

Guida ACCREDIA - ISS per i laboratori di prova

Il controllo ufficiale e l'autocontrollo
dei prodotti alimentari: la scelta
dei metodi di prova chimici



Istituto Superiore di Sanità

ACCREDIA

L'ENTE ITALIANO DI ACCREDITAMENTO



Gruppo di lavoro ACCREDIA – ISS

Esperti: Paolo Bianco (ACCREDIA), Stefano De Martin (ARPA FVG), Carolina Ferranti (ISS), Sergio Guzzi (ACCREDIA), Luca Palleschi (ISS),

Coordinatori: Rosa Draisci (ISS), Silvia Tramontin (ACCREDIA)



Indice

Premessa	3
1 Normativa nazionale ed europea in materia di accreditamento: le implicazioni per i laboratori di controllo ufficiale e di autocontrollo dei prodotti alimentari	5
2 Scelta dei metodi di prova	7
3 Equivalenza dei metodi di prova	11
3.1 Equivalenza della precisione di due metodi	11
3.2 Equivalenza dell'accuratezza del metodo	13
3.3 Equivalenza del limite di rilevabilità e/o quantificazione	16
4 Validazione dei metodi di prova sviluppati dal Laboratorio	19
5 Verifica delle prestazioni del Laboratorio	14
6 Espressione dei risultati, incertezza di misura associata e interpretazione dei dati	21
6.1 Espressione del risultato e sua correzione per il fattore di recupero	23
6.2 Espressione dell'incertezza di misura	23
6.3 Valutazione di conformità del prodotto analizzato	23
6.4 Adempimenti richiesti dall'ente di accreditamento	24
7 Acque destinate al consumo umano	25
7.1 Metodi di campionamento e metodi di prova	25
7.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova	27
7.3 Interpretazione e presentazione del risultato	28
8 Prodotti alimentari	29
8.1 Micotossine	29
8.1.1 Metodi di campionamento e metodi di prova	29
8.1.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova	30
8.1.3 Presentazione e interpretazione del risultato	31
8.2 Piombo, Cadmio, Mercurio, Stagno inorganico, 3-MCPD e idrocarburi policiclici aromatici	31
8.2.1 Metodi di campionamento e metodi di prova	31
8.2.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova	32
8.2.3 Presentazione e interpretazione del risultato	33
8.3 Nitrati	33
8.3.1 Metodi di campionamento e metodi di prova	33
8.3.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova	34
8.3.3 Presentazione e interpretazione del risultato	34
8.4 Residui di anabolizzanti e di altre sostanze farmacologicamente attive	34
8.4.1 Metodi di campionamento e metodi di prova	34
8.4.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova	35
8.4.3 Presentazione e interpretazione del risultato	41
9 Bibliografia	45



PREMESSA

Le misure adottate a livello europeo in tema di sicurezza alimentare sono finalizzate ad assicurare gli standard più elevati possibili di sicurezza, tutelare gli interessi dei consumatori, garantire l'affidabilità e uniformità dei processi di controllo e prevenire ostacoli ingiustificati alla libera circolazione dei prodotti alimentari e degli alimenti per gli animali.

In tale contesto l'accreditamento dei laboratori di controllo, oltre ad accrescere la fiducia reciproca tra gli Stati Membri, rappresenta lo strumento per garantire la qualifica delle informazioni scientifiche per la valutazione del rischio, la valutazione della competenza dei laboratori da parte delle Autorità preposte e l'efficacia delle attività di controllo ufficiale e di autocontrollo nell'intera filiera produttiva. Quanto sopra è ribadito nel Reg. (CE) n.765/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 9 luglio 2008 ("Norme in materia di accreditamento e vigilanza del mercato per quanto riguarda la commercializzazione dei prodotti") che elabora un quadro generale che fissa i principi di gestione ed organizzazione dell'accreditamento a livello comunitario.

Il presente documento si pone l'obiettivo di fornire ai laboratori di prova che operano nell'ambito del controllo ufficiale ed autocontrollo dei prodotti alimentari, indicazioni sulla scelta dei metodi di prova, sui criteri per la validazione dei metodi di prova, sulla presentazione e l'interpretazione dei risultati associati all'incertezza di misura.

Le informazioni riportate nella Guida valgono allo stato delle correnti revisioni dei Regolamenti ACCREDIA applicabili per i Laboratori di prova per la sicurezza degli alimenti, pubblicati nella sezione Documenti del sito web di ACCREDIA www.accredia.it.



Normativa nazionale ed europea in materia di accreditamento: le implicazioni per i laboratori di controllo ufficiale e di autocontrollo dei prodotti alimentari

Il riconoscimento della competenza dei laboratori di prova è un requisito richiesto dalla normativa europea in materia di controllo ufficiale e dalle disposizioni nazionali in materia di autocontrollo dei prodotti alimentari. I laboratori di prova coinvolti in tale ambito sono quindi tenuti ad operare conformemente alle disposizioni cogenti riguardanti la sicurezza dei prodotti alimentari ed alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, al fine di garantire la qualità e la trasparenza dei processi analitici e dei dati, obiettivo da raggiungere mediante l'accreditamento delle prove. L'accreditamento è infatti l'“*attestazione di terza parte, relativa ad un organismo di valutazione della conformità (nel caso specifico il laboratorio di prova), consistente in una dimostrazione formale della competenza dello stesso a svolgere specifici compiti di valutazione della conformità ed a produrre dati e risultati tecnicamente validi (cifr. par. Introduzione 17025)*”.

I criteri per l'esecuzione dei controlli ufficiali finalizzati alla verifica della conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sono definiti nel Reg. (CE) n.882/2004 del 29 aprile 2004 che fissa regole generali finalizzate a prevenire, eliminare o ridurre a livelli accettabili i rischi per la salute umana e per gli animali, siano essi rischi diretti o veicolati dall'ambiente. In particolare è richiesto ai laboratori che eseguono le analisi dei campioni prelevati durante i controlli ufficiali, di operare, essere valutati ed accreditati in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 dall'ente unico nazionale di accreditamento che opera conformemente alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17011.

L'accreditamento dei laboratori di autocontrollo, che operano nel settore alimentare, è regolamentato dalle disposizioni stabilite dall'art. 40 della legge del 7 luglio 2009, n.88 - Legge Comunitaria 2008. Le disposizioni del suddetto articolo si applicano ai laboratori non annessi alle imprese alimentari che effettuano analisi nell'ambito delle procedure di autocontrollo per le imprese alimentari e ai laboratori annessi alle imprese alimentari che effettuano analisi ai fini dell'autocontrollo per conto di altre imprese alimentari facenti capo a soggetti giuridici diversi. La Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano ha definito le modalità operative di iscrizione, aggiornamento e cancellazione in appositi elenchi di questi laboratori nell'accordo n. 78/CSR/2010, recepito dalle rispettive norme regionali.

A completamento del quadro legislativo, sono state recentemente approvate le “Linee guida per il controllo ufficiale dei laboratori che eseguono le analisi nell'ambito dell'autocontrollo delle imprese alimentari” predisposte dalla Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano. Il documento fornisce indicazioni inerenti le modalità di programmazione, pianificazione ed esecuzione delle attività di controllo ufficiale riguardanti i laboratori che effettuano analisi nell'ambito delle procedure di autocontrollo delle imprese alimentari,

iscritti negli elenchi regionali, compresi quelli annessi alle imprese alimentari. A differenza della valutazione svolta dall'ente di accreditamento che verifica la competenza del laboratorio, il controllo ufficiale è rivolto all'accertamento, e successivo mantenimento, dei requisiti previsti per l'iscrizione nell'elenco regionale, compresa la congruità del numero di prove eseguite rispetto ai consumi registrati.

Relativamente ai metodi da applicare, sono in vigore disposizioni legislative europee a carattere orizzontale e disposizioni legislative a carattere verticale che specificano, per vari tipi di prodotti, i metodi di campionamento e di analisi, i criteri di rendimento dei metodi e i criteri per l'interpretazione/presentazione del risultato.



Scelta dei metodi di prova

La selezione dei metodi di prova è trattata sia nel requisito gestionale “Riesame delle richieste, delle offerte e dei contratti” che nel requisito tecnico “Scelta dei metodi” della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

Dal punto di vista gestionale la norma richiede che il laboratorio abbia politiche e procedure per la stesura del contratto con particolare riferimento alla fornitura del servizio di esecuzione delle prove, così da assicurare il rispetto dei requisiti concordati con il cliente. Il laboratorio deve informare il cliente circa il metodo scelto, pertanto i metodi da utilizzare dovranno essere adeguatamente definiti, documentati e comprensibili. Eventuali scostamenti dai metodi di prova dovranno essere documentati, tecnicamente giustificati, autorizzati ed accettati dal cliente. Inoltre il laboratorio dovrà informare il cliente quando il metodo, proposto dal cliente stesso, sia considerato non appropriato od obsoleto.

Gli aspetti tecnici normativi riguardano la capacità del laboratorio di selezionare metodi di prova che soddisfino le esigenze del cliente e che siano appropriati per le prove da eseguire e di dare evidenza, ove necessario, della verifica dell' idoneità del metodo in relazione alle esigenze del cliente. Le caratteristiche dei metodi validati, per esempio l'incertezza dei risultati, i limiti di rivelazione, la selettività del metodo, la linearità, il limite di ripetibilità e/o di riproducibilità, la robustezza nei confronti di influenze esterne e/o la sensibilità incrociata nei confronti di interferenze provenienti dalla matrice del campione/oggetto da sottoporre a prova devono soddisfare l'utilizzo previsto, ovvero le esigenze del cliente. Nel requisito 5.4 “metodi di prova” la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 indica le seguenti tipologie di metodi: non normalizzati, normalizzati e sviluppati dal laboratorio. ACCREDIA nel regolamento RT-08 ne esprime le definizioni:

Metodo di prova non normalizzato: *metodo emesso da organizzazioni tecniche nazionali o internazionali (ad es. Rapporti ISTISAN, Quaderni IRSA, ecc) e metodo sviluppato da laboratori/centri di riferimento nazionali o comunitari o da centri di referenza nazionali accreditati. Elemento discriminante è che la responsabilità dei dati forniti è riferita non all' organizzazione che lo ha emesso, ma ai singoli autori.*

Metodo di prova normalizzato: *metodo emesso da organismi di normazione nazionali, europei o internazionali (ad es. UNI, CEI, CEN, ISO, UNICHIM, AOAC, ecc).*

Metodo di prova sviluppato dal laboratorio (c.d. metodo interno): *Metodo di prova messo a punto o adottato da un laboratorio sulla base di conoscenze desunte dalla letteratura scientifica e/o dall' esperienza pratica.*

Il metodo interno può essere sia un metodo sviluppato dal laboratorio che un metodo normalizzato o non normalizzato che è stato sostanzialmente modificato a seguito di particolari esigenze del laboratorio.

Rientrano in questa tipologia gli articoli pubblicati su riviste (es. pubblicati sul Journal AOAC, Bollettino dei Chimici Igienisti), le istruzioni dei fornitori delle apparecchiature, eccetto quando richiamate espressamente dalla normativa cogente. Modifiche quali l'eliminazione di fasi di prova, l'impiego di apparecchiature con prestazioni inferiori a quelle previste o che si basano su principi differenti, l'applicazione a materiali o prodotti non indicati nel campo di applicazione del metodo, e non assimilabili, i metodi ufficiali o normalizzati applicati al di fuori del proprio campo di applicazione o modificati in modo sostanziale dal laboratorio richiedono la trasformazione in metodo sviluppato dal laboratorio. Inoltre sono considerati metodi interni anche le edizioni non più in vigore di norme o metodi di prova ufficiali, insieme con i progetti di norma non ancora nella forma sottoposta al voto finale. Fanno eccezione le edizioni superate di norme ed i progetti di norma quando sono richiamati da disposizioni cogenti o da norme per la certificazione di prodotto, in vigore, o richiesti da organismi notificati. L'estensione del campo di misura di un metodo ufficiale o normalizzato deve essere validata ma non ne richiede la trasformazione in metodo interno.

Oltre alle tipologie di metodi sopra citati, il regolamento ACCREDIA RT-08, riporta anche la definizione di metodo ufficiale:

Metodo di prova ufficiale: *Metodo di prova riportato o richiamato in documenti normativi cogenti e/o pubblicato su Gazzetta Ufficiale Italiana (GU) o dell'Unione Europea (GUCE) o comunque richiamato o riportato in un documento emesso da una autorità quale Regione, Provincia, ecc. La qualifica di "ufficiale" è una proprietà trasversale indipendente dal grado di esaustività dei contenuti. Un metodo ufficiale può essere "normalizzato" o "non normalizzato". Sono un esempio i metodi OIV e i Rapporti ISTISAN che sono richiamati in una disposizione legislativa.*

I laboratori ufficiali devono considerare tra le esigenze del cliente anche le disposizioni normative cogenti, in particolare quanto previsto dal Reg. (CE) 882/2004 riguardo la scelta del metodo. L'art. 11 stabilisce che i metodi di campionamento e di analisi da utilizzare nel contesto dei controlli ufficiali debbano essere conformi a pertinenti disposizioni comunitarie, leggi o regolamenti specifici in materia di sicurezza alimentare, e solo in assenza di queste ultime possono essere utilizzati metodi pubblicati su norme o protocolli riconosciuti internazionalmente, ad esempio quelli accettati dal Comitato Europeo di Normalizzazione (CEN) o quelli accettati dalla legislazione nazionale; in assenza, è consentito utilizzare altri metodi utili al raggiungimento degli obiettivi o sviluppati conformemente a protocolli scientifici.

Si rammenta che la normativa cogente talvolta indica il metodo da applicare, altre volte esplicita le caratteristiche di performances che il metodo deve soddisfare. In tal caso il laboratorio dovrà assumersi la responsabilità di scegliere il metodo adeguato e dovrà dimostrare l'equivalenza di tutti i parametri di validazione con quelli riportati sulla normativa cogente.

I principi definiti dal Reg. 882/2004 per la scelta del metodo da parte del laboratorio ufficiale, sono ripresi nella proposta di Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio sui controlli ufficiali - COM(2013) 265 final - 2013/0140 (COD) - che sostituirà il regolamento 882/2004: i controlli ufficiali devono avvalersi di metodi analitici conformi ai più avanzati standard scientifici e tali da garantire risultati solidi robusti, affidabili e comparabili in tutta l'Unione.

I metodi utilizzati dai laboratori ufficiali, come anche la qualità e l'uniformità dei dati analitici, di prova e diagnostici generati, vanno pertanto migliorati continuamente. L'articolo 33 definisce la scala di preminenza per la scelta dei metodi di campionamento e di analisi da utilizzare nel contesto dei controlli ufficiali qualora non siano disponibili norme dell'Unione che stabiliscono i metodi o i relativi criteri di efficienza. In assenza di norme dell'Unione, i laboratori ufficiali devono applicare i metodi più avanzati prendendo in considerazione le seguenti priorità:

- a) i più recenti metodi disponibili (norme o protocolli) riconosciuti internazionalmente, (Comitato europeo di normalizzazione - CEN);
- b) i metodi pertinenti sviluppati o raccomandati dai laboratori di riferimento dell'Unione europea e convalidati in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente;
- c) metodi conformi alle norme pertinenti definite a livello nazionale;
- d) metodi pertinenti sviluppati o raccomandati dai laboratori nazionali di riferimento e convalidati in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente.

Solo nel caso di assenza delle tipologie di metodi sopra indicati, il laboratorio ufficiale potrà avvalersi di metodi pertinenti convalidati in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente

Il Comitato europeo di normalizzazione (CEN) citato dal regolamento, ha lo scopo di armonizzare e produrre in collaborazione con enti di normazione nazionali ed internazionali, norme tecniche a livello europeo, così da favorire la libera circolazione delle merci e assicurare un contesto tecnico comune. Infatti l'utilizzo da parte dei laboratori europei dello stesso metodo, e quindi delle stesse performances analitiche, permette di rispettare il principio volto ad assicurare l'uniformità dei controlli su tutto il territorio di competenza dell'Unione Europea. Norme internazionali sono state anche elaborate dall'Organizzazione internazionale per la standardizzazione (ISO) e dall'Unione internazionale di chimica pura e applicata (IUPAC).



Equivalenza dei metodi di prova

La verifica dell'equivalenza dei metodi deve essere fatta utilizzando i consueti test statistici applicabili quando si effettuano dei confronti tra metodi di prova che possono risultare diversi tra di loro. Tali test prendono in considerazione i parametri caratteristici di un metodo riportati nel Reg. (CE) n.882/2004 e richiamati anche nella norma di riferimento UNI CEI EN ISO/IEC 17025 (punto 5.4.5.3), nonché nel Documento guida all'applicazione del Reg.882 della UE (2006).

Prima di effettuare qualsiasi confronto è necessario verificare la precisione di un metodo analitico ovvero la capacità che i due metodi operino con ripetibilità confrontabili (dal punto di vista statistico). Questa condizione risulta necessaria e sufficiente per procedere alla verifica di tutti gli altri parametri di validazione; pertanto il test sulla precisione è un test preliminare da farsi prima di procedere alla verifica di equivalenza di due metodi.

3.1 Equivalenza della precisione di due metodi

Per effettuare la verifica dell'equivalenza in termini di precisione si procede con il test F (o test di Fisher) che mette in relazione due scarti tipo tra di loro e verifica se, sulla base dei dati sperimentali ottenuti, i due metodi in confronto operano con ripetibilità compatibili tra di loro.

Il test F è effettuato individuando gli scarti tipo dei due metodi in confronto, allo stesso livello di concentrazione (la verifica dell'omogeneità dei dati viene effettuata mediante test statistici quali ad esempio il test di Bartlett o il test di Hartley), calcolando il rapporto di Fisher e confrontandolo con il fattore F teorico che si ricava dalle tabelle statistiche in funzione del livello di confidenza del 95% e del numero di gradi di libertà utilizzati per ottenere i due scarti tipo dei metodi in confronto.

In sintesi ai fini della verifica della ripetibilità le operazioni da effettuare sono di seguito schematizzate:

- ❖ si replicano m misure con il metodo alternativo proposto dal laboratorio, si calcola lo scarto tipo di ripetibilità stretta e lo si rapporta allo scarto tipo di ripetibilità del metodo cogente;
- ❖ si calcola il rapporto $F = S^2M_R/S^2M_L$ (con $S^2M_R > S^2M_L$) facendo attenzione a disporre al numeratore sempre lo scarto tipo più elevato in termini numerici;
- ❖ Si verifica che il valore calcolato sia inferiore al valore tabulato di F per $n-1$ gradi di libertà per il metodo cogente e $(m-1)$ gradi di libertà per il metodo alternativo e per una probabilità ad un livello di confidenza del 95 % .

Quindi se si verifica che

$$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$$

le precisioni dei metodi sono compatibili tra di loro e pertanto i due metodi hanno ripetibilità confrontabili. Qualora questo non si verifichi i metodi non hanno ripetibilità confrontabili e pertanto il metodo proposto dal laboratorio non è equivalente al metodo di riferimento.

Si evidenzia che spesso nei metodi ufficiali o normalizzati si dispone dell'informazione della precisione (scarto tipo) ma non viene dichiarato il numero di repliche con il quale sia stato ottenuto lo scarto tipo riportato. In tal caso il confronto non può essere fatto utilizzando la metodologia appena vista poiché non si ha l'informazione necessaria per estrapolare dalla tabella statistica il valore di F in quanto è necessario conoscere il numero di gradi di libertà dei due metodi a confronto.

In tal caso quindi si ammette che il metodo ufficiale o normalizzato sia stato sperimentato con infiniti gradi di libertà e pertanto si esegue il test F modificato come di seguito specificato.

Per l'esecuzione del test F (modificato) si individuano gli scarti tipo dei due metodi in confronto (allo stesso livello di concentrazione), si calcola il rapporto e lo si confronta con l'intervallo i cui estremi sono i fattori A e B che si ricavano dalle tabelle statistiche in funzione del livello di confidenza del 95 % e del numero di gradi di libertà utilizzati per ottenere lo scarto tipo del metodo alternativo proposto dal laboratorio.

In sintesi ai fini della verifica della ripetibilità le operazioni da effettuare sono di seguito schematizzate:

- ❖ replicare n volte la misura con il metodo analitico alternativo e calcolare lo scarto tipo di ripetibilità ristretta S_L ;
- ❖ Ricavare dal metodo cogente di riferimento lo scarto tipo σ_R ;
- ❖ Calcolare il rapporto S_L/σ_R e verificare che questo sia compreso tra i valori di A e B, desumibili dalle tabelle statistiche, per n-1 gradi di libertà e per un livello di confidenza del 95 %.

Quindi se si verifica che

$$A \leq S_L/\sigma_R \leq B$$

le precisioni dei metodi sono compatibili tra di loro e pertanto i due metodi hanno ripetibilità confrontabili.

Tale metodologia è identica a quella utilizzata dal laboratorio quando effettua la conferma della sua abilità nell'eseguire un metodo normalizzato al proprio interno.

Nel caso di esito positivo dei test di cui sopra, si può proseguire con la verifica di equivalenza anche per gli altri parametri di validazione che caratterizzano i metodi di prova.

3.2 Equivalenza dell'accuratezza del metodo

La verifica dell'accuratezza di un metodo si esegue tramite il test t (o test di Student). Questo test viene utilizzato per verificare se due metodi abbiano valori di accuratezza confrontabili ovvero se i risultati che forniscono siano compatibilmente esatti in senso statistico. La metodologia, anche in questo caso, prevede il calcolo di un fattore sperimentale, il fattore t ed il suo confronto con il valore di t tabulato e ricavabile dalle tabelle del t di Student.

La verifica dell'equivalenza dell'accuratezza dei due metodi si effettua in modi differenti in funzione dei dati forniti dal metodo di riferimento.

L'accuratezza di un metodo si trova espressa principalmente nei seguenti modi:

1. Dichiarando che il metodo è esatto. In tal caso è indispensabile dimostrare che il metodo alternativo fornisce risultati esatti mediante un test t;
2. Dichiarando i valori ottenuti a seguito di una sperimentazione interlaboratorio riportando media e scarto tipo ottenuti per una data matrice ad un determinato livello di concentrazione;
3. Dichiarando sul metodo lo scostamento o lo scostamento percentuale (BIAS): in tal caso è sufficiente dimostrare che il metodo ha uno scostamento uguale o inferiore al metodo di riferimento;
4. Dichiarando l'intervallo di recupero: in tal caso è sufficiente calcolare il recupero, utilizzando un materiale di riferimento certificato (ove disponibile) e verificare che rientri nell'intervallo riportato sul metodo cogente di riferimento.

Possono essere riportate altre informazioni sul metodo di riferimento che sostanzialmente sono riconducibili ai quattro casi riportati precedentemente.

Vediamo ora in dettaglio i quattro casi che possono presentarsi e come approcciare al problema dell'equivalenza dell'accuratezza.

- 1) Il metodo di riferimento risulta esatto: è indispensabile dimostrare che anche il metodo alternativo sia esatto tramite un test t. Questo test prevede il calcolo del fattore t tramite la media dei valori ottenuti dall'analisi ripetuta di un materiale di riferimento certificato, lo scarto tipo ottenuto e l'incertezza del materiale di riferimento utilizzato per tale verifica.

Le operazioni da effettuare ai fini della verifica sono schematicamente riassunte:

replicare un sufficiente numero di volte (6-10) l'analisi su un materiale di riferimento certificato, calcolare la media delle misurazioni e lo scarto tipo di ripetibilità e calcolare il fattore t nel seguente modo:

$$t_{calc} = \frac{|C_{CRM} - \bar{X}|}{\sqrt{\frac{s_{rec}^2}{n} + u_{CRM}^2}} \leq t_{p,v}$$

Dove C_{CRM} è il valore teorico del materiale di riferimento certificato, X è il valore medio ottenuto dalla sperimentazione con il metodo alterativo, s^2_{rec} è lo scarto tipo di ripetibilità ottenuto con il metodo alternativo, n sono il numero delle repliche utilizzate per la verifica, u^2_{CRM} è l'incertezza tipo del materiale di riferimento certificato, p è il livello di probabilità statistica del test e v sono i gradi di libertà del test.

Quindi se si verifica che

$$t_{calc} < t_{tab}$$

il metodo risulta esatto e quindi confrontabile con il metodo di riferimento.

- 2) Il metodo di riferimento riporta media e scarto tipo ottenuti nella sperimentazione: si applica il test t alle due serie di dati, quella del metodo cogente e quella del metodo alternativo, si calcola il fattore t e lo si confronta con il valore tabulato.

Le operazioni da effettuare ai fini della verifica sono schematicamente riassunte:

replicare un sufficiente numero (6-10) di volte l'analisi su un materiale di riferimento o su un campione costruito in laboratorio mediante fortificazione, calcolare la media delle misurazioni e lo scarto tipo di ripetibilità e quindi calcolare il fattore t nel seguente modo:

$$t_{calc} = \frac{|\bar{X}_{MR} - \bar{X}_{ML}|}{\sqrt{\frac{S^2_{MR}}{m} + \frac{S^2_{ML}}{n}}} \leq t_{p,v}$$

Dove X_{MR} è il valore medio ottenuto e riscontrabile dal metodo di riferimento, X_{ML} è il valore medio ottenuto con il metodo alterativo, s^2_{MR} è lo scarto tipo di ripetibilità riscontrabile dal metodo cogente di riferimento, m sono le repliche riscontrabile dal metodo cogente, s^2_{ML} è lo scarto tipo di ripetibilità ottenuto dalla sperimentazione con il metodo alterativo, n sono le repliche utilizzate per il metodo alternativo, p è il livello di probabilità statistica del test e v_{eff} sono i gradi di libertà effettivi del test.

I gradi di libertà effettivi devono essere calcolati quando il test usa due sperimentazioni che utilizzano gradi di libertà differenti, ovvero hanno effettuato un numero di repliche differenti nella sperimentazione del metodo.

I gradi di libertà effettivi si calcolano con la formula di Welch-Satterhweite

$$v = \frac{(S^2_{MR} / n + S^2_{ML} / m)^2}{\left(\frac{S^2_{MR} / n}{n} + \frac{S^2_{ML} / m}{m} \right)^2}$$

Quindi se si verifica che

$$t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$$

i due metodi hanno esattezze confrontabili tra di loro.

- 3) Il metodo di riferimento dichiara uno scostamento o scostamento percentuale: in tal caso è sufficiente dimostrare che il metodo alternativo ha uno scostamento uguale o inferiore a quello riportato sul metodo di riferimento

Le operazioni da effettuare ai fini della verifica sono schematicamente riassunte:

replicare un sufficiente numero di volte (6-10) l'analisi su un materiale di riferimento certificato, calcolare la media delle misurazioni e lo scarto tipo di ripetibilità e quindi lo scostamento:

$$BIAS = \frac{|C_{CRM} - \bar{X}|}{C_{CRM}}$$

Se lo scostamento calcolato del metodo alternativo è inferiore o uguale a quello del metodo co-genite i metodi hanno valori di accuratezza equivalenti.

- 4) Il metodo di riferimento dichiara un intervallo di accettabilità per il recupero: in tal caso è sufficiente dimostrare che il recupero ottenuto con il metodo alternativo sia compreso nell'intervallo dichiarato sul metodo di riferimento.

Le operazioni da effettuare ai fini della verifica sono schematicamente riassunte:

replicare un sufficiente numero di volte l'analisi utilizzando un materiale di riferimento certificato e calcolare il recupero percentuale nel seguente modo:

$$R\% = \frac{\bar{x}}{M} \cdot 100$$

Dove x è la media dei risultati ottenuti ed M è il valore certificato del materiale utilizzato per la sperimentazione.

Verificare che il valore del recupero sia compreso nell'intervallo di accettabilità del metodo co-genite; in caso positivo i due metodi hanno valori di accuratezza equivalenti.

3.3 Equivalenza del limite di rilevabilità e/o quantificazione

In questo caso il laboratorio deve verificare il limite di rilevabilità e quantificazione del metodo alternativo e confrontarlo con quello riportato sul metodo di riferimento. Se i valori sono inferiori o uguali a quelli riportati sul metodo di riferimento allora i metodi possono essere considerati equivalenti in termini di limite di rilevabilità e di quantificazione. Risulta opportuno evidenziare che il laboratorio dovrebbe valutare attentamente come sono stati espressi tali limiti sul metodo di riferimento in quanto le definizioni di questi parametri sono spesso diverse e poco confrontabili tra di loro. La stessa attenzione dovrebbe essere posta nella verifica della presenza della dichiarazione del limite di rilevabilità o del limite di quantificazione.

La metodologia da seguire nel caso della verifica del limite di rilevabilità consiste nella predisposizione di un numero congruo di campioni aventi concentrazioni pari al limite di rilevabilità dichiarato nel metodo alternativo verificando quanti di questi forniscono un risultato di presenza o di assenza. Il laboratorio dovrà verificare l'ottenimento di almeno il 50 % delle prove con esito positivo ovvero dovrà dimostrare che è in grado di determinare la presenza almeno nella metà delle repliche processate. In caso affermativo il laboratorio è in grado di garantire il limite di rilevabilità dichiarato e quindi è autorizzato a confrontare tale limite con quello riportato sul metodo cogente.

Relativamente al limite di quantificazione il laboratorio è tenuto a verificare sperimentalmente il limite di quantificazione replicando un sufficiente numero di volte un campione fortificato al limite di quantificazione dichiarato. Dopo aver verificato che la ripetibilità a tale livello di concentrazione sia confrontabile con quella definita su tutto il campo di misura, è sufficiente che il limite di quantificazione del metodo alternativo sia inferiore o uguale a quello riportato sul metodo di riferimento.

Effettuando le verifiche dei parametri visti precedentemente si può essere in grado di dichiarare il metodo analitico equivalente ad un metodo analitico di riferimento.



Validazione dei metodi di prova sviluppati dal Laboratorio

Il processo di validazione ha l'obiettivo di dimostrare la validità per l'utilizzo previsto di un metodo mediante la valutazione di tutti i parametri utili a tale scopo. La validazione è infatti la conferma attraverso l'esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti (punto 5.4.5.1 della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

Lo sviluppo di un metodo comprende attività quali la specifica dei requisiti, la determinazione delle caratteristiche/parametri del metodo, il controllo che i requisiti possano essere soddisfatti utilizzando il metodo ed una dichiarazione di validazione.

Il laboratorio deve definire i requisiti dei metodi di prova nella fase precedente agli studi di validazione; può a tal fine utilizzare quanto specificato in norme, leggi, decreti, decisioni, direttive e regolamenti UE, parametri di prestazione di metodi di riferimento, linee guida nazionali o internazionali, criteri fissati dalla direzione del laboratorio in base alle esigenze del cliente o di mercato.

I laboratori preposti al controllo ufficiale ed autocontrollo dei prodotti alimentari devono, ove esistano, utilizzare requisiti definiti in disposizioni normative cogenti, che possono riportare indicazioni circa le metodiche da seguire o, in alcuni casi, i criteri di rendimento per le caratteristiche di prestazione dei metodi.

Il laboratorio deve validare i metodi sviluppati al proprio interno, i metodi non normalizzati, i metodi normalizzati e ufficiali che sono utilizzati al di fuori del proprio campo di applicazione, modificati significativamente dal laboratorio o che non riportino una adeguata validazione (caratteristiche di prestazione del metodo non presenti/esaustive).



Verifica delle prestazioni del Laboratorio

Quando un metodo ufficiale, normalizzato o non normalizzati indica la ripetibilità e l'accuratezza, il laboratorio è tenuto a verificare che, in condizioni di ripetibilità, le sue prestazioni siano compatibili con quelle indicate e deve inoltre verificare di mantenerle nel tempo. Per i metodi di prova ufficiali, normalizzati o non normalizzati che non riportino i dati di precisione ed accuratezza, il laboratorio determina la propria ripetibilità ed accuratezza, eseguendone la verifica del mantenimento nel tempo, e verifica inoltre che tale ripetibilità sia congruente con eventuali disposizioni normative cogenti. In assenza di tali disposizioni la ripetibilità target può essere definita dal laboratorio sulla base di altre specifiche riscontrabili per analoghe matrici o analoghi analiti. Resta comunque valido l'approccio che consente di utilizzare come ripetibilità di riferimento, quella dedotta dalla riproducibilità calcolata utilizzando la relazione di Horwitz: la ripetibilità target sarà semplicemente la riproducibilità calcolata con l'equazione di Horwitz moltiplicata per un fattore pari a 0,66.

Nel caso in cui il laboratorio abbia dimostrato la capacità di raggiungere il livello prestazionale descritto dal metodo ufficiale o normalizzato, può far propri i parametri di validazione riportati nel metodo di riferimento

Il laboratorio deve registrare i dati ottenuti, le procedure utilizzate per la verifica delle prestazioni, così come una dichiarazione circa la validità del metodo per l'utilizzo previsto.

I metodi predisposti e validati dai Laboratori/Centri di Riferimento Nazionali o Comunitari accreditati o dai Centri di Referenza Nazionali accreditati e riconosciuti dall'Autorità centrale, possono essere utilizzati da altri laboratori senza ulteriore validazione purché:

- ❖ tali metodi rientrino nel campo di accreditamento del laboratorio che li ha validati;
- ❖ contengano almeno i limiti di ripetibilità e riproducibilità (o ripetibilità intermedia);
- ❖ siano messi a disposizione dal laboratorio di riferimento, nella versione in vigore, sul proprio sito web, corredati dalla dichiarazione di validazione;
- ❖ la dichiarazione di validazione del laboratorio di riferimento sia aggiornata (data di emissione non superiore a 3 anni);
- ❖ il laboratorio che li applica abbia verificato di saperli eseguire nel proprio laboratorio ottenendo risultati rientranti nei limiti definiti dal metodo (dati di precisione ed accuratezza);

- ❖ il laboratorio che li applica abbia verificato che le caratteristiche prestazionali che dipendono dal laboratorio e non dal metodo (come ad es. quelle che dipendono dal tipo e condizione della apparecchiatura che il laboratorio utilizza, abilità del personale autorizzato ad eseguire la prova, condizioni ambientali del laboratorio, qualità dei reattivi e materiali che il laboratorio utilizza, procedura di prova definita dal laboratorio) siano compatibili con quelle ottenute durante la validazione del metodo

I metodi analitici sviluppati dal laboratorio devono essere interamente validati indicando, ove applicabile, tutti i parametri che descrivono le caratteristiche del metodo analitico (punto 5.4.5.3 della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025). La validazione dei metodi di prova deve essere effettuata conformemente a protocolli internazionalmente riconosciuti (ad esempio Decisione della Commissione Europea 2002/657/CE, ISO 5725:1994, protocolli dello IUPAC) o nel caso in cui siano stati stabiliti criteri di efficienza per i metodi analitici, sulla base di prove di conformità a tali criteri

Nel caso vengano apportate nel tempo modifiche al metodo, il laboratorio dovrà controllare nuovamente i parametri di validazione ed in particolar modo quelli più significativi rispetto alla modifiche apportate. I metodi di prova interni devono essere accompagnati da una dichiarazione di validazione ed idoneità. Le caratteristiche che definiscono le prestazioni di un metodo analitico sono: selettività/specificità, limite di rilevabilità (LOD), limite di quantificazione (LOQ), intervallo di lavoro ed intervallo di linearità, precisione (ripetibilità e riproducibilità), accuratezza, sensibilità, robustezza, recupero, incertezza di misura.

Lo stesso Reg. (CE) n.882/2004 sui controlli ufficiali, stabilisce che i metodi di prova, quando possibile, devono essere caratterizzati dai criteri indicati nell'allegato III "Caratterizzazione dei metodi di analisi": accuratezza, applicabilità (matrice e campo di misura), limite di rilevazione, limite di determinazione, precisione, ripetibilità, riproducibilità, recupero, selettività, sensibilità, linearità, incertezza delle misurazioni ed altri criteri a scelta. Spesso l'applicazione rigorosa di tutti questi parametri ai metodi analitici è difficoltosa; il laboratorio deve scegliere e valutare quali siano le grandezze significative per il metodo analitico che si accinge a validare.

La necessità di garantire a livello europeo un'applicazione omogenea della normativa nel settore della sicurezza alimentare ha indotto l'Unione Europea all'emanazione di Regolamenti che stabiliscono in settori specifici (residui di sostanze ad effetto anabolizzante e farmaci veterinari in prodotti di origine animale, contaminanti nei prodotti alimentari, ecc.) criteri per i metodi di campionamento, criteri di rendimento per le caratteristiche di prestazione dei metodi analitici, criteri per la presentazione e l'interpretazione del risultato associato all'incertezza di misura.

Tali criteri rappresentano i requisiti che i metodi di campionamento ed analisi adottati dai laboratori che operano nel settore della sicurezza alimentare devono soddisfare, qualora a livello comunitario non sia prescritto alcun metodo specifico.

I criteri di cui sopra spesso sono stabiliti solo per alcune caratteristiche di rendimento dei metodi analitici. Ad esempio il Reg. (CE) n.401/2006 stabilisce che il metodo da applicare per la determinazione dei tenori di aflatossina M1 nei prodotti alimentari deve soddisfare i criteri stabiliti per il recupero (nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,01 e 0,05 µg/kg e per concentrazioni maggiori di 0,05 µg/kg) e per la precisione in termini di riproducibilità su tutto il campo di misura (il valore massimo consentito è pari a due volte il valore calcolato con l'equazione di Horwitz).



Espressione dei risultati, incertezza di misura associata e interpretazione dei dati

L'incertezza di misura è definita come un parametro non negativo che caratterizza la dispersione dei valori di una grandezza attribuiti ad un misurando, sulla base delle informazioni utilizzate. L'intervallo di incertezza di misura fornisce indicazioni sulle prestazioni del metodo nel laboratorio.

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 richiede che il laboratorio implementi procedure per la stima dell'incertezza dei propri risultati e dichiari l'incertezza di misura nel rapporto di prova quando tale informazione può essere rilevante ai fini delle decisioni che devono essere prese in base al risultato ottenuto. In particolare l'incertezza di misura del risultato deve essere dichiarata quando ciò influisce sulla validità o sull'applicazione dei risultati di prova (quando, anche in assenza di limite di legge, il risultato dissociato dall'incertezza di misura condiziona un iter decisionale), quando le istruzioni del cliente lo richiedono, quando l'incertezza ha influenza sulla conformità ad un limite specificato.

Qualunque sia l'approccio adottato per il calcolo dell'incertezza di misura (metrologico, olistico, Horwitz) questa deve essere espressa come incertezza estesa nelle stesse unità di misura del risultato di prova: conformemente al documento EA-4/16, deve essere riportata una dichiarazione relativa al livello di fiducia ed al fattore di copertura utilizzato per il calcolo dell'incertezza estesa (per un numero sufficiente di gradi di libertà è generalmente accettato utilizzare un fattore di copertura $k = 2$ che per una distribuzione normale fornisce un livello di fiducia del 95 %).

I risultati analitici vanno espressi con un numero di cifre significative, coerenti con il numero di cifre significative dell'incertezza di misura stimata e in base a quanto indicato dal metodo di prova. Se disposizioni legislative cogenti indicano quante cifre significative devono essere utilizzate nell'espressione del risultato, queste hanno la priorità rispetto alle altre regole eventualmente presenti.

La stima dell'incertezza di misura ha importanti implicazioni nell'interpretazione dei risultati analitici soprattutto in presenza di un limite di legge.

In generale sarebbe opportuno che il criterio di valutazione della conformità di un risultato rispetto ai limiti di legge tenuto conto dell'incertezza sia quanto più possibile uniforme nei vari Paesi, ciò al fine di garantire le medesime modalità di applicazione delle normative a livello nazionale ed internazionale, sia nell'ambito della protezione della salute dei consumatori che della libera circolazione delle merci.

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 a tal proposito specifica che i rapporti di prova devono contenere per l'interpretazione dei risultati di prova, quando pertinente, una dichiarazione circa la conformità/non conformità ai requisiti e/o alle specifiche.

In alcuni casi come nel controllo dei residui e dei contaminanti nella produzione di origine animale, i criteri per la decisione o meno di conformità di un prodotto sono stati stabiliti per legge a livello comunitario dalla Decisione della Commissione 657/2002/CE: questi criteri si basano sulla definizione, da parte di ciascun laboratorio, del limite di decisione ($CC\alpha$) e della capacità di rilevazione ($CC\beta$) per livelli definiti di probabilità statistica di errore di tipo α (falsa non conformità) e di tipo β (falsa conformità). Inoltre disposizioni specifiche, quali ad esempio Reg. (CE) n.333/2007, riportano criteri per l'interpretazione del risultato associato all'incertezza di misura e criteri per la presentazione del risultato.

In assenza di disposizioni specifiche, non esiste un criterio generale per l'interpretazione del risultato rispetto al limite applicabile. L'interpretazione del risultato dovrà tenere conto delle particolari situazioni, del contesto legislativo e dei rischi associati con le decisioni prese. Indicazioni generali a questo riguardo sono contenute nella linea guida ILAC-G8. La valutazione del risultato di prova non genera dubbi quando questo, associato all'intervallo di incertezza della misura, è al di sopra o al di sotto del limite di legge.

Nei casi in cui il risultato sia superiore al limite di legge e questo sia contenuto nell'intervallo di incertezza associato al risultato o il risultato sia inferiore al limite di legge e questo sia contenuto nell'intervallo di incertezza associato al risultato, non è possibile esprimere un giudizio di conformità o non conformità con il livello di fiducia ed il fattore di copertura adottati per il calcolo dell'incertezza estesa.

In tali casi la situazione può comunque richiedere l'adozione di un criterio decisionale: l'entità del rischio associato al criterio decisionale è determinata dall'incertezza di misura associata al risultato.

Particolare attenzione deve essere posta nella valutazione della conformità nel caso in cui si debba confrontare un risultato con un unico valore limite (superiore o inferiore) o con un due limiti (il valore limite è costituito da un intervallo ovvero il risultato analitico deve essere compreso tra due valori stabiliti). Nel primo caso dovrà essere effettuato un confronto utilizzando un test statistico denominato "ad una coda" mentre nel secondo caso dovrà essere effettuato un test statistico denominato "a due code". Quello che cambia, nello specifico, sono i coefficienti statistici che determinano l'intervallo di incertezza associato al risultato.

Negli ultimi anni le disposizioni comunitarie relative alla sicurezza alimentare, hanno definito precise regole sulle modalità da utilizzare nell'espressione del risultato sul rapporto di prova e su come devono essere interpretati i risultati ottenuti ai fini della definizione della conformità o meno del prodotto alimentare.

I regolamenti europei in questione sono: il Reg. (CE) n.401/2006 relativo alle analisi riguardanti le tossine contenute in alimenti di origine vegetale, il Reg. (CE) n.333/2007 per Pb, Cd, Hg, Sn inorganico, 3-MCPD e Benzo(a)pirene in alimenti di varia origine, il Reg. (CE) n.1882/2006 per i nitrati negli alimenti di varia origine, Reg. (UE) 252/2012 ed il Reg. (CE) n.836/2011 ad integrazione del Reg. (CE) n.333/2007.

Le regole principali specificate in queste disposizioni legislative sono descritte nei successivi paragrafi.

6.1 Espressione del risultato e sua correzione per il fattore di recupero

Le disposizioni normative danno particolare enfasi all'importanza di correggere il risultato per il fattore di recupero del metodo. Tale operazione diventa indispensabile quando si devono effettuare dei confronti con dei limiti di specifica o dei limiti normativi. Infatti solo in questo modo è possibile confrontare risultati diversi tra di loro utilizzando risultati che, mediante la correzione per il recupero, non sono affetti da errori sistematici o scostamenti.

I regolamenti lasciano libertà al laboratorio di esprimere il risultato e di effettuare la correzione per il recupero, nei casi generali. Viene comunque richiesto di riportare sul rapporto di prova l'indicazione se il risultato è stato o meno corretto per il recupero e l'indicazione del suo valore. Questo per fornire al cliente la completa informazione su come è stato ottenuto il risultato analitico espresso.

Quando il laboratorio si appresta a fare dei confronti con un limite di legge, tali regolamenti obbligano però il laboratorio a correggere il risultato analitico per il recupero prima di effettuare qualsivoglia confronto e di indicare sempre, sul rapporto di prova che il risultato è stato espresso correggendolo per il recupero e quale fattore di recupero è stato utilizzato.

6.2 Espressione dell'incertezza di misura

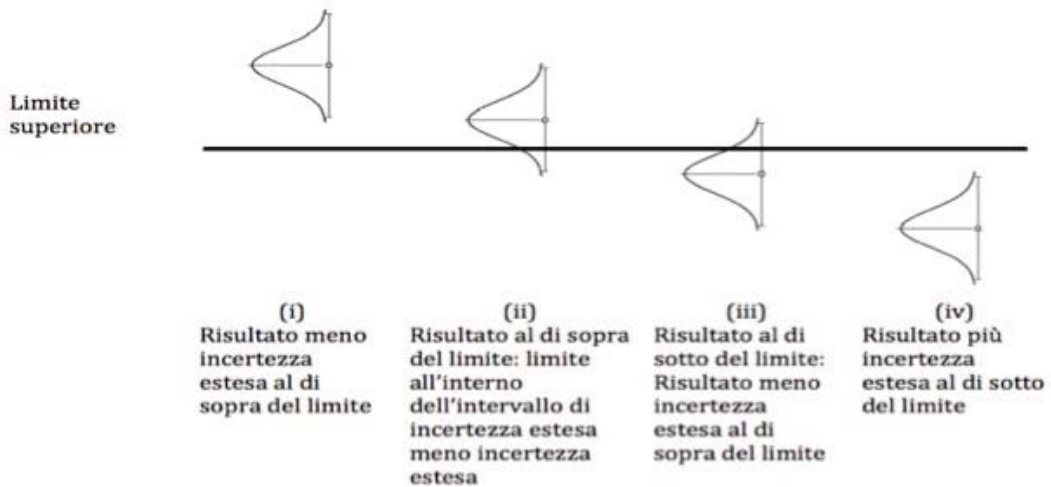
I regolamenti europei citati nel presente paragrafo prevedono di riportare sempre l'incertezza di misura a prescindere dal risultato analitico e dall'utilizzo che se ne vuole fare (ad esempio confronto con limiti di legge) quando il risultato è compreso nell'intervallo di misura del metodo analitico (incertezza di misura da indicare sul rapporto di prova quando il cliente lo richiede, come previsto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025).

6.3 Valutazione di conformità del prodotto analizzato

In questo caso i regolamenti europei, oltre ad imporre la correzione del risultato per il fattore di recupero, (vedi par. 6.1), indicano di utilizzare l'incertezza di misura per effettuare valutazioni di conformità dell'alimento rispetto ad un limite di legge; ovvero nel dichiarare la conformità/non conformità dell'alimento ad un limite di legge, deve essere tenuto conto dell'incertezza di misura *"al di là di ogni ragionevole dubbio"*.

Ciò sta ad indicare che la valutazione dovrà tener conto dell'incertezza di misura e se, il limite di legge si trova numericamente nell'intervallo di incertezza associato al risultato analitico, la valutazione che si fa non è certa ma è affetta da dubbio.

Pertanto il laboratorio è invitato a fare una valutazione della conformità o meno di una partita quando si trova nella situazione di assenza di dubbio. Tale situazione è quella riportata nei casi i) e iv) del successivo schema. Qualsiasi valutazione fatta nei casi ii) e iii) è sempre affetta da dubbio al livello di significatività che dipende dal fattore di copertura utilizzato per l'espressione del risultato.



6.4 Adempimenti richiesti dall'ente di accreditamento

ACCREDIA ha emesso il regolamento tecnico RT-08 che disciplina i requisiti che i laboratori devono soddisfare per ottenere l'accreditamento rispetto alla norma di riferimento. Tale regolamento fornisce indicazioni sull'espressione del risultato sul rapporto di prova: queste indicazioni sono generali e non si riferiscono ad una particolare tipologia di matrice analizzata.

Il contenuto del regolamento tecnico e le disposizioni legislative cogenti viste precedentemente, possono essere riassunte nella tabella successiva, come guida per i laboratori nella compilazione del rapporto di prova, per le principali matrici che rientrano, o sono assimilabili al campo dell'analisi degli alimenti.

Analita	Matrice	Indicazione del valore del recupero e della correzione del risultato (normativa)	Indicazione dell'incertezza di misura (normativa)
Aflatossine (tossine)	Prodotti alimentari	SÌ (REG.(CE) N.401/2006) SÌ (RT-08)	SÌ (REG.(CE) N.401/2006)
Cd, Pb, Hg, Sn, 3MCPD e benzo-a-pirene	Alimenti	SÌ (REG.(CE) N.333/2007 s.m.i.) SÌ (RT-08)	SÌ (REG.(CE) N.333/2007 s.m.i.)
Fitosanitari	Alimenti	SÌ (RT-08)	NO
Nitrati	Alcuni alimenti	SÌ (REG.(CE) N.1882/2006)	SÌ (REG.(CE) N.1882/2006)
Erbicidi, Fitosanitari	Acque	SÌ (RT-08)	NO



Acque destinate al consumo umano

Il DLgs del 2 febbraio 2001 n.31 ("Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano") e s.m.i. (DLgs del 2 febbraio 2002 n.27) stabilisce le caratteristiche di qualità essenziali per tutte le acque, trattate o non trattate, destinate a uso potabile o per la preparazione di alimenti in ambito domestico e per tutte le acque utilizzate in imprese alimentari per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o sostanze destinate al consumo umano. Sono escluse le acque minerali naturali e medicinali riconosciute e quelle destinate a quegli usi per i quali la qualità delle stesse non ha ripercussioni sulla salute dei consumatori.

Sono regolamentati tutti gli aspetti critici, dal punto di vista sanitario quali, tra gli altri, parametri organolettici, microbiologici e chimici, competenze, controlli e deroghe, e vengono definiti i requisiti minimi strutturali, organizzativi e tecnici. Viene stabilito quale criterio base per il controllo, l'osservanza di una serie di parametri di rilevanza sanitaria (Allegato I parti A e B) e di altri parametri "indicatori" di variazioni anomale della qualità dell'acqua (Allegato I parte C), e vengono riportate le specifiche per l'analisi dei parametri (Allegato III).

7.1 Metodi di campionamento e metodi di prova

I valori di parametro fissati nell'Allegato I devono essere rispettati nei seguenti punti (DLgs art. 5 "Punti di rispetto della conformità"):

- a) per le acque fornite attraverso una rete di distribuzione, nel punto in cui queste fuoriescono dai rubinetti utilizzati per il consumo umano;
- b) per le acque fornite da una cisterna, nel punto in cui fuoriescono dalla cisterna;
- c) per le acque confezionate in bottiglie o contenitori, rese disponibili per il consumo umano, nel punto in cui sono imbottigliate o introdotte nei contenitori;
- d) per le acque utilizzate nelle imprese alimentari, nel punto in cui sono utilizzate nell'impresa.

I controlli interni ed esterni (DLgs art. 7 e 8) volti a garantire che le acque destinate al consumo umano soddisfino nei punti di cui sopra i criteri del DLgs n.31/01, devono essere effettuati:

- a) ai punti di prelievo delle acque superficiali e sotterranee da destinare al consumo umano;

- b) agli impianti di adduzione, di accumulo e di potabilizzazione;
- c) alle reti di distribuzione;
- d) agli impianti di confezionamento di acqua in bottiglia o in contenitori;
- e) sulle acque confezionate;
- f) sulle acque utilizzate nelle imprese alimentari;
- g) sulle acque fornite mediante cisterna, fissa o mobile.

I controlli interni sono quelli effettuati dal gestore del servizio idrico integrato, per la verifica della qualità dell'acqua destinata al consumo umano, che può concordare con l'azienda unità sanitaria locale i punti di prelievo e che si avvale di laboratori di analisi interni per le attività analitiche. I controlli esterni sono quelli effettuati dalle aziende unità sanitarie locali effettuati anche sulla base di quanto prescritto dall'Allegato II del DLgs n.31/01.

L'allegato II del DLgs n.31/01 riporta in Tabella A i parametri da sottoporre a controllo di routine, controllo che fornisce ad intervalli regolari informazioni sulla qualità organolettica e microbiologica delle acque fornite per il consumo umano, nonché informazioni sull'efficacia degli eventuali trattamenti dell'acqua potabile al fine di accertare se le acque destinate al consumo umano rispondano o meno ai valori di parametro fissati dal decreto. La Tabella B1 del medesimo Allegato stabilisce la frequenza minima di campionamento ed analisi per le acque destinate al consumo umano fornite da una rete di distribuzione, da cisterne o utilizzate nelle imprese alimentari nell'ambito del controllo di verifica, controllo che mira a fornire informazioni necessarie per accertare che tutti i valori di parametro contenuti nel decreto siano rispettati.

Relativamente ai metodi di analisi l'Istituto Superiore di Sanità, ha predisposto ai sensi dell'art.11 comma 1 lettera d) del DLgs n.31/01 e s.m.i. una raccolta di metodi analitici di riferimento per la determinazione dei parametri chimici nelle acque destinate al consumo umano (Rapporto ISTISAN 07/31). Per i metodi di analisi chimici adottati per verificare la conformità ai parametri di cui all'Allegato I, parti B (parametri chimici) e C (parametri indicatori), questi devono soddisfare le caratteristiche di prestazione, riportate nell'Allegato III paragrafo 2.

Fermo restando quanto sopra riportato circa le disposizioni della normativa vigente, per gli aspetti inerenti la pianificazione dei campionamenti, per le procedure di prelievo e conservazione dei campioni che possono condizionare significativamente la qualità del dato e compromettere, in taluni casi, il giudizio di idoneità sulle acque oggetto dei controlli, disposizioni generali per i metodi chimici sono descritte ad esempio nella procedura ISS.PGA.901.rev.00 del Rapporto ISTISAN 07/31: l'obiettivo è definire i requisiti generali in merito al prelievo e alla conservazione dei campioni da analizzare al fine di evitarne il deterioramento, l'alterazione e la contaminazione.

Il laboratorio all'atto del ricevimento del campione deve valutarne la conformità a requisiti specificati in idonee procedure/istruzioni: in particolare il laboratorio deve valutare l'idoneità del volume in relazione alla tipologia dei parametri da determinare e alla eventuale necessità di effettuare sullo stesso campione differenti prove.

Il campione deve essere identificato univocamente consentendo di risalire agevolmente al verbale di prelievo associato, nel quale relativamente al prelievo devono essere riportati il numero di identificazione, il nome dell'esecutore, la data e l'ora, l'ubicazione ed il luogo, la tipologia ed il metodo e ove disponibile la tipologia del punto di prelievo, la natura e la costituzione del campione. Nel verbale deve essere anche riportata ogni informazione relativa a campioni contenenti materiali anomali con descrizione dell'anomalia osservata; tali campioni devono essere chiaramente contrassegnati.

La conservazione del campione deve avvenire in modo tale da evitare contaminazioni del campione, rallentare l'azione di agenti biologici, rallentare l'idrolisi di composti liberi e complessi, ridurre la volatilità di sostanze disciolte, ridurre gli effetti di adsorbimento: modalità di conservazione specifiche per i diversi parametri possono essere riportate nei singoli metodi. Il trasporto dei campioni deve avvenire in ambiente buio e refrigerato, mediante utilizzo di borse termiche o altri contenitori termoisolanti equipaggiati con piastre eutettiche, evitando il congelamento del campione: il laboratorio è tenuto a controllare che il trasporto del campione avvenga nelle condizioni specificate, ad esempio quelle di temperatura. In laboratorio i campioni vanno conservati ad una temperatura di refrigerazione compresa nell'intervallo tra 1 °C e 10 °C, salvo specifiche indicazioni riportate nei singoli metodi.

Tra il prelievo e l'analisi del campione deve intercorrere il minor tempo possibile. A tale riguardo la Tabella 1 della ISS.PGA.901.rev00 "Prelievo e conservazione del campione" riporta il periodo di conservazione per il quale è stata verificata una sostanziale stabilità dell'analita, nelle modalità di conservazione adottate: eventuali estensioni dei periodi indicati, così come differenti modalità di conservazione possono essere adottate previa adeguata verifica della stabilità del campione e dell'analita.

7.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova

I metodi chimici diversi da quelli predisposti dall'Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 07/31), possono essere utilizzati purché soddisfino, per i parametri per i quali vengono specificati, i criteri per le caratteristiche di prestazione (accuratezza, precisione e limite di rilevazione) riportati nell'allegato III, paragrafo 2.1.

Per caratteristica di prestazione specificata si intende che il metodo deve essere in grado, al minimo, di misurare concentrazioni uguali al valore di parametro con una accuratezza, una precisione ed un limite di rilevazione specificati. Le tabelle riportano per alcuni parametri l'accuratezza, la precisione e il limite di rilevazione in percentuale del valore di parametro; applicando le percentuali riportate al valore di parametro si ottengono il limite di rilevazione e la precisione ed accuratezza che al valore di parametro il metodo usato deve essere in grado di garantire (laddove il valore di parametro si riferisca alla somma di più analiti ad esempio nel caso dei trialometani, va posta particolare attenzione alla percentuale del valore di parametro specificata in nota alla quale per ciascun analita devono essere soddisfatti i criteri del decreto).

Ad esempio per l'azoto ammoniacale nelle acque destinate al consumo umano, il valore di parametro riportato nella parte C "Parametri indicatori" dell'allegato I del DLgs n.31/01 è pari a 0,50 mg/L e i criteri stabiliti in allegato III del medesimo decreto riportano che l'accuratezza, la precisione ed il limite di rilevazione del metodo usato devono essere pari al 10 % del valore di parametro quindi pari a 0,05 mg/L.

Il metodo dell'Istituto Superiore di Sanità per la determinazione dell'azoto ammoniacale nelle acque destinate al consumo umano è il Rapporto ISTISAN 07/31, *ISS.BHE.019.rev.00 "Ammonio: metodo spettrofotometrico al salicilato-ipoclorito (indofenolo)"*. Il metodo si applica sia alle acque da destinare e destinate al consumo umano, incluse le acque di sorgente, che alle acque di piscina e a quelle utilizzate per la produzione di acque per dialisi, nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,05 mg/L e 1,00 mg/L; il campo di misura può essere esteso a concentrazioni superiori previa diluizione del campione. Al paragrafo n. 9 "Prestazioni del metodo", si riporta che le caratteristiche di prestazione del metodo (accuratezza, precisione e limite di rilevazione) soddisfano i requisiti riportati al paragrafo 2.1 dell'Allegato III del DLgs n.31/01.

Il laboratorio che adotta il metodo ISTISAN deve verificare il rispetto dei criteri stabiliti dal DLgs n.31/01 e procedere alla valutazione dei parametri utili per lo scopo previsto del metodo. Qualora vengano adottati per le acque i metodi analitici APAT-CNR-IRSA Manuale 29/03 per la determinazione dei parametri di cui al DLgs n.31/01, il laboratorio deve verificare in fase di scelta del metodo che essi soddisfino i criteri per le caratteristiche di prestazione stabiliti nel decreto. In riferimento alla matrice, occorre poi evidenziare che nel campo di applicazione dei metodi APAT-CNR IRSA Man. 29/03 non compaiono più le "acque destinate al consumo umano" (presenti nella precedente edizione). Tuttavia la loro applicazione a questa matrice è possibile previa valutazione del campo di misura in termini di limite di rilevabilità (e quantificazione), che deve essere compatibile con il limite del DLgs n.31/01.

Nel caso specifico della determinazione dell'azoto ammoniacale la procedura APAT-CNR-IRSA Manuale 29/03 4030 riporta 4 metodi: metodo A1 "*Determinazione spettrofotometrica all'indofenolo*", metodo A2 "*Determinazione spettrofotometrica mediante reattivo di Nessler*", metodo B "*Determinazione potenziometrica*", metodo C "*Determinazione spettrofotometrica mediante reattivo di Nessler o titrimetrica con acido solforico, previa distillazione*". La valutazione documentale dei metodi evidenzia che per i metodi A2, B e C (quando l'ammoniaca presente nel distillato viene determinata mediante dosaggio titrimetrico) il campo di misura riportato non soddisfa i criteri del DLgs n.31/01 in termini di raggiungimento del limite di rilevabilità richiesto dal decreto. Il laboratorio può scegliere quale dei restanti 3 metodi adottare, procedendo alla verifica sperimentale del soddisfacimento dei criteri stabiliti dal DLgs n.31/01, come sopra descritto e alla determinazione delle caratteristiche di performance del metodo non riportate nella procedura.

7.3 Interpretazione e presentazione del risultato

Il DLgs n.31/01 riporta i criteri per la presentazione dei risultati, specificando in particolare che indipendentemente dalla sensibilità del metodo utilizzato il risultato deve essere espresso indicando lo stesso numero di cifre decimali usato per il valore di parametro di cui all'Allegato I (parti B e C). Si evidenzia come il legislatore, avendo fissato requisiti per il parametro accuratezza e per il parametro ripetibilità, intrinsecamente fissi il requisito di incertezza utile per il metodo e quindi il numero di cifre decimali da utilizzarsi. Per quanto riguarda l'interpretazione del risultato associato all'incertezza di misura si fa riferimento a quanto riportato nella parte generale (capitolo I paragrafo 4 "Risultato associato all'incertezza di misura e interpretazione dei dati") del presente documento.



Prodotti alimentari

Il Reg. (CEE) n.315/93 e s.m.i. stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari. Per “contaminante” si intende *“ogni sostanza non aggiunta intenzionalmente ai prodotti alimentari, ma in essi presente quale residuo della produzione (compresi i trattamenti applicati alle colture e al bestiame e nella prassi della medicina veterinaria), della fabbricazione, della trasformazione, della preparazione, del trattamento, del condizionamento, dell’imballaggio, del trasporto o dello stoccaggio di tali prodotti o in seguito alla contaminazione dovuta all’ambiente. I corpi estranei quali, ad esempio, frantumi di insetti, peli di animali e altri non rientrano nella presente definizione”(art.1, Reg. (CEE) 315/93).*

Il regolamento stabilisce che un prodotto alimentare non può essere commercializzato se contiene contaminanti in quantitativi inaccettabili sotto l’aspetto della salute pubblica e in particolare sul piano tossicologico. I contaminanti devono essere mantenuti ai livelli più bassi che si possano ragionevolmente ottenere attraverso buone pratiche in tutte le fasi della produzione, fabbricazione, trasformazione, preparazione, trattamento, condizionamento, imballaggio, trasporto e stoccaggio.

Il Reg. (CE) n.1881/2006 e s.m.i. con riferimento all’art. 2, paragrafo 3 del Reg. (CEE) n. 315/93 stabilisce che i prodotti alimentari elencati nell’Allegato non sono commercializzati se contengono uno dei contaminanti elencati in quantità superiore al tenore massimo indicato nell’Allegato medesimo. I tenori massimi di cui all’Allegato si applicano alla parte commestibile dei prodotti alimentari interessati, salvo quanto diversamente indicato nell’Allegato medesimo. Per garantire un’applicazione omogenea dei tenori massimi, è opportuno che le autorità competenti applichino in tutta la Comunità gli stessi criteri di campionamento e di effettuazione delle analisi e che i risultati delle analisi vengano presentati ed interpretati in modo uniforme.

8.1 Micotossine

8.1.1 Metodi di campionamento e metodi di prova

Il campionamento svolge un ruolo cruciale per quanto concerne la determinazione dei tenori di micotossine, che sono distribuite in modo estremamente eterogeneo in una partita. A tal fine il Reg. (CE) n.401/2006 (modificato dal Reg. (CE) n.178/2010 per quanto concerne le arachidi, gli altri semi oleosi, la frutta a guscio, le mandorle di albicocche, la liquirizia e l’olio vegetale), stabilisce i criteri generali ai quali si devono conformare i metodi di campionamento per le matrici trattate ed inoltre fissa i criteri generali ai quali si devono conformare i metodi di analisi per fare in modo che i laboratori utilizzino metodi di analisi con livelli di prestazione compatibili.

L'Allegato I al Reg. (CE) n.401/2006 "Metodi di campionamento per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari" fissa le disposizioni generali e i metodi di campionamento specifici per matrici alimentari ("cereali e prodotti derivati", "frutta secca comprese le uve secche e i prodotti derivati ed esclusi i fichi secchi", "fichi secchi, arachidi e frutta a guscio", "spezie", "latte e prodotti lattiero-caseari, alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, latte per lattanti e latte di proseguimento", "caffè e prodotti a base di caffè"). Viene descritta la procedura di formazione del campione globale; in particolare il regolamento riporta, per prodotto alimentare ed analita da ricercare ed in funzione del peso della partita, il numero o peso della sottopartita e per queste ultime sul peso viene specificato un criterio di accettabilità, il numero dei campioni elementari ed il peso del campione globale nonché i criteri per l'accettazione di una partita o sottopartita. Sono inoltre descritte le modalità di campionamento dei prodotti al dettaglio. In alcuni casi è previsto il ricorso ad un metodo alternativo di campionamento rispetto a quello riportato nel regolamento, purché questo sia il più rappresentativo possibile della partita campionata e sia chiaramente descritto e documentato.

8.1.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova

L'Allegato II al Reg. (CE) n.401/2006 stabilisce i "Criteri da applicare alla preparazione dei campioni e ai metodi di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari" e, nel caso in cui a livello comunitario non sia prescritto alcun metodo specifico per la determinazione dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, i laboratori possono applicare un metodo a scelta a condizione che esso rispetti i criteri di rendimento previsti nel medesimo Allegato. Un metodo di analisi che dia risultati di incertezza inferiori all'incertezza massima standard calcolata come prescritto nell'Allegato medesimo, è da ritenersi idoneo allo scopo analogamente ad un altro metodo che soddisfi i criteri di cui sopra: il ricorso all'impostazione basata sull'incertezza di misura si applica qualora il numero di metodi pienamente convalidati sia limitato come nel caso della determinazione delle tossine T-2 e HT-2.

Si sottolinea che sono disponibili metodi normalizzati CEN per l'analisi di micotossine in alimenti. La Commissione europea il 7 febbraio 2006 ha emesso un primo mandato (M 383/EN) per il Comitato Europeo di Normazione (CEN) per la standardizzazione dei metodi di prova per la determinazione delle micotossine nei prodotti alimentari. Tale mandato rientra nel quadro normativo stabilito dal Reg. (CE) n.882/2004 che prescrive i criteri di selezione dei metodi di prova.

In generale i metodi di prova per la determinazione delle micotossine, adottati dai laboratori che operano nell'ambito del controllo ufficiale ed autocontrollo dei prodotti alimentari devono rispettare i requisiti previsti dal Reg. (CE) n.401/2006. Tale regolamento riporta per i metodi di conferma quantitativi i requisiti per il recupero e per la precisione e non specifica i limiti di rilevazione, in quanto i valori di precisione sono espressi per le concentrazioni di interesse. I valori di precisione sono calcolati con l'equazione di Horwitz (nel caso di concentrazioni esterne all'intervallo in cui l'equazione di Horwitz è applicabile, è opportuno calcolare la precisione mediante l'approccio di Thompson in modo tale da ottenere valori più realistici ed applicabili). Il Reg. (CE) n.401/2006 non indica limiti né per il limite di rilevabilità (LOD), né per quello di quantificazione (LOQ), prevedendo in maniera opzionale, per alimenti di origine animale, la possibilità di calcolare il limite di decisione $CC\alpha$ (Decisione n. 657/2002/CE), per tenere conto dell'incertezza di misura ai fini della valutazione della conformità/non conformità del campione.

Il Reg. (CE) n.401/2006 pur definendo i criteri di rendimento dei metodi di analisi di conferma quantitativi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari, non definisce chiare procedure per la validazione di tali metodi. Il laboratorio a seconda dell'utilizzo del metodo di prova (finalità di screening o di conferma, per determinazioni di tipo quantitativo o qualitativo) sceglierà i parametri da valutare ed effettuerà la validazione secondo un protocollo riconosciuto a livello internazionale (ad esempio ISO 5725). Per metodo di screening si intende il metodo utilizzato per rilevare la presenza di una sostanza o di una classe di sostanze al livello di interesse. Tali metodi consentono di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi con l'obiettivo di evitare falsi risultati conformi. I metodi di conferma sono metodi che forniscono informazioni complete o complementari atte ad identificare la sostanza in modo univoco e, se necessario, quantificarla al livello di interesse.

8.1.3 Presentazione e interpretazione del risultato

Il risultato analitico da riportare nel rapporto di prova è del tipo $x \pm U$, dove x è il risultato analitico ed U l'incertezza di misura estesa (calcolata utilizzando un fattore di copertura $k = 2$ ad un livello di fiducia del 95 %). Il risultato viene corretto per il recupero; l'indicazione del recupero, e della sua eventuale correzione, va comunque riportata. Il risultato analitico corretto per il recupero e corredato dell'incertezza di misura viene utilizzato per verificare la conformità al limite massimo consentito. Per gli alimenti di origine animale è possibile stabilire il limite di decisione ($CC\alpha$) secondo la Decisione 2002/657/CE che tiene conto dell'incertezza di misura a quel livello (paragrafo 3.1.2.5 dell'Allegato alla Decisione 2002/657/CE che riporta la procedura per il calcolo del limite di decisione per sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito).

8.2 Piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-mcpd e idrocarburi policiclici aromatici

8.2.1 Metodi di campionamento e metodi di prova

Il campionamento e l'analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD (3-mono-cloro-propan-1,2-diolo) e idrocarburi policiclici aromatici di cui alle parti 3, 4 e 6 dell'Allegato del Reg. (CE) n.1881/2006 e s.m.i. sono effettuati conformemente all'Allegato del Reg. (CE) n.333/2007 recentemente modificato dal Reg. (CE) n. 836/2011. Le disposizioni stabilite dal Reg. (CE) n.882/2004 sono lasciate impregiudicate.

Nella parte B dell'Allegato al Reg. (CE) n.333/2007 così come modificato dal Reg. (CE) n.836/2011 "*Metodi di campionamento*" vengono riportate (Tabelle 1 e 2) per prodotti commercializzati sfusi e per altri prodotti, in funzione del peso delle partite, il peso e numero delle sottopartite (per queste ultime sul peso viene specificato un criterio di accettabilità), inoltre viene riportato il numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita o sottopartita, o numero di confezioni o unità, per formare il campione globale, nel caso di partita o sottopartita costituita da confezioni singole o unità singole (Tabelle 3 e 4).

La parte C del medesimo Allegato "*Preparazione dei campioni ed analisi*" riporta che i laboratori, accreditati, devono partecipare a programmi di verifica della propria competenza conformi all'*International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories* elaborato sotto l'egida dello IUPAC/ISO/AOAC e applicare procedure di controllo interno della qualità.

Se possibile è richiesta la stima dell'accuratezza e della precisione dell'analisi includendo nella stessa adeguati materiali di riferimento certificati. Vengono inoltre fornite alcune prescrizioni sulla manipolazione del campione in funzione del contaminante da ricercare. Esistono numerose procedure specifiche di preparazione dei campioni che risultano adeguate e sono utilizzabili per i prodotti considerati. Per gli aspetti non specificamente disciplinati dal regolamento risultano adeguate le disposizioni descritte nella norma UNI EN 13804 *"Prodotti alimentari - Determinazione di elementi in tracce - Criteri di prestazione, considerazioni generali e preparazione del campione"*, ma altre possono essere altrettanto valide (ad esempio UNI EN 13805 e UNI EN 13806).

I metodi da utilizzare per l'analisi relativa alla presenza di piombo nel vino sono riportati nella *"Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dei vini e dei mosti"* dell'OIV, così come stabilito dall'articolo 31 del Reg. (CE) n.479/2008.

In assenza di metodi specifici stabiliti a livello dell'Unione Europea per la determinazione dei contaminati nei prodotti alimentari, i laboratori possono applicare qualsiasi metodo di analisi convalidato per la matrice fornita a condizione che esso rispetti i criteri di prestazione stabiliti dal Reg. (CE) n.333/2007 così come modificato dal Reg. (CE) n.836/2011 (Tabelle da 5 a 7). Viene raccomandato l'utilizzo di metodi validati mediante prove interlaboratorio per la relativa matrice, se disponibili; in alternativa metodi validati internamente dal laboratorio che soddisfino i criteri stabiliti e la cui validazione comprenda l'utilizzo di materiali di riferimento certificati, laddove possibile.

8.2.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova

Il Reg. (CE) n.333/2007 così come modificato dal Reg. (CE) n.836/2011 stabilisce nella parte C *"Metodi di analisi"* i criteri di prestazione relativi ai metodi di analisi per il piombo, il cadmio, il mercurio e lo stagno inorganico, in particolare specifica i requisiti per il LOD, il LOQ, la precisione, il recupero, la specificità e l'applicabilità agli alimenti di cui al Reg. (CE) n.1881/2006 (Tabella 5); criteri di prestazione relativi ai metodi di analisi per il 3-MCPD, in particolare requisiti per LOD, LOQ, precisione, recupero, concentrazione nei bianchi campione e applicabilità agli alimenti di cui al Reg. (CE) n.1881/2006 (Tabella 6) e criteri di prestazione relativi ai metodi di analisi per il benzo(a)pirene, il benzo(a)antracene, il benzo(a)fluorantene ed il crisene, in particolare i requisiti per LOD, LOQ, precisione, recupero, specificità e applicabilità agli alimenti di cui al Reg. (CE) n.1881/2006. La verifica del soddisfacimento di tali criteri viene effettuata all'interno del campo di misura del metodo e in particolare al limite di legge.

Viene inoltre prescritto un criterio alternativo di idoneità allo scopo per i metodi validati internamente: questi devono produrre risultati con un'incertezza di misura standard combinata (composta) (u) inferiore alla massima incertezza di misura standard calcolata mediante la formula,

$$U_f = \sqrt{(\text{LOD}/2)^2 + (aC)^2}$$

dove il LOD è il limite di rilevazione del metodo che deve essere conforme ai criteri stabiliti;

C è la concentrazione di interesse in ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

"a" è un fattore numerico che dipende dal valore di C (i valori di "a" in funzione della concentrazione di interesse sono riportati in Tabella 8 del medesimo regolamento).

8.2.3 Presentazione e interpretazione del risultato

I risultati devono essere espressi nelle stesse unità di misura e con lo stesso numero di cifre significative previste per i tenori massimi di cui al Reg. (CE) n.1881/2006.

Se il metodo analitico prevede una fase di estrazione occorre correggere il risultato analitico per il fattore di recupero. Il fattore di recupero deve essere riportato, come pure la sua eventuale correzione.

Se il metodo analitico non prevede una fase di estrazione (ad esempio nel caso dei metalli), il risultato può essere presentato non corretto per il recupero purché si dimostri, preferibilmente mediante adeguati materiali di riferimento certificati, il raggiungimento della concentrazione certificata tenendo conto dell'incertezza di misura. Va riportato il fatto che il risultato è presentato non corretto per il recupero. Il risultato analitico viene riportato come $x \pm U$, dove x è il risultato analitico ed U l'incertezza di misura estesa (calcolata utilizzando un fattore di copertura $k = 2$ ad un livello di fiducia del 95 %).

Il Regolamento stabilisce criteri ai fini dell'interpretazione del risultato. Una partita o sottopartita è accettata se il risultato dell'analisi sul campione di laboratorio non supera il relativo tenore massimo stabilito dal Reg. (CE) n.1881/2006, tenuto conto dell'incertezza estesa e della correzione del risultato per il recupero qualora il metodo analitico abbia comportato una fase di estrazione.

Una partita o sottopartita è rifiutata se il risultato dell'analisi sul campione di laboratorio supera "oltre ogni ragionevole dubbio" il relativo tenore massimo stabilito dal Reg. (CE) n.1881/2006, tenuto conto dell'incertezza di misura estesa e della correzione del risultato per il recupero, nel caso in cui il metodo analitico utilizzato abbia comportato una fase di estrazione.

8.3 Nitrati

8.3.1 Metodi di campionamento e metodi di prova

Il campionamento, la preparazione dei campioni e le analisi finalizzate al controllo ufficiale tenore della concentrazione di nitrati negli alimenti di cui alla sezione I dell'Allegato al Reg. (CE) n.1881/2006 devono essere effettuati nel rispetto dei metodi di cui all'Allegato al Reg. (CE) n.1882/2006. I campioni globali ottenuti seguendo i metodi fissati nell'Allegato vengono considerati rappresentativi delle partite.

La parte B dell'Allegato al Reg. (CE) n.1882/2006 fornisce prescrizioni in merito al metodo di campionamento suddivise in "*Campionamento su campo*", "*Campionamento di partite di spinaci, lattuga, alimenti per la prima infanzia e alimenti a base di cereali lavorati destinati ai lattanti e ai bambini reperite sul mercato*" e "*Campionamento nella fase di distribuzione al dettaglio*".

Il regolamento riporta che qualora sia impossibile applicare le modalità di prelievo descritte, si può ricorrere ad un metodo alternativo, a condizione che il campione globale risulti sufficientemente rappresentativo della partita campionata e che il metodo applicato sia descritto e documentato. Il punto della partita dal quale prelevare un campione va di preferenza scelto in maniera casuale; qualora ciò risulti impossibile, il punto va scelto a caso nelle parti accessibili della partita.

I metodi di analisi utilizzati per il controllo devono risultare conformi alle disposizioni dei punti 1 e 2 dell'Allegato III del Reg. (CE) n.882/2004.

8.3.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova

Il Reg. (CE) n. 1882/2006 fornisce prescrizioni specifiche sulla procedura di estrazione e sui criteri di rendimento per alcune caratteristiche di rendimento (recupero e precisione) dei metodi di analisi impiegati nel controllo dei nitrati. Esso specifica che gli intervalli di concentrazione non vengono precisati poiché i valori di precisione (calcolati mediante l'equazione di Horwitz) sono valutati alle concentrazioni di interesse.

8.3.3 Presentazione e interpretazione del risultato

Il risultato analitico può essere riportato in forma corretta o meno per il recupero, Vanno indicati il modo in cui è stato espresso il risultato analitico ed il fattore di recupero. Il risultato analitico corretto per il fattore di recupero deve essere utilizzato per verificare la conformità ai limiti di legge.

Il risultato analitico viene riportato come $x \pm U$, dove x è il risultato analitico ed U l'incertezza di misura estesa (calcolata utilizzando un fattore di copertura $k = 2$ ad un livello di fiducia del 95 %).

Nella parte B dell'Allegato sono riportate le prescrizioni per l'accettazione/rifiuto di una partita o sottopartita in funzione del risultato, dell'incertezza e del recupero. Una partita o sottopartita viene accettata nel caso in cui il campione di laboratorio rispetti i limiti massimi, tenendo conto dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero; una partita o sottopartita viene scartata nel caso in cui il campione di laboratorio "al di là di ogni ragionevole dubbio" superi i limiti massimi, tenendo conto dell'incertezza di misurazione e della correzione per il recupero (per valutare la rispondenza alle prescrizioni s'impiegano i risultati analitici, corretti per il recupero e sottratti dell'incertezza estesa di misura).

8.4 Residui di anabolizzanti e di altre sostanze farmacologicamente attive

8.4.1 Metodi di campionamento e metodi di prova

La Direttiva 96/23/CE del Consiglio del 29 aprile 1996, recepita in Italia dal DLgs n.4 agosto 1999, n.336, concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti, stabilisce le misure di controllo relative alle sostanze e alle categorie di residui di cui all'Allegato I (Sostanze Categoria A – "*Sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate*" e Sostanze Categoria B – "*Medicinali veterinari e agenti contaminanti*").

Le disposizioni della direttiva sono finalizzate alla sorveglianza del processo di allevamento degli animali e di prima trasformazione dei prodotti di origine animale per la ricerca dei residui e delle sostanze di cui sopra negli animali vivi, nei loro escrementi e liquidi biologici, nonché nei tessuti, nei prodotti di origine animale, negli alimenti per animali e nell'acqua di abbeveraggio.

Essa prescrive l'elaborazione da parte di ciascuno Stato membro di un piano di sorveglianza e di monitoraggio della presenza, in animali e in alimenti di origine animale, dei residui di cui all'Allegato I. Tale piano deve:

- a) prevedere la ricerca dei gruppi di residui o di sostanze secondo il tipo di animale, conformemente all'Allegato II;

-
- b) precisare in particolare le misure relative alla ricerca della presenza: i) delle sostanze di cui alla lettera a) negli animali, nelle acque di abbeveraggio degli animali e in tutti i luoghi in cui gli animali sono allevati o tenuti; ii) di residui delle suddette sostanze negli animali vivi, nei loro escrementi e liquidi biologici, nei loro tessuti e nei prodotti di origine animale, quali carne, latte, uova, miele;
- c) attenersi alle norme e ai livelli e frequenze di campionamento di cui agli allegati III e IV.

Le modalità di applicazione per il prelievo ufficiale dei campioni, compresi i criteri da seguire per il campionamento mirato, sono stabilite nell'Allegato alla Decisione della Commissione n. 98/179/CE.

Le strategie di campionamento mirano a:

- a) svelare qualsiasi trattamento che possa definirsi illegale ai sensi dell'art. 2, lett. b), della Dir. 96/23/CE;
- b) controllare il rispetto dei limiti massimi di residui (LMR) di farmaci veterinari fissati negli allegati I e III del Reg. (CEE) n.2377/90 (tale regolamento è stato abrogato dal Reg. (CE) n.470/2009, che riguarda le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto concerne i limiti massimi di residui di cui agli allegati da I a IV del Reg. (CEE) n.2377/90, senza apportarvi modifiche; successivamente il Reg. (UE) n.37/2010 classifica le sostanze farmacologicamente attive per le quali sono stati stabiliti limiti massimi di residui), nonché delle quantità massime di anti-parassitari stabilite negli allegati al Reg. (CE) n.396/2005 e s.m.i o previste dalle normative nazionali in materia di contaminazione ambientale;
- c) a sorvegliare e rivelare le ragioni della presenza di residui negli alimenti di origine animale.

Per le sostanze della categoria A, la sorveglianza è finalizzata alla ricerca di somministrazione illecita di sostanze vietate e di uso improprio di sostanze autorizzate.

8.4.2 Caratteristiche di prestazione dei metodi di prova

La Decisione della Commissione 2002/657/CE del 12 agosto 2002, relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati, attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio e stabilisce criteri di rendimento e procedure per la convalida dei metodi di screening e di conferma, e criteri comuni per l'interpretazione dei risultati analitici. Al fine di garantire l'attuazione armonizzata della Dir. 96/23/CE è emersa l'esigenza di stabilire criteri comuni per l'interpretazione dei risultati delle prove dei laboratori di controllo ufficiale e limiti minimi di rendimento richiesti (LMRR) dei metodi analitici per le sostanze per le quali non è stato definito alcun limite consentito o per quelle sostanze il cui impiego non è autorizzato o espressamente vietato all'interno della UE.

Essa non si applica alle sostanze per le quali siano state stabilite successivamente alla sua emanazione norme specifiche a livello europeo. I metodi analitici devono rispettare i requisiti di prestazione riportati nella parte 2 (*"Criteri di rendimento e altre prescrizioni per i metodi analitici"*) dell'Allegato alla decisione ed essere convalidati conformemente alle procedure descritte nella parte 3 (*"Validazione"*) del medesimo Allegato; i criteri per l'interpretazione del risultato sono riportati all'art. 6.

Per “*caratteristica di rendimento*” si intende la qualità funzionale che può essere attribuita ad un metodo analitico, mentre per “*criterio di rendimento*” si intende la prescrizione per una caratteristica di rendimento in base alla quale è possibile stabilire che il metodo analitico è adeguato e che genera risultati affidabili.

Nell'introduzione alla Parte 2 dell'Allegato alla Decisione è prevista la possibilità di utilizzare metodi analitici o combinazioni di metodi diversi da quelli descritti ai fini di screening o di conferma solo nel caso in cui sia possibile dimostrare il rispetto delle prescrizioni pertinenti stabilite nella decisione. A tale proposito occorre tuttavia evidenziare che la Decisione non riporta istruzioni dettagliate in merito alla validazione dei metodi di screening, per le quali si rimanda al documento “*Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer)*” emanato dai Laboratori Europei di Riferimento per i residui reperibile e scaricabile all'indirizzo:

http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf.

La decisione fornisce prescrizioni generali in merito alla manipolazione del campione, e all'esecuzione delle prove (recupero, per i metodi quantitativi, da applicare a tutti i risultati sia durante la validazione sia nell'applicazione del metodo, tranne nel caso in cui si utilizzi un adeguato standard interno). Stabilisce inoltre che per finalità di screening possono essere utilizzate solo quelle tecniche la cui validazione possa essere dimostrata e che al livello di interesse presentino un tasso di falsi conformi inferiore al 5 %. Per i metodi di conferma per i residui ed i contaminanti organici vengono stabilite le tecniche di misurazione per le categorie di sostanza e le relative limitazioni nell'applicazione (Tabella 1. “*Metodi di conferma adeguati per residui o contaminanti organici*”).

Al fine di garantire il controllo di qualità del risultato analitico ed in accordo con quanto prescritto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, la decisione raccomanda di introdurre in ogni serie analitica un campione di controllo fortificato al limite minimo di rendimento richiesto (LMRR) o al limite massimo di residuo (LMR) oppure per sostanze vietate o non autorizzate un campione di controllo fortificato al CC β . Sono stabiliti criteri per l'accuratezza dei metodi quantitativi (Tabella 2. “*Accuratezza minima dei metodi quantitativi*”), calcolata mediante l'utilizzo di un materiale di riferimento certificato (MRC) o, in sua assenza, di un materiale bianco fortificato con l'analita di interesse e criteri per la precisione dei metodi quantitativi (criteri di accettabilità per il coefficiente di variazione (CV) inter-laboratorio ed intra-laboratorio) (Tabella 3 “*Esempi di CV di riproducibilità per metodi quantitativi a intervalli di frazione di massa dell'analita*”).

La Decisione specifica poi i criteri di rendimento per la rilevazione mediante spettrometria di massa: in particolare vengono stabiliti criteri di accettabilità per la separazione cromatografica (tempo di ritenzione minimo accettabile per l'analita in studio e criteri di accettabilità per il tempo di ritenzione relativo dell'analita rispetto a quello dello standard nella soluzione di taratura) e criteri di accettabilità per l'intensità degli ioni diagnostici misurati con differenti tecniche di spettrometria di massa (Tabella 4. “*Tolleranze massime consentite per intensità di ioni relative utilizzando una gamma di tecniche di spettrometria di massa*”).

Viene introdotto un sistema di punti di identificazione per la conferma delle sostanze elencate nel gruppo A (4 punti di identificazione) e nel gruppo B (3 punti di identificazione) dell'Allegato I alla Dir. 96/23/CE, quando per la misura dei frammenti di massa si utilizzino tecniche diverse dalla scansione totale (Tabella 5. “*La relazione tra una gamma di classi di frammenti di massa ed i punti di*

identificazione ottenuti” e Tabella 6. “Esempi del numero di punti di identificazione ottenuti da una gamma di tecniche e per le loro combinazioni”).

La decisione specifica i criteri di rendimento per la cromatografia accoppiata alla rilevazione con tecniche agli infrarossi e con altre tecniche di rilevazione (UV/VIS a scansione totale e UV/VIS a lunghezza d’onda singola, rilevazione fluorimetrica, determinazione per mezzo di LC/immunogramma). Riporta inoltre prescrizioni per la determinazione di un analita per mezzo della tecnica TLC bidimensionale accoppiata alla rilevazione UV/VIS spettrometrica a scansione totale e per la determinazione di un analita per mezzo della GC in combinazione con l’ECD (rilevazione con cattura degli elettroni).

Vengono stabiliti i metodi di conferma adeguati per l’identificazione degli elementi chimici (Tabella 7. “Metodi di conferma adeguati per gli elementi chimici”), fornendo prescrizioni specifiche per le tecniche specificate per tali metodi di conferma. Stabilisce inoltre criteri di rendimento per i metodi di conferma e per i metodi di analisi quantitativi (criteri per l’accuratezza valutata mediante l’utilizzo di MRC o mediante l’aggiunta di quantità note dell’elemento a campioni incogniti e criteri per la precisione in termini di coefficiente di variazione intra-laboratorio (Tabella 8. “CV per metodi quantitativi a intervalli di frazioni di massa dell’elemento”).

La parte 3 dell’Allegato riguarda la validazione, il cui scopo è di dimostrare che il metodo analitico è conforme ai criteri applicabili per le caratteristiche di rendimento pertinenti ed in Tabella 9 vengono riportate le caratteristiche di rendimento da determinare per ogni tipo di metodo (qualitativo o quantitativo, di screening o di conferma).

La validazione può essere condotta mediante la partecipazione ad uno studio collaborativo (pur considerando che non tutte le caratteristiche di prestazione di un metodo possono essere determinate in tal modo), oppure mediante l’utilizzo di metodi alternativi (validazione in un singolo laboratorio) o mediante il processo di validazione interna su cui la decisione riporta esempi o riferimenti per le procedure di validazione dei metodi analitici, non escludendo la possibilità di utilizzare altri approcci purché questi forniscano informazioni di pari livello e qualità.

Un aspetto centrale della Dec. 2002/657/CE è la definizione delle caratteristiche di rendimento dei metodi analitici, ovvero di quell’insieme di qualità funzionali che possono essere attribuite ad un metodo di analisi. In tale ambito assume particolare rilevanza la validazione dei metodi che, in base alla definizione della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, è la conferma attraverso esame e l’apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l’utilizzazione prevista siano soddisfatti. La validazione, come sopra riportato è finalizzata a dimostrare che un metodo è idoneo allo scopo per il quale è applicato, ossia se è in grado di risolvere un determinato problema analitico. I risultati ottenuti attraverso il processo di validazione forniscono pertanto l’evidenza oggettiva che il metodo analitico è conforme ai criteri applicabili per le caratteristiche di rendimento pertinenti.

Differenti finalità di controllo richiedono differenti categorie di metodi. Ne consegue che le caratteristiche di rendimento da verificare dipendono dalla tipologia del metodo stesso. In particolare selettività, specificità, applicabilità, robustezza e stabilità devono essere sempre determinati per tutti i metodi, siano essi qualitativi, quantitativi, di screening o di conferma; $CC\alpha$ e $CC\beta$ devono sempre essere determinati per i metodi di conferma sia qualitativi che quantitativi; altri parametri quali accuratezza o recupero e precisione devono essere determinati solo per le tecniche di conferma.

Per quanto riguarda l'accuratezza, questa può essere valutata mediante un MRC o, in sua assenza, in termini di recupero con un materiale bianco fortificato con l'analita/gli analiti di interesse. Vengono inoltre stabiliti criteri per la stabilità dell'analita in soluzione (Tabella 12) e in matrice valutata attraverso un MRC oppure mediante materiale bianco fortificato; va comunque sottolineato che la stabilità non deve necessariamente essere calcolata in ogni singolo laboratorio, ma può essere desunta da altre fonti quali dati pubblicati nella letteratura scientifica o informazioni fornite dal laboratorio comunitario di riferimento per la sostanza in studio) e lo studio della curva di taratura (è necessario definire la formula matematica che descrive la curva di taratura, valutare la bontà dell'adattamento dei dati sulla curva e definire gli intervalli di accettabilità per i parametri della curva).

Le procedure di validazione convenzionali prevedono la valutazione del recupero con un MRC o in sua assenza con una matrice bianca fortificata, oppure mediante il metodo di aggiunta dello standard, la valutazione della ripetibilità, della riproducibilità intra-laboratorio (ovvero ripetibilità intermedia) e della riproducibilità (valutabile mediante la partecipazione a studi collaborativi (ISO 5725-2)) e della robustezza. La precisione per sostanze per le quali è stato stabilito un LMRR o un LMR viene calcolata fortificando un materiale bianco ad 1, 1,5, 2 volte il valore dell'LMRR o dell'LMR, altrimenti per sostanze vietate o non autorizzate si utilizza 1, 1,5, 2 il valore del $CC\beta$.

Uno dei concetti fondamentali introdotti dalla Dec. 2002/657/CE riguarda il calcolo del $CC\alpha$ e del $CC\beta$. L'acronimo CC indica la concentrazione critica, ed è caratterizzato da valori definiti di errore di tipo α e di tipo β , introdotti in statistica attraverso il test d'ipotesi. Essi trovano origine dalla variabilità associata al segnale registrato ogni qual volta si esegue un'analisi su un dato strumento. Questa variabilità è dovuta sostanzialmente a due tipi di fattori: quelli derivanti dal rumore di fondo, di carattere strumentale, riconducibili all'effetto matrice, che è correlato alla specificità del metodo, e quelli derivanti dalla misurazione, correlati alla sensibilità e alla ripetibilità. I concetti di $CC\alpha$ e $CC\beta$ consentono di caratterizzare questi due differenti fattori, essendo associati al rischio statistico di prendere una decisione errata.

A fronte del risultato di una misurazione eseguita da un laboratorio per la determinazione della concentrazione di uno specifico analita in un campione, si presenta la necessità di dichiarare la conformità/non conformità del campione a seconda se il valore misurato è al di sopra il limite di non conformità o al di sotto.

Poiché il valore misurato è affetto da un errore analitico, possono essere prese decisioni errate. In particolare: un campione contenente un analita al di sotto del limite può essere erroneamente considerato come non conforme poiché il valore misurato è sopra il limite. La probabilità che si incorra in tale errore è indicata come errore α . Il Limite di Decisione ($CC\alpha$) è definito quindi come il limite al quale e oltre il quale è possibile concludere con una probabilità di errore pari ad α che un campione è non conforme. Il Limite di Decisione è un parametro che assume quindi un carattere legale per la sua rilevanza nelle decisioni di tipo positivo/negativo, riguardando la probabilità che un campione, risultato positivo all'analisi non contenga di fatto l'analita, configurando così un "rischio economico" (ad esempio per i produttori).

Per le sostanze vietate (gruppo A, Allegato I della Direttiva 96/23/EC), il $CC\alpha$ rappresenta la più bassa concentrazione di una sostanza alla quale il metodo è in grado di stabilire che la sostanza è effettivamente presente con una certezza statistica di $[1 - \alpha]$ ($\alpha = 1\%$).

Per sostanze con LMR, il $CC\alpha$ rappresenta invece la concentrazione al di sopra della quale il con-

tenuto di analita è considerato superiore al valore di LMR, con una certezza statistica $[1 - \alpha]$ ($\alpha = 5\%$).

Analogamente, un campione contenente la concentrazione vera di un analita al di sopra del limite può essere erroneamente considerato conforme, poiché il valore misurato è al di sotto del limite. Anche questo tipo di errore può manifestarsi con una data probabilità, espressa come errore β .

La Capacità di Rivelazione ($CC\beta$) rappresenta il contenuto più piccolo della sostanza che è possibile rivelare, identificare e/o quantificare in un campione con una probabilità di errore di β .

La capacità di rivelazione è un parametro di carattere analitico, relativo alle performances del metodo, e riguarda la probabilità che un campione, risultato negativo all'analisi, contenga di fatto l'analita, configurando un "rischio sanitario" (ad esempio per i consumatori).

Se per una sostanza non è stato stabilito un limite consentito, la capacità di rilevazione è il livello di concentrazione più basso al quale un metodo è in grado di rilevare campioni effettivamente contaminati con una certezza statistica di $1 - \beta$ (95%). Per le sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito, ciò significa che la capacità di rilevazione è la concentrazione alla quale il metodo è in grado di rilevare le concentrazioni limite consentite con una certezza statistica di $1 - \beta$ (95%).

I valori $CC\alpha$ e $CC\beta$ indicano pertanto le concentrazioni alle quali tali errori si verificheranno con una probabilità definita. Nel campo di applicazione della Dec. 2002/657/CE, i valori di $CC\alpha$ e $CC\beta$ sono considerati quali importanti caratteristiche di prestazione dei metodi analitici, e necessitano di essere valutati sperimentalmente.

Un altro concetto introdotto con la Decisione 2002/657/CE è il limite minimo di rendimento richiesto (LMRR), ovvero il contenuto minimo di analita in un campione che deve essere rilevato e confermato. Tale limite è volto ad armonizzare il rendimento analitico dei metodi sviluppati dai vari laboratori per le sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito. Per alcune sostanze vietate, la Normativa Comunitaria ha fissato gli LMRR, come ad esempio per cloramfenicolo (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in carni, uova, latte, urina, prodotti dell'acquacoltura, miele), acetato di medrossiprogesterone (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in grasso di rognone di suino), metaboliti dei nitrofurani (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in carni di pollame, prodotti dell'acquacoltura) e somma di verde di malachite e di leucomalachite (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in prodotti dell'acquacoltura).

E' importante sottolineare che mentre gli LMRR sono definiti dall'Autorità competente, il $CC\alpha$ e il $CC\beta$ sono caratteristiche di performance di un dato metodo di analisi così come sviluppato dal laboratorio. Gli LMRR inoltre si applicano esclusivamente alle sostanze vietate appartenenti al Gruppo A dell'Allegato I della Direttiva 96/23/EC.

La correlazione tra questi parametri è riportata nel Documento SANCO/2004/2726 Final che contiene indicazioni per l'implementazione della Dec. 2002/657/CE ($CC\alpha < CC\beta \leq \text{LMRR}$). In tale documento è fatta inoltre raccomandazione di garantire che il $CC\alpha$ e il $CC\beta$ siano verificati sperimentalmente, mediante addizione a 20 bianchi rappresentativi dell'analita di interesse alle medesime concentrazioni. Il metodo di analisi deve essere in grado di rivelare/identificare l'analita al $CC\alpha$ e al $CC\beta$ nel 50% e nel 95% dei casi rispettivamente. Laddove le percentuali ottenute siano inferiori a tali valori, si può concludere che i valori di $CC\alpha$ e $CC\beta$ calcolati sono troppo bassi, richiedendo ulteriori studi di validazione su tali caratteristiche di performance.

Vengono quindi specificate le procedure per il calcolo del $CC\alpha$ e del $CC\beta$ nel caso delle sostanze con o senza limite stabilito, secondo due procedure.

Nel caso di sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito, è previsto l'utilizzo di materiale bianco fortificato al livello di rendimento minimo richiesto, o al di sopra di tale livello, ad intervalli equidistanti, analizzando i campioni. Dopo l'identificazione dell'analita, si traccia il grafico del segnale rispetto alla concentrazione aggiunta: la concentrazione corrispondente all'intercetta dell'asse y più 2,33 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio (in termini di ripetibilità intermedia) del punto di intercetta equivale al limite di decisione.

Alternativamente è prevista la predisposizione di una curva di taratura, analizzando 20 materiali bianchi e calcolando il rapporto segnale/rumore; il $CC\alpha$ è calcolato come tre rapporti segnale/rumore.

Nel caso di sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito, è impiegato un materiale bianco fortificato al limite consentito ad intervalli equidistanti, analizzando i campioni. Dopo l'identificazione dell'analita, si traccia il grafico del segnale rispetto alla concentrazione aggiunta. La concentrazione corrispondente al limite consentito più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio (in termini di ripetibilità intermedia) equivale al limite di decisione ($\alpha = 5\%$). Alternativamente si analizzano almeno 20 materiali bianchi per matrice fortificati con l'analita/gli analiti al limite consentito. La concentrazione al limite consentito più 1,64 volte la deviazione standard corrispondente equivale al limite di decisione ($\alpha = 5\%$).

Analogamente per il calcolo del $CC\beta$ nel caso di sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito, è previsto l'utilizzo di materiale bianco rappresentativo, fortificato al livello di rendimento minimo richiesto e al di sopra, ad intervalli equidistanti, analizzando i campioni. Dopo l'identificazione, si traccia il grafico del segnale rispetto alla concentrazione aggiunta.

La concentrazione corrispondente al limite di decisione più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio (in termini di ripetibilità intermedia) del contenuto medio misurato al limite di decisione equivale alla capacità di rilevazione ($\beta = 5\%$). In alternativa, si analizzano almeno 20 materiali bianchi per matrice fortificati con l'analita/gli analiti al limite di decisione, analizzando i campioni e identificando gli analiti. Il valore del limite di decisione più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio (ossia in termini di ripetibilità intermedia) del contenuto misurato equivale alla capacità di rilevazione ($\beta = 5\%$).

Qualora non siano disponibili risultati quantitativi la capacità di rilevazione può essere determinata dallo studio del materiale bianco fortificato al limite di decisione e oltre. In questo caso il livello di concentrazione, dove rimangono solo $\leq 5\%$ di falsi risultati conformi, equivale alla capacità di rilevazione del metodo. Al fine di garantire una base affidabile per tale determinazione si devono pertanto eseguire almeno 20 studi per almeno un livello di concentrazione.

Nel caso di sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito, è previsto l'utilizzo di materiale bianco rappresentativo, fortificato al limite consentito ad intervalli equidistanti, analizzando i campioni, identificando l'analita/gli analiti e calcolando la deviazione standard del contenuto medio misurato al limite di decisione. La concentrazione corrispondente al valore del limite di decisione più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio (ossia in termini di ripetibilità intermedia) equivale alla capacità di rilevazione ($\beta = 5\%$).

In alternativa, si analizzano almeno 20 materiali bianchi per matrice fortificati con l'analita/gli analiti al limite di decisione. Il valore del limite di decisione più 1,64 volte la deviazione standard corrispondente equivale alla capacità di rilevazione ($\beta = 5\%$).

Il $CC\alpha$ e $CC\beta$ per i metodi di screening possono essere stimati mediante l'unico segnale diagnostico utilizzato; per i metodi di conferma quando il segnale sia più di uno, si propone di scegliere quello più critico (ad esempio nel caso di determinazione mediante spettrometria di massa usando la tecnica "Multiple Reaction Monitoring" MRM: per il calcolo del $CC\alpha$, segnale della transizione meno intensa; per il calcolo del $CC\beta$, segnale della transizione più intensa). Per sostanze per le quali è stato stabilito un LMRR il valore del $CC\beta$ dovrebbe essere inferiore o uguale all'LMRR, per sostanze vietate o non autorizzate il $CC\beta$ dovrebbe essere il più basso possibile. I valori trovati per il $CC\alpha$ ed il $CC\beta$ devono essere sempre verificati sperimentalmente fortificando i campioni al $CC\alpha$ ed al $CC\beta$ e confermando che l'errore β al $CC\alpha$ sia del 50% ed al $CC\beta$ sia del 5% (la verifica deve essere effettuata anche per i metodi di screening).

Per sostanze per le quali è stato stabilito un LMR, i valori trovati per il $CC\alpha$ ed il $CC\beta$ dovrebbero essere superiori all'LMR.

Per sostanze per le quali è stabilita un LMR come somma di più analiti (ad esempio sulfamidici, tetracicline), sono proposti due differenti approcci per calcolare il $CC\alpha$ come somma.

Il primo si basa sul calcolo degli scarti tipo (SDi), determinati nel corso della validazione del metodo, pesati in relazione alla quantità percentuale (w_i) nel campione reale e sommati attraverso la legge di propagazione dell'errore. Il valore del $CC\alpha$, ottenuto con la seguente espressione $CC\alpha = MRL + 1,64\sqrt{\sum(w_i SD_i)^2}$, confrontato con la somma delle concentrazioni trovate nel campione, consente di stabilire la conformità/non conformità del campione stesso.

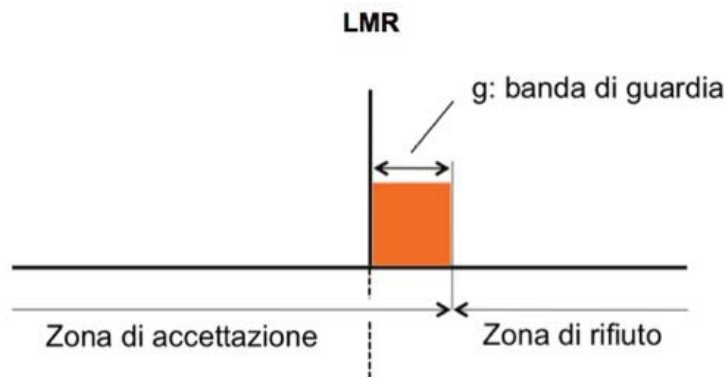
Nel caso di matrici contenenti sostanze precursori e loro metaboliti, per i quali siano noti i rapporti di concentrazione, il secondo approccio prevede il calcolo del $CC\alpha$ della somma in fase di validazione come somma dei $CC\alpha$ individuali ($CC\alpha_{\text{precursore}} + CC\alpha_{\text{metabolita}}$), tenendo conto del contributo di ciascuna sostanza al LMR.

8.4.3 Presentazione e interpretazione del risultato

Un altro importante aspetto introdotto dalla Dec. 2002/657/CE riguarda le considerazioni sull'interpretazione dei risultati alla luce delle caratteristiche di performances, $CC\alpha$ e $CC\beta$. In particolare l'articolo 6 stabilisce che il risultato di un'analisi sarà considerato non conforme se viene superato il limite di decisione ($CC\alpha$) del metodo di conferma per l'analita.

Alla base di tale valutazione della conformità, è posto il concetto delle cosiddette regole di decisione, trattato nella guida EURACHEM/CITAC "Use of uncertainty information in compliance assessment" - First Edition 2007. La guida indica che, al fine di utilizzare un risultato per poter procedere ad una dichiarazione di conformità o non conformità ad una specifica, si debba tener conto dell'incertezza di misura.

Le regole di decisione prescrivono l'accettazione o il rifiuto del campione in esame in base al risultato della misurazione, della sua incertezza associata e del limite o dei limiti di specifica, tenendo conto del livello di accettabilità della probabilità di prendere una decisione errata. Sulla base delle regole di decisione, è stabilita una zona di accettazione e una zona di rifiuto, in modo tale che se il risultato della misurazione si trova all'interno della zona di accettazione, il prodotto è dichiarato conforme.



Se invece il risultato della misurazione si trova all'interno della zona di rifiuto, il prodotto è dichiarato non-conforme. Quanto sopra riportato, applicato ad esempio al caso di una sostanza con LMR, è illustrato nella seguente figura:

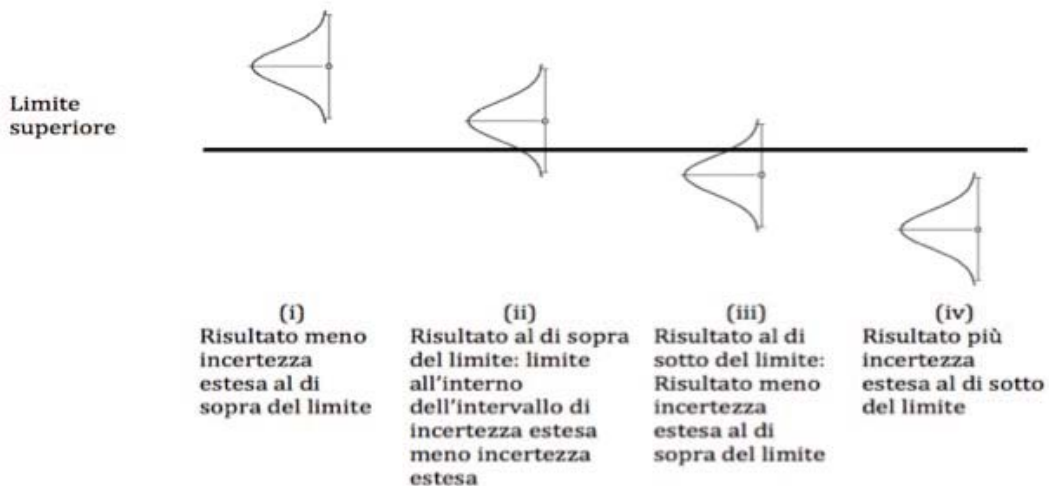
La Dec. 2002/657/CE prevede dunque la non conformità al superamento del $CC\alpha$: questa è una regola di decisione per non conformità, con bassa probabilità di falsa non conformità. Per mezzo di questa regola di decisione può essere definita una zona di rifiuto. L'inizio della zona di rifiuto è al LMR più una quantità g , denominata banda di guardia. Il valore di g è scelto in modo tale che per un risultato di misura maggiore o uguale a $L+g$, la probabilità di una falsa non conformità è inferiore o uguale ad α ; cioè se il risultato è nella zona di rifiuto, la regola dà una bassa probabilità che il limite consentito non sia stato effettivamente superato. In generale, g sarà un multiplo dell'incertezza standard u e la regola di decisione stabilisce il valore del multiplo da utilizzare. Nel caso in cui la distribuzione dei valori probabili del misurando è approssimativamente normale, un valore di $1,64u$ darà una probabilità del 5 % e un valore di $2,33u$ implica un valore di probabilità dell'1 %.

Il $CC\alpha$ è la concentrazione misurata più bassa alla quale è certo, con una data probabilità, che la concentrazione vera è al di sopra del livello permesso. Quindi il $CC\alpha$, equivalente a $L+g$, è un limite di decisione e il rischio che il valore vero sia al di sotto del limite permesso è caratterizzato dall'errore α .

Il $CC\alpha$ è la concentrazione misurata più bassa alla quale è certo, con una data probabilità, che la concentrazione vera è al di sopra del livello permesso. Quindi il $CC\alpha$, equivalente a $L+g$, è un limite di decisione e il rischio che il valore vero sia al di sotto del limite permesso è caratterizzato dall'errore α .

Per ribadire il concetto in base al quale il contributo quantitativo dovuto all'incertezza di misura sia di fatto contenuto nel $CC\alpha$, è utile prendere in considerazione la figura seguente che riporta i tipici scenari che si possono delineare in seguito a risultati di misurazioni di concentrazione

di un analita, e come questi possano essere utilizzati per stabilire la conformità ad un limite superiore di specifica. Le linee verticali mostrano l'incertezza estesa $\pm U$ associata ad ogni risultato e le relative curve indicano la funzione della densità di probabilità dei valori del misurando, che mostra la maggiore probabilità che il valore del misurando sia in prossimità del centro dell'intervallo di incertezza estesa e minore alle estremità.



Nei casi (i) e (iv) i risultati delle misure associati alle loro incertezze forniscono l'evidenza che il valore misurato è ben al di sopra o al di sotto del limite, rispettivamente.

Tuttavia nel caso (ii), vi è un'alta probabilità che il valore del misurando sia al di sopra del limite, sebbene il limite sia all'interno dell'intervallo di incertezza estesa. A seconda delle circostanze, e in particolare in relazione ai rischi associati ad una decisione errata, la probabilità di una decisione non corretta può essere o meno sufficientemente piccola per poter giustificare una decisione di non-conformità. In modo simile, nel caso (iii), la probabilità che il valore del misurando sia al di sotto del limite può o non può essere sufficiente per poter prendere il risultato e giustificarne la conformità. Senza ulteriori informazioni, che si devono basare sui rischi associati col prendere una decisione errata, non sarà possibile utilizzare questi due risultati ai fini di una decisione circa la conformità.

Risulta evidente quindi come per questi casi la definizione di precise regole di decisione, stabilito il livello di accettabilità della probabilità di prendere una decisione errata, unitamente ai risultati ottenuti dalla misurazione, all'incertezza ad essi associata e al limite stabilito, consenta al laboratorio di dichiarare un campione non conforme (conforme) qualora sia superato (non superato) il limite di decisione, $CC\alpha$, del metodo.

Come abbiamo visto il $CC\alpha$ è una variabile che può essere influenzata da numerosi fattori, tra i quali il range di taratura, l'accuratezza del metodo, la presenza di interferenze dovute alla matrice, il tipo di estrazione, e riflette le performances del metodo quando applicato di routine ad uno specifico strumento.

Riguardo pertanto alla possibilità di trasferimento dei metodi di analisi tra i vari laboratori coinvolti nel controllo ufficiale, occorre precisare che la validazione è un processo sperimentale che permette di stimare l'incertezza di misura del metodo applicato in quello specifico laboratorio.

D'altra parte è previsto l'utilizzo di metodi non normalizzati, sviluppati e validati da laboratori di riferimento nazionali o comunitari accreditati, da parte di altri laboratori senza ulteriore validazione purché: tali metodi rientrino nel campo di accreditamento del laboratorio che li ha sviluppati; contengano i limiti di ripetibilità e riproducibilità (intermedia); siano messi a disposizione dal laboratorio di riferimento, nella versione in vigore, sul proprio sito web, corredati dalla dichiarazione di validazione; la dichiarazione di validazione del laboratorio di riferimento sia aggiornata (data di emissione non superiore a 3 anni); il laboratorio che li applica abbia verificato di rientrare nel limite di ripetibilità dichiarato.

Ai fini dell'interpretazione del risultato di un'analisi la decisione riporta (art. 6) che:

1. Il risultato di un'analisi è considerato non conforme se viene superato il limite di decisione del metodo di conferma per quell'analita.
2. Se per una sostanza è stato stabilito un limite consentito il limite di decisione è la concentrazione oltre la quale è possibile stabilire con una certezza statistica $1-\alpha$ che il limite consentito è stato effettivamente superato.
3. Se per una sostanza non è stato stabilito un limite consentito, il limite di decisione è il livello di concentrazione più basso al quale un metodo è in grado di stabilire con una certezza statistica di $(1-\alpha)$ che quel particolare analita è effettivamente presente.
4. Per le sostanze elencate nel gruppo A dell'Allegato I alla direttiva 96/23/CE, l'errore α è pari o inferiore all'1%. Per tutte le altre sostanze l'errore α è pari o inferiore al 5%.

Tale approccio ha suscitato non pochi dibattiti, difatti la Decisione suggerisce giustamente di valutare entrambi gli errori falso positivo (errore α) e falso negativo (errore β), tuttavia ai fini della conformità/non conformità del risultato di un'analisi prende in considerazione solamente l'errore falso positivo. Prendiamo ad esempio il caso di sostanze per le quali non sia stato stabilito un limite consentito, quando il risultato dell'analisi supera il valore del $CC\alpha$ esso dovrebbe essere considerato non conforme, in caso contrario il risultato è considerato conforme. Se il risultato ottenuto ugualia il $CC\alpha$, esso è considerato conforme in base all'articolo 6, tuttavia esiste il 50% di probabilità che il campione contenga l'analita al valore del $CC\alpha$, essendo l'errore falso negativo al $CC\alpha$ pari al 50%.



Bibliografia

1. Antignac JP, Le Bizet B., Monteau F., Andre F. (2003) *Anal Chim Acta* 483: 325-334.
2. Circolare 10 dicembre 2009 - Abrogazione dei tenori massimi di ocratossina A nel cacao e nei prodotti a base di cacao. Allineamento con l'Unione Europea.
3. COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES RESIDUES (CRLs) - Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer) 20/1/2010.
4. Decisione della Commissione Europea 675/2002/CE che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati.
5. DLgs del 2 febbraio 2001, n.31, Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano.
6. DLgs del 2 febbraio 2002 n.27, Modifiche ed integrazioni al DLgs 2 febbraio 2001, n.31. recante attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano.
7. EA-4/16 EA Guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing.
8. EURACHEM/CITAC Use of uncertainty information in compliance assessment - First Edition 2007.
9. GUIDANCE DOCUMENT on official controls, under Regulation (EC) No.882/2004, concerning microbiological sampling and testing of foodstuffs.
10. ILAC-G8:03/2009 Guidelines on Reporting of compliance with specification.
11. ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions.
12. ISO 5725-2 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
13. ISO 5725-3 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.
14. ISO 5725-4 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method.
15. ISO 5725-5 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method.
16. ISO 5725-6 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values.
17. JCGM 200:2008 International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM).
18. Legge del 7 luglio 2009 n.88 Disposizioni per l'adempimento di obblighi derivanti dall'appartenenza dell'Italia alle Comunità europee - Legge comunitaria 2008. Supplemento ordinario n. 110/L alla GAZZETTA UFFICIALE Serie generale - n. 161 del 14 luglio 2009.
19. Method EPA 1613 Rev B - Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS.

20. Reg. (CE) n.1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007 che modifica il Reg. (CE) 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium-tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco.
21. Reg. (CE) n.178/2010 della Commissione del 2 marzo 2010 che modifica il regolamento (CE) n.401/2006 per quanto concerne le arachidi, gli altri semi oleosi, la frutta a guscio, le mandorle di albicocche, la liquirizia e l'olio vegetale.
22. Reg. (CE) n.1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari e s.m.i.
23. Reg. (CE) n.1882/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che stabilisce metodi di campionamento ed analisi per il controllo ufficiale del tenore di nitrati in alcuni prodotti alimentari.
24. Reg. (CE) n.333/2007 della Commissione del 28 marzo 2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari.
25. Reg. (CE) n.401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento ed analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari.
26. Reg. (CE) n.629/2008 della Commissione del 2 luglio 2008 che modifica il Reg. (CE) n.1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.
27. Reg. (CE) n.765/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 9 luglio 2008 Norme in materia di accreditamento e vigilanza del mercato per quanto riguarda la commercializzazione dei prodotti.
28. Reg. (CE) n.882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali e s.m.i.
29. Reg. (UE) 105/2010 della Commissione del 5 febbraio 2010 recante modifica del regolamento (CE) n.1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, per quanto concerne l'ocratossina A.
30. Reg. (UE) n.165/2010 della Commissione del 26 febbraio 2010 recante modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.
31. Reg. (UE) n.420/2010 della Commissione del 29 aprile 2011 che modifica il regolamento (CE) n.1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.
32. Reg. (UE) N.836/2011 della Commissione del 19 agosto 2011 che modifica il regolamento (CE) n. 333/2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari.
33. Regolamento tecnico ACCREDIA RT-08 Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori di prova.
34. SANCO/2004/2762 rev1 Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC.
35. SANCO/12571/2013 Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
36. UNI CEI EN ISO/IEC 17011:2005 Valutazione della conformità. Requisiti generali per gli organismi di accreditamento che accreditano organismi di valutazione della conformità.
37. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura.
38. UNI CEI ENV 13005:2000 Guida all'espressione dell'incertezza di misura (GUM).
39. UNI EN 13804:2002 - Prodotti alimentari - Determinazione di elementi in tracce - Criteri di prestazione, considerazioni generali e preparazione del campione.
40. UNI EN 13805:2002 - Prodotti alimentari - Determinazione di elementi in tracce - Digestione sotto pressione.
41. UNI EN 13806:2003 - Prodotti alimentari - Determinazione di elementi in tracce - Determinazione di mercurio mediante spettrometria ad assorbimento atomico con vapore-a freddo dopo digestione sotto pressione.



**Via Guglielmo Saliceto, 7/9
00161 Roma - Italy**

**Tel. +39 06 844099.1
Fax. +39 06 8841199**

**info@accredia.it
www.accredia.it
twitter.com/accredia**