al., 2001)
	8		QC/PCR con image analysis	CaMV 35 su soia: RSDr 22-40% CaMV 35 su mais: RSDr 13-45% RRS specifico: RSDr 11-38% Bt 176 specifico: RSDr 19-36%	

Riepilogo dei dati dello studio collaborativo

Concentrazione OGM (%)	0,1	0,3	0,7	1,0	1,3	2,0
Numero di laboratori	13	13	13	13	13	13
Numero di campioni per laboratorio	2	2	2	2	2	2
Numero di laboratori esclusi dall'elaborazione	2	2	1	3	1	3
Numero di laboratori con risultati affidabili	11	11	12	10	12	10
Numero di dai accettabili	22	22	24	20	24	20
Media	0,1	0,3	0,7	1,0	1,2	1,8
Mediana	0,1	0,3	0,7	1,0	1,2	1,9
Coefficiente di variazione C.V. %	33,4	17,7	21,5	12,1	27,0	18,5
Scarto tipo di ripetibilità relativo RSD_r %	33,5	19,0	24,4	10,4	25,0	14,9
Scarto tipo di ripetibilità s_r	0,04	0,06	0,17	0,11	0,31	0,28
Scarto tipo di riproducibilità relativo RSD_R %	33,5	19,0	24,4	12,7	27,0	18,4
Scarto tipo di riproducibilità s_R	0,04	0,06	0,17	0,13	0,33	0,34
Limite di riproducibilità R ($R=2,8 s_R$)	0,11	0,17	0,48	0,36	0,92	0,95

Dati del metodo a disposizione (V)

Critério olistico

o Risultati studio collaborativo Mais Bt 11 (metodo normalizzato)

Valore riferimento =1 %

Valore medio ring test =1 %

Ring test accurato numero laboratori 13

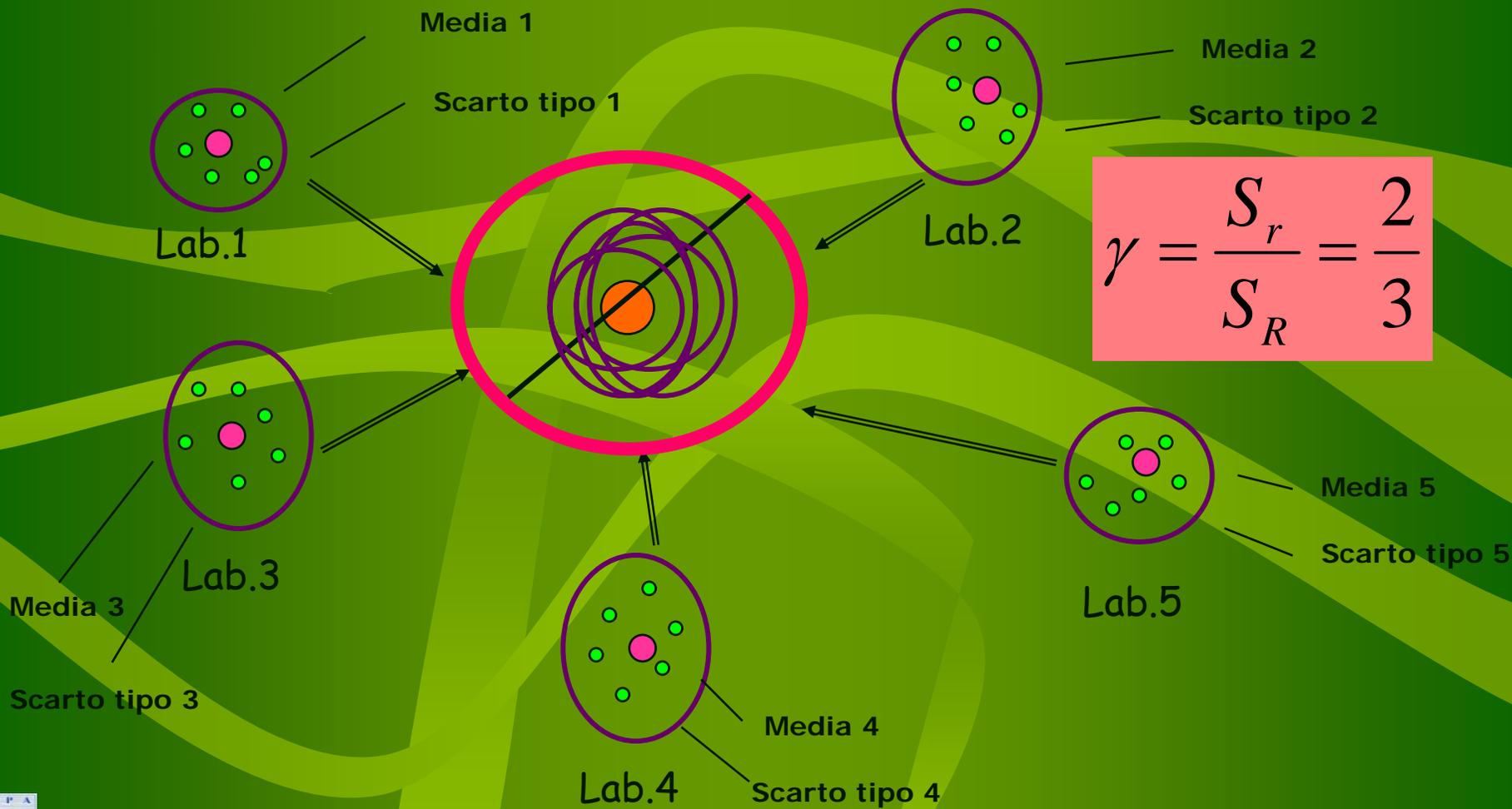
Scarto tipo di riproducibilità 0,13

Incertezza estesa utilizzando $S_R = 0,26$

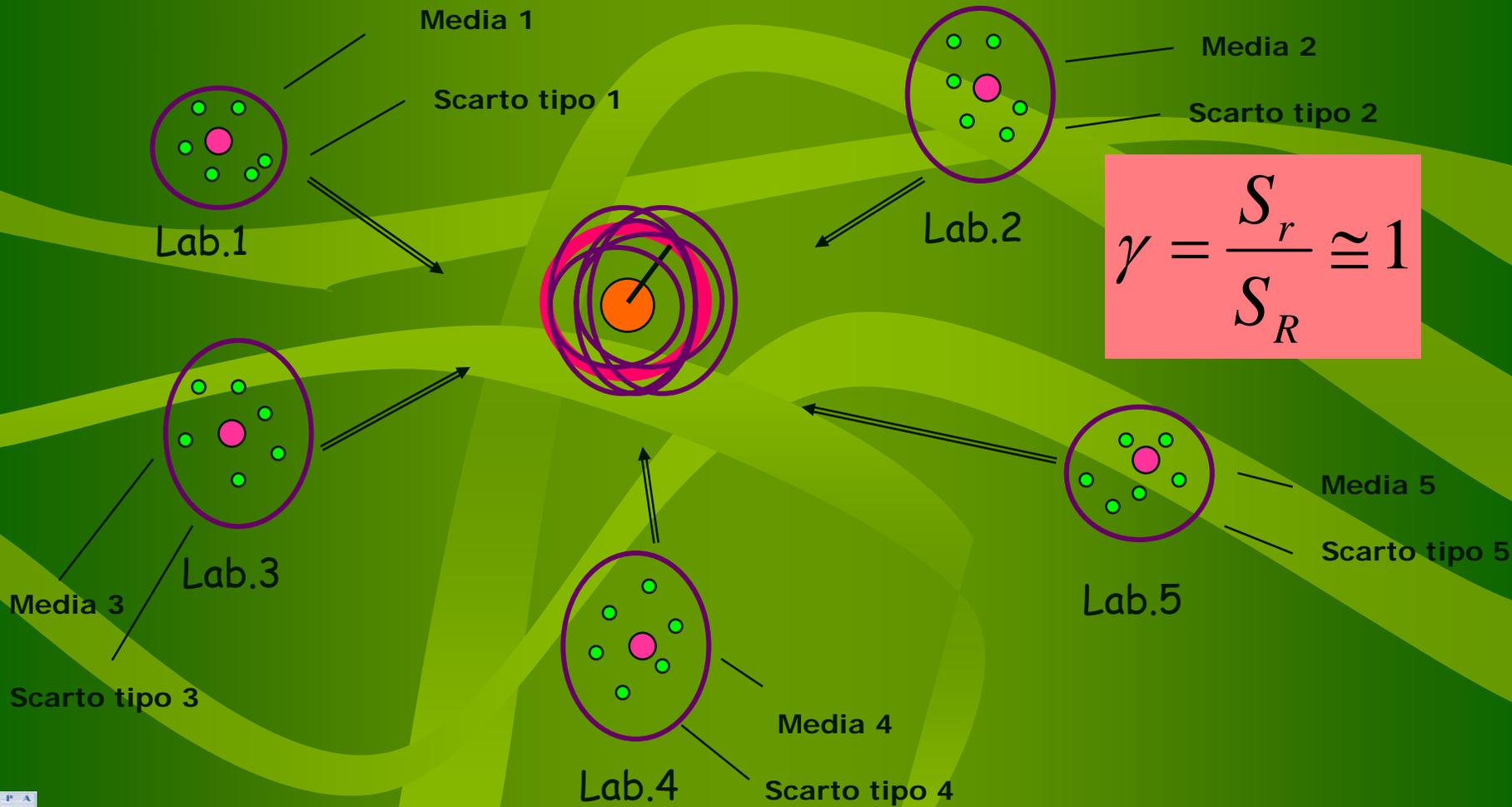
Incertezza 0,26 % per 1 % di concentrazione

Osservazioni ai dati dello studio collaborativo

metodi chimici (ISO 5725 condizione Horwitz)



Osservazioni ai dati dello studio collaborativo caso metodo OGM



Osservazioni ai dati del circuito interlaboratorio

- Forte variabilità intralaboratorio
- Anomalia rispetto al livello di concentrazione dell'1% OGM
- Riproducibilità e ripetibilità confrontabili per tutti i livelli di concentrazione
- L'elevata variabilità, riconoscibile dal valore della ripetibilità "*comprende*" la riproducibilità del metodo

Riepilogo dei dati dello studio collaborativo metodo alternativo T 25

Journal of AOAC International Vol. 87, No.6, 2004 pag. 1342

Concentrazione OGM (%)	0,1	0,6	0,8	1,0	1,2	1,5
Numero di laboratori	13	13	13	13	13	13
Numero di campioni per laboratorio	4	4	4	4	4	4
Numero di laboratori esclusi dall'elaborazione	2	1	1	2	1	2
Numero di laboratori con risultati affidabili	10	11	11	10	11	10
Media	0,11	0,62	0,83	0,97	1,24	1,45
Recupero (%)	112	104	104	97	103	96
RIPETIBILITA'						
Scarto tipo di ripetibilità relativo RSD_r %	15,9	11,8	10,4	12,2	12,9	8,7
Scarto tipo di ripetibilità s_r	0,018	0,073	0,087	0,119	0,160	0,126
RIPRODUCIBILITA'						
Scarto tipo di riproducibilità relativo RSD_R %	16,3	20,3	18,4	25,5	22,9	20,7
Scarto tipo di riproducibilità s_R	0,018	0,126	0,154	0,249	0,284	0,299

CRITERIO HORWITZ

$$CV_R \% = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

$CV_R \%$ = scarto tipo di riproducibilità relativo percentuale
 C = concentrazione come frazione di massa

- Valutazione empirica eseguita per prove chimiche con dati obsoleti
- Alcuni Autori indicano di utilizzare la predittività limitandosi all'intervallo 120 ppb-10 ppm
- Alcuni autori indicano di utilizzare sotto i 120 ppb la seguente: $\sigma_R = 0,22C$

CRITERIO HORWITZ (II)

- Condizioni di applicabilità della relazione

~~Risultato realistico ????????~~

Scarto relativo di riproducibilità desunto
dalla relazione di Horwitz = 0,04 %

Incertezza estesa (95%) = 0,08 %

CONCLUSIONI ???

- ✓ Risulta improponibile il criterio metrologico che sembrerebbe inapplicabile a reazioni di tipo "naturali"
- ✓ Il criterio olistico che utilizza lo scarto tipo di riproducibilità fornisce risultati di incertezza plausibili e facilmente utilizzabili dal laboratorio.
- ✓ Il criterio Horwitz risulta inapplicabile