

Analisi, i metodi microbiologici ISO alternativi

Un'opportunità per migliorare l'efficienza dei laboratori

di Davide Giovanardi

Vicepresidente Comitato Laboratori di Prova e Taratura Aicq

I laboratori microbiologici di prova che operano nell'ambito dell'autocontrollo hanno a disposizione metodi di analisi ISO alternativi, che spesso presentano vantaggi rispetto a quelli tradizionali

Da almeno quindici anni, i laboratori di microbiologia italiani ed europei hanno la possibilità di scegliere, nell'ambito legislativo dell'autocontrollo alimentare per l'analisi di alimenti e acque, tra metodi ISO normalizzati e alternativi. Accredia, nel documento RT-08, classifica quest'ultimi come metodi non normalizzati, in quanto la responsabilità dei dati forniti è riferita non all'organizzazione emittente (ad esempio, l'ISO), ma ai singoli proprietari (ad esempio, le aziende produttrici di terreni e supplementi per la microbiologia).

L'utilizzo dei metodi alternativi è permesso, in seconda battuta, dal regolamento (CE) 2073/2005 sui controlli microbiologici, all'articolo 5, nel caso in cui questi siano validati rispetto al metodo di

riferimento normalizzato ISO, utilizzando un metodo proprietario certificato da una terza parte, in conformità al protocollo stabilito nelle norme EN ISO 16140 o in altri protocolli simili accettati a livello internazionale. Al fine di validare un metodo alternativo rispetto a quello di riferimento, gli organismi di certificazione dei metodi di prova come NF Validation, NordVal International e MicroVal utilizzano la norma EN ISO 16140-2: "Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method", secondo cui un metodo alternativo (metodo sottoposto a validazione) è "un metodo di analisi che ricerca o quantifica per una data categoria di prodotti lo stesso analita, come è ricercato o quantificato utilizzando il metodo di riferimento" e il cui "termine alternativo deve essere ben descritto e caratterizzato per riferirsi all'intera procedura di prova e sistema di reazione". Per l'accreditamento dei metodi alternativi da parte dei laboratori, ACCREDIA richiede di verificare di rientrare nei valori dei parametri prestazionali della validazione. Quest'ultima non è necessaria come per i metodi interni sviluppati dal laboratorio. Come terza opportunità, in accordo al regolamento (CE) 2073/2005, possono essere anche applicati metodi normalizzati non ISO, come quelli dell'ente NMKL (Nordic Committee of Food Analysis) oppure metodi non normalizzati validati in uno studio interlaboratorio secondo



protocolli accettati a livello internazionale e se autorizzati dall'autorità competente italiana. Nel 2010, e per due anni, chi scrive aveva accreditato e utilizzato NMKL 71, 1999, 5th Ed.: *Salmonella. Detection in foods*, molto meno indaginoso di UNI EN/ISO 6579-1:2020. Attenzione però a scegliere metodi NMKL: sono stati redatti alcuni anni fa e possono mancare di dati prestazionali; per essere utilizzati in accordo al regolamento (CE) 2073/2005, inoltre, devono essere validati, come detto precedentemente, con studi interlaboratorio e non tutti questi metodi "nordici" lo sono stati.

L'importanza dei metodi alternativi

I metodi standardizzati, come quelli previsti dagli standard EN ISO, si basano su metodi di prova liberamente disponibili e quindi principalmente

su tecniche di coltura tradizionali che l'utente può preparare in laboratorio. Oggi, però, esistono molte tecniche e metodi (proprietary) che spesso presentano vantaggi rispetto a quelli tradizionali, come il tempo di ottenimento del risultato, l'elevata produttività e l'efficacia dei costi. La domanda che sorge spontanea è: come fa un utente ad avere la certezza che questi metodi alternativi funzionino, in pratica, altrettanto bene di quelli tradizionali? Per rispondere a questa domanda è stata sviluppata la serie EN/ISO 16140.

Inoltrarsi nella miriade dei metodi alternativi presenti, ad esempio, nei siti web NF Validation, Nordval e Microval, può indurre confusione, ma se abbiamo le idee chiare ci vengono richieste, nella scelta dei metodi di prova più a noi congeniali, solo curiosità e spirito critico.

Iniziando con NF Validation, collegandosi al sito¹, è possibile acquisire tutte le informazioni dei parametri microbiologici per gli alimenti, sup-

¹ Vedi l'indirizzo <https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/#discover-certified-methods>

porti di campionamento e provenienti dalla produzione primaria, per i quali sono certificati 140 metodi di prova. Le tecniche di prova di questi metodi spaziano da quella microbiologica classica alla reazione di catena della polimerasi (PCR), alla immunoenzimatica. Il documento NF Validation² presenta un'importante e riassuntiva tabella per poter consultare da sinistra verso destra tutti i metodi di prova: Certificato/Nome commerciale/Scopo del metodo/Ambito di validazione/Data di certificazione/Fine della validità, ad esempio: BIO 12/41-03/17/SALMA One Day/All human food products and feed products, pet food products, primary and industrial production environmental samples/23.03.2017/renewal: 03.02.2021- 09.01.2025. La fine della validità è il 23 marzo 2029. Tutti i metodi di prova presenti nella tabella non sono scaduti al momento della pubblicazione della lista (l'ultima

è datata 3 febbraio 2025). Infatti, ognuno è sottoposto da NF Validation a nuova certificazione ogni quattro anni per poter rimanere in tale elenco e quindi essere utilizzato dai laboratori. Una volta individuato il metodo di prova che può interessare, è necessario verificarne le caratteristiche tecnico-operative e le matrici per le quali secondo ISO 16140:2 è stato validato. Ed è proprio in questo momento che è indispensabile consultare con attenzione il documento completo "Summarized study report" specifico per ogni metodo di prova presente³.

Per la matrice acqua è necessario eseguire lo stesso procedimento dalla consultazione della lista dei metodi di prova validati per gli altri alimenti⁴. Anche per questa matrice è importante valutare la tecnica analitica ed essere a conoscenza che nessun metodo di prova è validato secondo ISO 16140-2, in quanto non applicabile,

² Il documento è scaricabile all'indirizzo <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2025/02/List-valid-2025-02-03.pdf>

³ La consultazione è disponibile all'indirizzo <https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/#discover-certified-methods>

⁴ La consultazione è effettuabile all'indirizzo https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2024/02/List-valid-2024-02-22_EAU.pdf





ma in base a protocolli diversi implementati dalle stesse aziende produttrici dei metodi stessi.

Il secondo ente di validazione è NordVal International, che propone 28 metodi microbiologici e quattro chimici⁵. Le stesse regole di ricerca per i metodi validati NF Validation valgono per quelli di NordVal International, la cui proposta offerta ai laboratori è comunque molto ridotta. Ben di altro spessore rispetto a NordVal è MicroVal, che pubblicizza alla pagina <https://microval.org/> i suoi metodi di prova alternativi: sono più di 70, validati ISO 16140-2 e possono essere utilizzati secondo quanto richiesto dal regolamento (CE) 2073/2005. L'obiettivo del progetto Eureka "MicroVal" nel 1994 era nato per stabilire un meccanismo europeo per la validazione e l'approvazione di metodi alternativi per l'analisi microbiologica di alimenti e bevande, in particolare quelli riguardanti il rilevamento, la quantificazione e/o l'identificazione di microrganismi deteriorati e/o patogeni. In una prospettiva più ampia, il progetto MicroVal tocca quindi aspetti sia di

garanzia della qualità sia di salute nazionale, correlati alla produzione e al consumo di alimenti. Quindi, sebbene poco conosciuto rispetto a NF Validation, questo organismo di certificazione è di massima importanza e i suoi metodi di prova alternativi validati possono far fare la differenza.

Dal 2019, i metodi MicroVal sono tutti illustrati molto bene all'interno degli "Study Report" specifici, non arrivando però alle precise descrizioni, con tanto di diagramma di flusso, offerte dai metodi di NF Validation. Nel sito MicroVal⁶, i metodi sono catalogati come: Analita/Numero di certificato/Denominazione del test Kit/Fornitore/data di scadenza e stato di validazione. Tra i metodi di prova alcuni propongono una conta batterica mesofila a 48 ore di incubazione, conta di Stafilococchi coagulasi positivi a 24 ore e conta di *Campylobacter* spp. senza l'indagine fase di conferma delle colonie, come da ISO/EN 10272-2. Altra peculiarità di MicroVal è che, rispetto a NF Validation e NordVal, propone metodi

⁵ Vedi l'indirizzo www.nmkl.org/nordval-international/issued-certificates/list-of-nordval-certificates/
⁶ Vedi l'indirizzo <https://microval.org/en/issued-certificates/>



di prova alternativi validati nei confronti di ISO/EN 16140-6, come per la sierotipizzazione di *Salmonella* spp. per 59 sierotipi e con apparecchiatura MALDI, piuttosto costosa, per *Cronobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. e *Salmonella* spp.

Come stanno operando i laboratori italiani accreditati

È doveroso specificare che dal sito di Accredia si evince che numerosi laboratori hanno accreditato metodi alternativi validati da NF Validation mentre sono assenti quelli di NordVal, MicroVal e NMKL relativamente alla loro applicazione al regolamento europeo (CE) 2073/2005. Molto probabilmente l'organismo certificatore francese è attualmente il leader mondiale tra i tre come nomea e credibilità, ma MicroVal è in ottima seconda posizione, avendo migliorato notevolmente i propri documenti di validazione, standardizzandoli e rendendoli molto chiari anche per noi laboratoristi, consulenti e manager della Qualità.

49

