

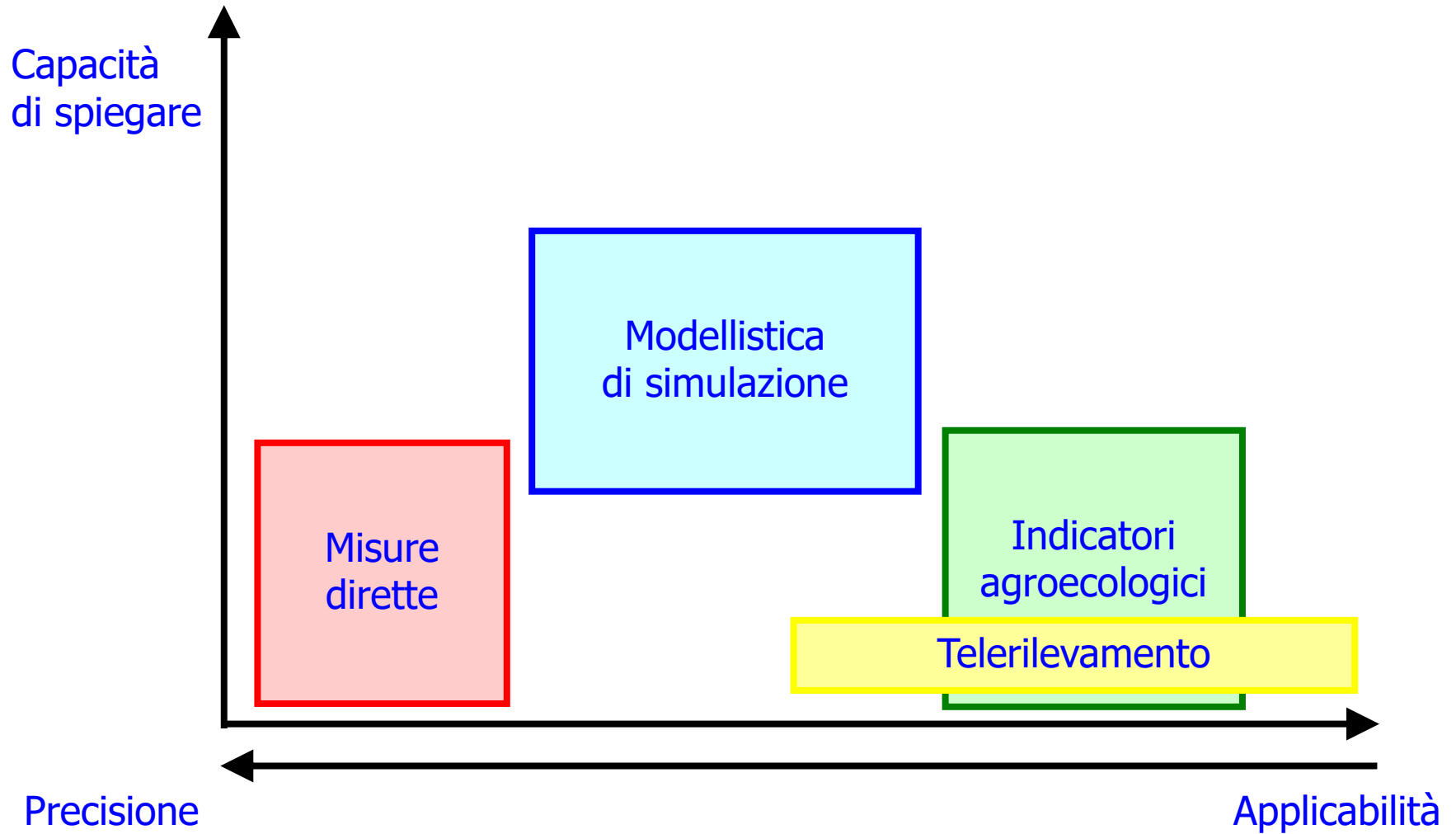


# **Analizzare e gestire sistemi culturali attraverso misure dirette**

## **3. Valutazione/validazione di metodi di analisi/misura**

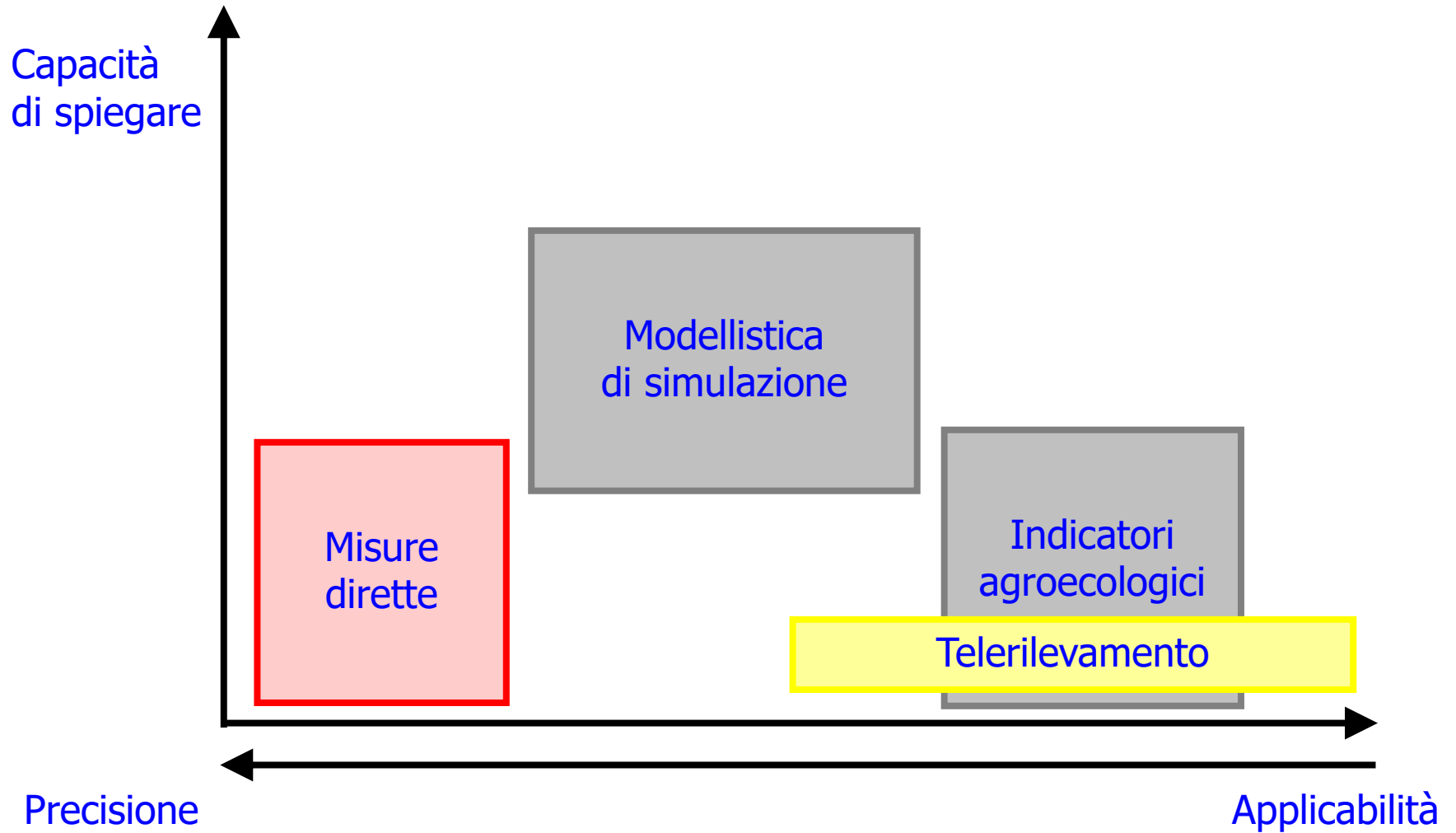


## Sistemi Colturali





## Sistemi Colturali





# Perché *validare* metodi di analisi/misura?

## Sistemi Culturali

Spesso ai metodi di analisi che vengono proposti, non sono associate informazioni chiave, come:

- precisione,
- linearità,
- limiti di rilevabilità,
- ecc.

...e neanche informazioni relative alle **risorse** necessarie per effettuare la misura.



# Perché *validare* metodi di analisi/misura?

## Sistemi Colturali

L'assenza di queste informazioni crea spesso problemi relativi

- alla **manca**za di criteri per scegliere, a seconda delle situazioni (nel nostro caso, risorse disponibili, tipologia di coltura, stadio di sviluppo, ecc.), lo strumento più adatto;
- all'**interpretazione dei risultati** (mancano informazioni standardizzate per fare confronti);
- a **dubbi** sulla ragionevolezza e sulle basi tecniche e scientifiche dei vari metodi.

Sono esattamente i problemi che **normalmente** si incontrano quando si ha a che fare con grandezze di interesse **agronomico-ambientale**.

Spesso addirittura c'è una gran **confusione** sui termini utilizzati.



# Perché *validare* metodi di analisi/misura?

Sistemi Culturali

Per **validazione** di un metodo si intende il processo attraverso il quale si determinano l'**affidabilità** e la **credibilità** di una procedura di analisi **per uno specifico scopo**.

Sono stati proposti **diversi protocolli di validazione** da diversi organismi internazionali (e.g., ISO, FAO)...

Il problema è che questi protocolli sono stati pensati per metodi di analisi... **chimici!**

E questo ha **legittimato** (?) i ***non-chimici* a non occuparsene**, riducendo i ragionamenti per la scelta di un metodo a **chiacchiere da bar**.

Vero però che nel caso di alcune tipologie di analisi (e.g., pH del suolo), la **mancanza di materiali di riferimento** rende spesso **difficile** applicare i **protocolli nella loro interezza** (e.g., nell'esempio del pH del suolo non è possibile valutare la trueness).



# Perché *validare* metodi di analisi/misura?

Sistemi Culturali

E' invece possibile **adattare** i protocolli di validazione, utilizzando **solo alcune delle metriche** che propongono.

Nel caso non esistano materiali di riferimento, ad esempio, è possibile valutare la **precisione** di un metodo, **senza arrivare** alla sua **accuratezza** (che richiede anche la stima della trueness)...

**...ma è MOLTO meglio di niente!**

Noi cercheremo di capire, **tra le varie metriche** proposte dal protocollo ISO, quelle che possiamo applicare per validare **metodi diagnostici** in campo agroambientale.



# Perché *validare* metodi di analisi/misura?

Sistemi Culturali

...è un modo **intellettualmente molto onesto** per presentare nuovi metodi di analisi.

Definire con **chiarezza e rigore i limiti di quanto si propone** è il modo migliore per dare **credibilità** a ciò che si sta proponendo.

Oltre, ovviamente, a garantire la possibilità di effettuare **scelte ragionate tra metodi/strumenti disponibili sul mercato.**





# Validare metodi di analisi/misura

Sistemi Colturali

Field Crops Research 161 (2014) 128–136



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Field Crops Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fcr](http://www.elsevier.com/locate/fcr)



Any chance to evaluate in vivo field methods using standard protocols?



R. Confalonieri<sup>a</sup>, C. Francone<sup>a,\*</sup>, M.E. Chiodini<sup>a</sup>, E. Cantaluppi<sup>b</sup>, L. Caravati<sup>b</sup>, V. Colombi<sup>b</sup>,  
D. Fantini<sup>b</sup>, I. Ghiglieno<sup>b</sup>, C. Gilardelli<sup>a</sup>, E. Guffanti<sup>b</sup>, M. Inversini<sup>b</sup>, L. Paleari<sup>a</sup>,  
G.G. Pochettino<sup>b</sup>, S. Bocchi<sup>a</sup>, S. Bregaglio<sup>a</sup>, G. Cappelli<sup>a</sup>, P. Dominoni<sup>a</sup>, N. Frasso<sup>a</sup>,  
T. Stella<sup>a</sup>, M. Acutis<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Università degli Studi di Milano, Department of Agricultural and Environmental Sciences—Production, Landscape, Agroenergy, Cassandra lab, Via Celoria 2, I-20133 Milan, Italy

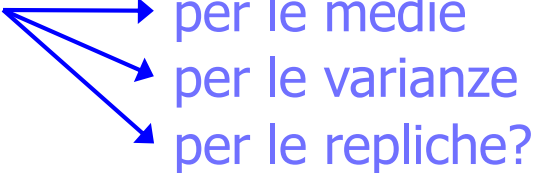


<sup>b</sup> Università degli Studi di Milano, Students of the Cropping Systems Ms Course, Via Celoria 2, I-20133 Milan, Italy



# Validare metodi di analisi/misura

Sistemi Culturali

Validazione di metodi secondo ISO 5725:

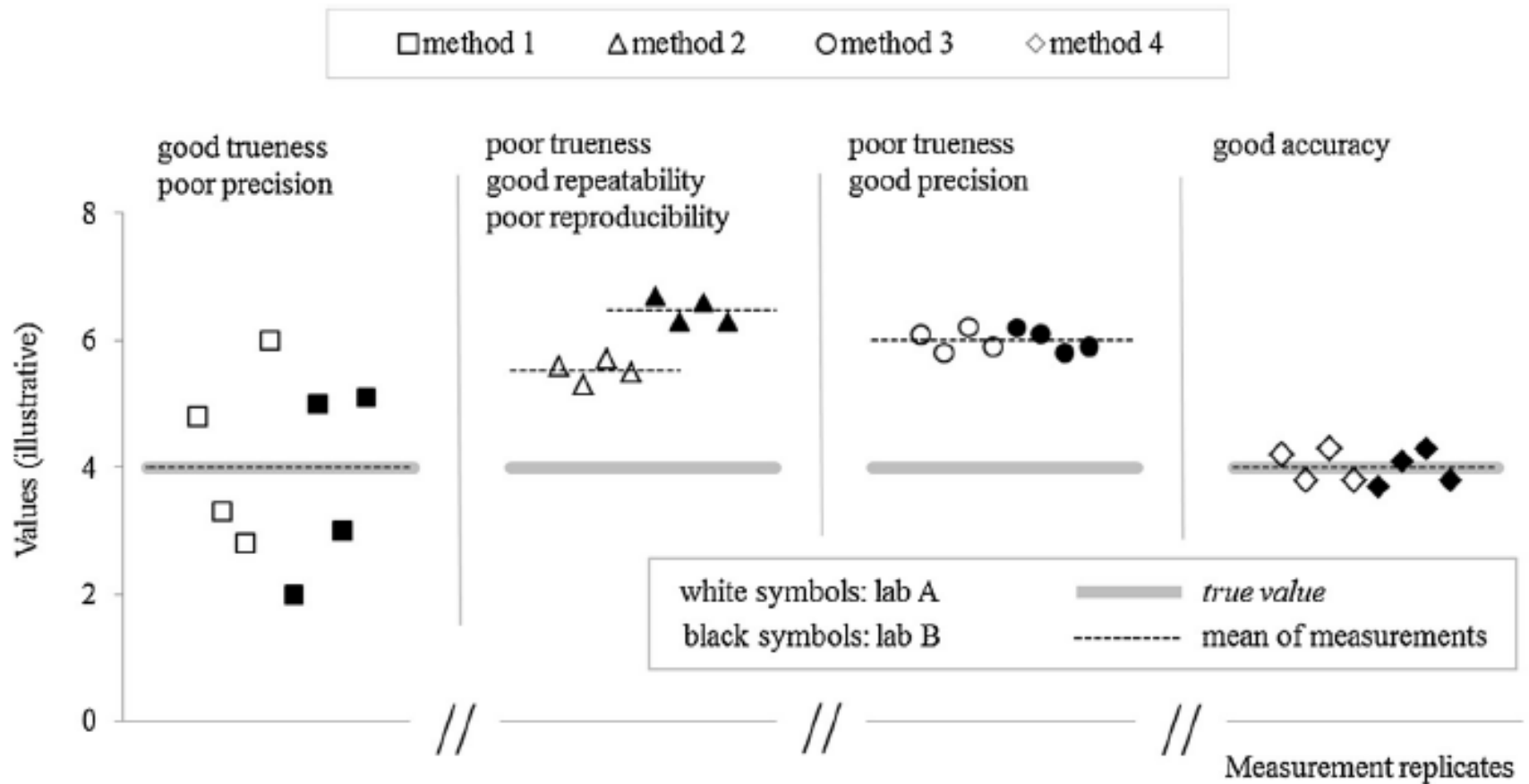
- normalità
- identificazione di outliers 
  - per le medie
  - per le varianze
  - per le repliche?
- limite di rilevabilità
- limite di quantificabilità
- specificità
- linearità
- accuratezza 
  - trueness (veridicità)
  - precisione 
    - ripetibilità stretta
    - ripetibilità intermedia
    - riproducibilità
- robustezza



# Validare metodi di analisi/misura

Sistemi Culturali

Accuratezza, precisione...





# Validare metodi di analisi/misura

## Sistemi Culturali

Disegno sperimentale (ISO 5725) – ring trial

- più laboratori (riproducibilità)
- più livelli dell'analita (linearità, ecc.)
- più repliche per ciascun livello di analita
- più operatori per ciascun laboratorio
- i campioni con i vari livelli devono essere forniti come materiali di riferimento (trueness, ecc.)

Ovviamente noi non potremo fare tutto, dato che i nostri metodi (e quelli con i quali li confronteremo) non hanno materiali di riferimento...

bisognerebbe «**fare**» **una pianta con certe caratteristiche note e volute**... anche se, potremmo, un po' ardimentosamente, tentare...

Inoltre, dobbiamo pensare a come trasferire il concetto dei **più laboratori**...



# Normalità

## Sistemi Culturali

Si applicano test per verificare se l'ipotesi nulla –  $H_0$ , dati distribuiti normalmente – è da rigettarsi o meno.

La norma ISO suggerisce di usare il test di Shapiro-Wilk (è il più utilizzato), anche se per campioni molto grandi ( $n > 40$ ) è meglio usarne altri (e.g., D'Agostino-Pearson).



# Identificazione di outliers

## Sistemi Culturali

ISO suggerisce:

- di valutare la presenza di outliers per livello e solo tra laboratori;
- in termini di varianze e di medie.

In questo caso, potrebbe esserci il **rischio che una singola replica** (per un dato livello) completamente sbagliata, possa portare ad una varianza (per quel livello) per un laboratorio molto più alta delle altre.

Questo potrebbe portare ad identificare come outlier l'intero laboratorio (per quel livello)... diciamo che è un approccio molto protettivo.

Effettuare **prima** un test per gli outlier **entro laboratorio** (per ogni livello) potrebbe portare ad escludere la singola replica completamente sbagliata, riportando quindi la varianza a valori comparabili con quelle degli altri laboratori e, quindi, a **minor perdita di informazione**.



# Identificazione di outliers medie (e repliche)

Sistemi Culturali

Esistono diversi test per l'identificazione di outlier (Grubbs, Dixon).

ISO suggerisce Grubbs.

$$G = \left| \frac{\bar{X} - X_{SOSPETTI}}{\sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (X_i - \bar{X})^2}} \right|$$

$X_i$  sono i valori da testare (medie o repliche)

$p$  è il numero di valori da testare

Se uno (o più d'uno) dei valori da testare è **significativamente diverso** (più alto o più basso) dagli altri ( **$G$  è maggiore del valore tabulato (1%)**), allora quel valore è un **outlier e va scartato**.

Valori tabulati fino a 40 elementi... poi si tengono i valori tabulati per 40, con cadute progressive della potenza del test.



# Identificazione di outliers sulle varianze

Sistemi Culturali

Esistono diversi test per l'omogeneità delle varianze (Cochran, Levene, Bartlett). ISO suggerisce Cochran.

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2}$$

$s_i^2$  sono le varianze da testare

$s_{\max}^2$  è la varianza maggiore

$p$  è il numero di varianze da testare

Se  $C$  è maggiore del suo valore tabulato all'1%, la varianza maggiore è un outlier.





# Linearità

## Sistemi Culturali

Nel nostro caso, la linearità di un metodo potrebbe essere la sua capacità di dare risultati **direttamente proporzionali al valore rilevato con il metodo di riferimento** (all'interno di un campo di validità).

La proporzionalità può essere raggiunta anche attraverso trasformazioni matematiche.

Si valuterà su **diversi livelli** con misure replicate.



# Accuratezza Trueness

## Sistemi Culturali

Rappresenta la **differenza** tra (i) la media dei valori ottenuti ripetendo molte volte la misura e (ii) il valore *vero*.

ISO ne suggerisce il calcolo in termini di bias percentuale.

Questa informazione può essere anche corredata da altri tipi di indicatori (difference-based indices, e.g., RMSE, EF, CRM, ...).



# Accuratezza - Precisione

## Ripetibilità stretta

### Sistemi Culturali

Concordanza tra repliche di misura ottenute

- nello stesso laboratorio
- dallo stesso operatore
- usando la stessa apparecchiatura
- in intervalli di tempo brevi

Dati  $x_{1j}, x_{2j}, x_{3j}, \dots, x_{nj}$  risultati delle repliche di misura al netto di eventuali outlier e per un determinato livello  $j$  e data  $\bar{x}_j$  la loro media aritmetica:

$$s_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2}{n - 1}$$

Il limite di ripetibilità  $r_j$  è uguale a:

$$r_j = s_{rj} \cdot \sqrt{2} \cdot t_{\alpha=0.05, v=\infty}$$



# Accuratezza - Precisione Ripetibilità intermedia

## Sistemi Colturali

Concordanza tra repliche di misura ottenute

- nello stesso laboratorio
- dallo stesso operatore
- usando la stessa apparecchiatura
- in **intervalli di tempo LUNGHI**

Lunghi?... "diverse serie analitiche con possibilità di cambiamento del lotto dei reattivi e dei materiali di consumo"

...cosa può voler dire per noi questo?



# Accuratezza - Precisione Riproducibilità

## Sistemi Culturali

Concordanza tra repliche di misura ottenute

- in **diversi laboratori**
- da **operatori diversi**
- usando **apparecchiature diverse**
- in **intervalli di tempo diversi**

Come facciamo noi?



Insensibilità a piccole variazioni (DELIBERATE) dei parametri sperimentali, ad esempio:

- % solventi organici
- pH
- temperatura
- ...

Per noi?



# Quindi... disegniamo il nostro ring test

## Sistemi Culturali

Abbiamo alcuni problemi...

- Il materiale di riferimento
- La questione intervalli di tempo non brevi...
- La questione laboratori... noi lavoriamo su piante vive...
- Le variazioni deliberate per la robustezza
- Teoricamente l'operatore non sa mai *cosa* sta esaminando...
- Come quantificare le risorse necessarie per le misure effettuate con i vari metodi?



# Quindi... disegniamo il nostro ring test

## Sistemi Colturali

Con i vostri colleghi abbiamo fatto così:

- campioni rappresentati da **parcelle piccole** (4×4 m) (per minimizzare l'eterogeneità)
- **repliche di misura rappresentate da quadranti** (2×2 m) all'interno della parcella-campione (per minimizzare l'effetto del **calpestamento** dovuto alle molte misure effettuate)
- **laboratori rappresentati da gruppi "indipendenti"** indipendenti di più studenti (**diversi operatori per laboratorio!**), dotati solo della documentazione del metodo
- **linearità** testata effettuando le analisi in **diversi momenti del ciclo** colturale (o anche, e.g., diversi **livelli di concimazione**)
- **trueness** determinata utilizzando – come "materiali di riferimento" – **misure effettuate in laboratorio** (o con **metodo "di riferimento"**)





# Quindi... disegniamo il nostro ring test

## Sistemi Culturali

