

La rete dei laboratori comunitari e nazionali di riferimento per i residui

Sergio CAROLI

Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - L'Unione Europea ha istituito all'inizio degli anni '90 il sistema dei laboratori comunitari di riferimento (LCR) per i residui negli animali vivi e nei loro prodotti. Questa materia è attualmente disciplinata dalla Direttiva del Consiglio 96/23/CE del 26 aprile 1996, recepita nell'ordinamento nazionale con il DL.vo n. 336 del 4 agosto 1999. I quattro LCR, rispettivamente assegnati a Germania, Francia, Italia e Olanda, condividono lo stesso mandato generale attribuito loro dalla Direttiva suddetta, anche se per diverse categorie di residui. Essi forniscono supporto tecnico alla Commissione Europea in questa materia, nonché a favore dei laboratori nazionali di riferimento (LNR) per i residui negli stati membri, che a loro volta hanno il compito di garantire assistenza a tutti gli altri laboratori per i residui operanti all'interno del loro territorio nazionale. In considerazione del fatto che l'insieme dei quattro LCR ha responsabilità anche per quanto riguarda l'adozione di sistemi di qualità da parte degli LNR, la rielaborazione dei principi di buona pratica di laboratorio recentemente completata da parte dell'OECD pone l'esigenza di realizzare un meccanismo di informazione ed assistenza verso questi ultimi che permetta loro di adeguarsi a tali criteri.

Parole chiave: residui, alimenti di origine animale, laboratori comunitari di riferimento per i residui, laboratori nazionali di riferimento per i residui, validazione dei metodi.

Summary (*The network of the Community reference laboratories and national reference laboratories for residues*). - The European Union established in the early 1990's a network of Community reference laboratories (CRL) for residues in living animals and their products. This field is regulated at present by the Council Directive 96/23/CE of 26 April 1996, adopted at the national level through the Decree DL.vo no. 336 of 4 August 1999. The four CRL are based in France, Germany, Italy and The Netherlands, respectively, each of them being responsible for different categories of residues. The CRL provides technical support to the European Commission in this matter as well as to the National reference laboratories (NRL) for residues in the member states. The four CRL bear responsibility also as regards the adoption of quality systems by NRL. In this respect, the revised principles of good laboratory practice recently issued by OECD demand that procedures be developed to inform and assist the NRL to implement them.

Key words: residues, food of animal origin, Community reference laboratories for residues, national reference laboratories for residues, validation of methods.

Introduzione

La necessità di armonizzare in ambito comunitario le modalità di conduzione della determinazione di tracce di sostanze illecite e di contaminanti ambientali in prodotti di origine animale ha indotto l'Unione Europea (UE) ad istituire all'inizio degli anni '90 il sistema dei laboratori comunitari di riferimento (LCR) per i residui. Questa materia, in precedenza regolamentata in base alla Direttiva CEE 86/469 del 16 settembre 1986, alla Decisione del Consiglio della CEE 91/664 dell'11 dicembre 1991 ed alla Decisione del Consiglio della CEE 93/458 del 26 luglio 1993, è attualmente disciplinata

dalla Direttiva del Consiglio 96/23/CE del 26 aprile 1996, recepita nell'ordinamento nazionale con il DL.vo del 4 agosto 1999, n. 336 [1, 2]. I quattro LCR per i residui, rispettivamente assegnati a Germania, Francia, Italia ed Olanda, condividono lo stesso mandato generale attribuito loro dalla Direttiva suddetta, pur essendo ciascuno direttamente responsabile per diverse categorie di residui. Per l'Italia, questo compito è stato affidato all'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Le categorie di residui di spettanza dell'ISS in quest'ambito sono tutti gli elementi chimici, i carbammati, i piretroidi, i composti organofosforati e le sostanze organoclorurate (compresi i policlorobifenili, le

policlorodibenzo-*p*-diossine ed i policlorodibenzofurani). L'elenco di tutti i residui di spettanza dei quattro LCR, nonché quello delle relative matrici alimentari nei quali questi vanno determinati, sono riportati nella Tab. 1. Gli altri tre LCR, per ulteriori gruppi di residui, sono il

Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven (Olanda); l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Fougères (Francia) ed il Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV),

Tabella 1. - Residui e matrici alimentari di origine animale di pertinenza dei quattro laboratori comunitari di riferimento, come prescritto dagli Allegati I e II della Direttiva del Consiglio 96/23/CE. In parentesi, nella prima colonna, viene indicato il laboratorio responsabile per lo specifico gruppo di residui

Tipo di residuo	Animali della specie bovina, ovina, caprina, suina ed equina	Volatili da cortile	Animali d'acquacoltura	Latte	Uova	Carni di coniglio e di selvaggina (selvatica e d'allevamento *)	Miele
Categoria A – Sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate							
Stilbeni (a)	x	x	x			x	
Antitiroidei (a)	x	x				x	
Steroidi (a)	x	x	x			x	
Lattoni dell'acido resorcilico (a)	x	x				x	
β-agonisti (c)	x	x				x	
Sostanze incluse nell'allegato IV del regolamento CEE n. 2377/90 del Consiglio del 26/06/1990 (**)	x	x	x	x	x	x	
Categoria B – Farmaci veterinari e agenti contaminanti							
Sostanze antibatteriche (b)	x	x	x	x	x	x	x
Antelmintici (c)	x	x	x	x		x	
Coccidiostatici (c)	x	x			x	x	
Carbammati e piretroidi (d)	x	x				x	x
Tranquillanti (a)	x						
Antinfiammatori non steroidei (AINS) (c)	x	x		x		x	
Altre sostanze esercitanti un'attività farmacologica (**)							
Composti organoclorurati (***) (d)	x	x	x	x	x	x	x
Composti organofosforati (d)	x			x			x
Elementi chimici (d)	x	x	x	x		x	x
Micotossine (a)	x	x	x	x		x	x
Coloranti (b)			x				
Altri (**)							

(*) La selvaggina selvatica va considerata solo per quanto concerne gli elementi chimici; (**) le sostanze di queste categorie sono attribuite ai laboratori comunitari di riferimento designati a seconda della loro azione farmacologica; (***) includono PCB (policlorobifenili), PCDD (policlorodibenzo-*p*-diossine) e PCDF (policlorodibenzofurani).

(a) Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieu; (b) Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments; (c) Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin; (d) Istituto Superiore di Sanità. x: determinazione da effettuare.

Berlino (Germania). Le attività previste quale supporto tecnico alla Commissione Europea (CE) in questa materia, nonché quelle a favore dei laboratori nazionali di riferimento (LNR) per i residui designati negli stati membri, includono:

a) la promozione ed il coordinamento della ricerca di nuovi metodi di analisi ed informazione agli LNR circa i progressi compiuti nel settore dei metodi e dei materiali di analisi;

b) l'assistenza agli LNR per i residui al fine di porre in essere un sistema adeguato di garanzia della qualità basato sui Principi di buona pratica di laboratorio (BPL) e sui criteri EN 45000;

c) l'approvazione dei metodi convalidati come metodi di riferimento da inserire in una apposita raccolta;

d) lo sviluppo per gli LNR di metodi analitici di routine riconosciuti durante la procedura di fissazione di limiti massimi per residui;

e) la fornitura agli LNR dei dettagli dei metodi analitici e delle prove comparative da effettuare e la comunicazione dei risultati di queste ultime;

f) l'elaborazione, per i laboratori nazionali che ne fanno richiesta, di un parere tecnico sulle analisi di spettanza di ciascun LCR;

g) l'organizzazione di prove comparative a beneficio degli LNR, con una frequenza delle prove stesse determinata d'intesa con la CE. Ai fini di tali prove, gli LCR devono distribuire agli LNR campioni privi di analiti (i cosiddetti bianchi) e campioni contenenti quantità note della sostanza da analizzare;

h) l'identificazione e la quantificazione di residui nel caso in cui un risultato d'analisi dia luogo a contestazione tra due stati membri o tra UE ed un paese terzo;

i) l'organizzazione di corsi di formazione e perfezionamento per gli esperti degli LNR;

l) l'assistenza tecnica e scientifica alla CE, ivi incluso il "Programma delle norme, misure e prove";

m) la compilazione e l'invio alla CE di una relazione annuale sulle attività;

n) la collaborazione nel settore dei metodi e dei materiali d'analisi con gli LNR designati dai paesi terzi nel quadro dei piani di sorveglianza che devono essere presentati conformemente all'articolo 11 della Direttiva. Le sezioni che seguono offrono un quadro dettagliato dello stato di realizzazione di tali compiti e dei problemi che essi oggi pongono.

Il sistema LCR-LNR

Ai sensi dell'art. 14 della Direttiva del Consiglio 96/23/CE, ogni stato membro designa almeno un LNR. Per ciascun residuo o gruppo di residui è comunque consentito designare un solo LNR. Gli LNR, il cui elenco aggiornato al 31 dicembre 2001 è riportato nella Tab. 2, svolgono i seguenti compiti:

a) coordinano le attività dei laboratori nazionali normalmente incaricati della determinazione di residui e, in particolare, le norme e i metodi d'analisi per ciascun residuo o gruppo di residui loro assegnati;

b) assistono l'autorità competente nell'organizzazione del piano di sorveglianza dei residui;

c) organizzano periodicamente prove comparative per ciascun residuo o gruppo di residui per i quali essi sono stati designati;

d) garantiscono l'osservanza, da parte dei laboratori nazionali, dei limiti fissati;

e) garantiscono la diffusione delle informazioni fornite dagli LCR.

Per poter svolgere i compiti assegnati, gli LCR devono soddisfare i seguenti requisiti di minima:

- essere stati in precedenza designati come LNR in uno Stato membro;

- disporre di personale qualificato che possieda una conoscenza sufficiente delle tecniche applicate alla determinazione dei residui per i quali essi sono stati designati come LCR;

- disporre delle attrezzature e delle sostanze necessarie per effettuare le analisi di cui sono incaricati;

- disporre di un'adeguata infrastruttura amministrativa;

- disporre di conoscenze informatiche sufficienti per eseguire il trattamento statistico dei risultati ed essere in grado di comunicare rapidamente tali dati e altre informazioni agli LNR e alla CE;

- garantire l'osservanza, da parte del proprio personale, del carattere riservato di taluni argomenti, risultati o comunicazioni;

- possedere una sufficiente conoscenza delle norme e delle prassi internazionali;

- predisporre un elenco aggiornato dei materiali di riferimento certificati e dei materiali di riferimento disponibili presso l'Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre (CE), nonché un elenco aggiornato dei fabbricanti e rivenditori di tali materiali.

La qualità delle analisi

In considerazione del fatto che l'insieme dei quattro CRL ha responsabilità anche per quanto riguarda l'adozione di sistemi di qualità da parte degli LNR, la rielaborazione dei principi di BPL recentemente completata da parte dell'OECD pone l'esigenza di attuare un opportuno meccanismo di informazione ed assistenza verso questi ultimi che permetta loro di adeguarsi come e quanto possibile compatibilmente con le funzioni espletate. È opportuno, a questo proposito, ricordare che nella società globale attuale la confrontabilità dei dati sperimentali è indispensabile per evitare di ripetere misure che richiedono comunque

Tabella 2. - Elenco dei laboratori nazionali di riferimento per i residui (aggiornato al 31 dicembre 2001). Tra parentesi sono indicati i gruppi di residui di cui ciascun laboratorio è responsabile

Stato membro	Laboratorio nazionale di riferimento
Austria	<ul style="list-style-type: none"> · Bundesanstalt für veterinärmedizinische Untersuchungen, Mödling (clorpromazina, dimetridazolo, furazolidone, metronidazolo, nitrofurano, ronidazolo, penicillina, amminoglicosidi e macrolidi) · Bundesanstalt für Lebensmitteluntersuchung und Forschung (BALuF), Wien (cloramfenicolo, dapsona, sulfonammidi e chinoloni, compreso nitroimidazolo, tranne policlorodibenzo-<i>p</i>-diossine) · Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf (policlorodibenzo-<i>p</i>-diossine)
Belgium	<ul style="list-style-type: none"> · Institut Scientifique de la Santé Publique Louis Pasteur, Bruxelles (tutti)
Denmark	<ul style="list-style-type: none"> · Fødevaredirektoratet, Institut for Fødevareundersøgelser og Ernæring, Søborg (tutti)
Finland	<ul style="list-style-type: none"> · Eläinlääkintä ja Elintarviketutkimuslaitos (EELA), Helsinki (tutti)
France	<ul style="list-style-type: none"> · Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes (policlorodibenzo-<i>p</i>-diossine) · AFSSA, Site de Fougères, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Médicaments Vétérinaires et les Désinfectants, Javene (tutti) · Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur l'Hygiène et la Qualité des Aliments (LERHQA), Paris (tutti) · AFSSA, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur les Petits Ruminants et les Abeilles Les Templiers, Sophia-Antipolis (tutti i gruppi per il miele)
Germany	<ul style="list-style-type: none"> · Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin (tutti)
Greece	<ul style="list-style-type: none"> · Veterinary Diagnostic Laboratory Serres, Serres (tutti esclusi i policlorobifenili) · Institute of Food Hygiene, Athens (tutti) · Institute of Food Hygiene, Thessaloniki (nitrofurani) · Veterinary Diagnostic Laboratory, Tripolis (cloramfenicolo) · Veterinary Diagnostic Laboratory, Larissa (antelmintici e coccidiostatici, compresi i nitroimidazoli) · Veterinary Diagnostic Laboratory, Patras (carbammati, piretroidi e antinfiammatori non steroidei)
Ireland	<ul style="list-style-type: none"> · State Laboratory, Castleknock, Dublin (stilbeni, steroidi, coccidiostatici compresi i nitroimidazoli, antinfiammatori non steroidei, composti organoclorurati, micotossine) · Central Meat Control Laboratory, Castleknock, Dublin (agenti antitiroidei, β-agonisti tranne i nitrofurani, sostanze antibatteriche, tranquillanti, elementi chimici) · National Food Centre, Castleknock, Dublin (nitrofurani, antelmintici, carbammati e piretroidi) · Marine Institute, Castleknock, Dublin (emamectina, teflubenzuron e diflubenzuron)
Italy	<ul style="list-style-type: none"> · Istituto Superiore di Sanità, Roma (tutti)
Luxembourg	<ul style="list-style-type: none"> · Institut Scientifique de la Santé Publique Louis Pasteur, Bruxelles (tutti)
Portugal	<ul style="list-style-type: none"> · Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, Lisboa (tutti) · Instituto de Investigação das Pescas e do Mar-IPIMAR, Lisboa (elementi chimici solo in acquacoltura)
Spain (*)	<ul style="list-style-type: none"> · Centro Nacional de Alimentación del Ministerio de Sanidad y Consumo, Majadahonda, Madrid (stilbeni, steroidi, lattoni dell'acido resorcilico, β-agonisti, sostanze antibatteriche, corticosteroidi, elementi chimici solo in acquacoltura, micotossine, coloranti) · Laboratorio de Sanidad y Producción Animal, Santa Fe, Granada (antelmintici, coccidiostatici, carbammati e piretroidi, antinfiammatori non steroidei, tranne corticosteroidi, agenti antitiroidei, tranquillanti) · Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Madrid (agenti antitiroidei e tranquillanti) · Laboratorio Arbitral Agroalimentario del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid (policlorobifenili, composti organofosforati ed elementi chimici tranne che in acquacoltura)
Sweden	<ul style="list-style-type: none"> · Statens Livsmedelsverk, Uppsala (tutti)
The Netherlands	<ul style="list-style-type: none"> · Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven (tutti) · Rijkswaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten, Wageningen (tutti)
United Kingdom	<ul style="list-style-type: none"> · Veterinary Science Division, Belfast (cloramfenicolo e nitrofurani) · Central Science Laboratory, York (β-agonisti e dimetridazolo) · Food Science Division, Belfast (composti organoclorurati, composti organofosforati, elementi chimici e micotossine) · Laboratory of the Government Chemist, Teddington Middlesex (coloranti)

(*) I laboratori elencati rispondono inoltre delle sostanze incluse nell'allegato IV del regolamento CEE n. 2377/90 del Consiglio del 26/6/1990 e altre sostanze a seconda della loro azione farmacologica.

tempo e denaro. Non è fuori luogo, inoltre, definire più precisamente quale sia il significato dei termini *validità* e *qualità* quando riferiti in modo specifico alla determinazione di residui. Il primo di essi va considerato come la caratteristica di una informazione sperimentale, relativa a risultati comprovanti violazione dei limiti di legge, di essere adeguatamente difesa da ogni contestazione che miri ad evidenziarne lacune e contraddizioni. Nel secondo caso si privilegia la valutazione del grado di corrispondenza del risultato alle richieste formulate da un committente o comunque preliminarmente specificate per il raggiungimento di un determinato obiettivo.

La necessità del riconoscimento reciproco (e quindi della capacità di confrontare risultati in modo diretto e trasparente) si traduce nella importanza della rintracciabilità della informazione sperimentale stessa, oggi centrale a qualunque sistema di qualità. Risultati confrontabili si possono infatti ottenere solo se questi vengono riferiti ad un'origine comune e, preferibilmente, accettata internazionalmente. I firmatari della cosiddetta *Meter convention*, la cui prima ragion d'essere è di fatto la rintracciabilità, hanno saputo chiaramente cogliere i vantaggi generali inerenti all'ottenimento ed alla circolazione di dati rintracciabili [3]. La rintracciabilità è la proprietà del risultato di una misura od il valore di uno standard tramite cui esso può essere ricondotto a riferimenti formali ed a norme standard nazionali od internazionali attraverso una catena ininterrotta di confronti tutti aventi incertezze note. Diviene pertanto l'obiettivo principale poter ottenere al meglio tale rintracciabilità per le misure quantitative. Da questo punto di vista, sono due gli elementi che devono necessariamente essere presenti affinché si possano generare dati rintracciabili, e cioè: a) idonei riferimenti formali, riconosciuti internazionalmente; b) una valutazione della incertezza delle misure fatta sulla base dei criteri cosiddetti GUM, dove l'acronimo sta per (*guide to the uncertainty of measurements*) [4]. Essi concorrono ad accertare l'idoneità di un risultato allo scopo prefissato. Ancora a monte di questo, c'è ovviamente la domanda se un certo tipo di misura sia effettivamente adatto allo scopo. Ciò costituisce d'altra parte argomento di giudizio professionale circa l'idoneità del metodo utilizzato.

Sebbene in modo diverso, la rintracciabilità è di grande valore tanto per il laboratorio che per la committenza. Ciò si può ricondurre al fatto che l'accuratezza di un valore può essere dichiarata solo nei limiti indicati dalla sua incertezza. In questo modo si evita di utilizzare il dato al di là di quanto esso possa consentire e se ne indicano chiaramente i limiti di validità. Quando l'incertezza è stimata in base ai criteri GUM, essa assume la forma di un intervallo attorno al risultato della misura. Ne consegue l'immediata possibilità di decidere sulle seguenti opzioni: a) vicinanza del limite superiore o del

limite inferiore della incertezza ad un limite stabilito o legale, o superamento del limite stesso; b) sovrapposizione tra le incertezze di misure simili sullo stesso campione o su campioni simili; c) sovrapposizione degli intervalli di incertezza di misura sullo stesso campione provenienti da due laboratori diversi. Nella maggior parte dei casi è meno importante avere un'incertezza particolarmente bassa che avere una buona stima dell'incertezza per poter fornire risposte adeguate a tali quesiti ed a quesiti analoghi. Questi ed altri aspetti sono rilevanti nella autovalutazione di un laboratorio e nella creazione di un clima di fiducia reciproco con la committenza.

Un laboratorio si trova in genere alla fine della catena di rintracciabilità. Perciò, per produrre risultati rintracciabili esso deve essere in grado di fare affidamento su tutti i riferimenti necessari nel processo di misura, nonché sulla validazione dei metodi. Un prerequisito per fornire alla committenza risultati rintracciabili è, pertanto, che i valori di tutti i riferimenti siano essi stessi riconducibili a riferimenti dichiarati e siano accompagnati da una attendibile formulazione della incertezza. La competenza tecnica del laboratorio, eventualmente confermata da un accreditamento o da un riconoscimento di conformità, deve quindi garantire l'uso e la manipolazione appropriati di tali riferimenti e dei campioni, come del resto l'esperienza e l'addestramento consentono. È certamente utile che vi sia esperienza nello sviluppo e nell'applicazione delle procedure analitiche coerentemente con quanto richiesto per la procedura obbligatoria di validazione.

La determinazione della quantità di una sostanza comporta spesso l'accertamento di proprietà diverse, come per esempio la massa di un campione tramite una bilancia per mezzo di una massa di riferimento, l'identità di un analita per confronto con un riferimento, come avviene quando si fa ricorso ad uno spettrometro e ad una base di dati di composti noti, e la quantificazione di un analita per confronto con un'altra sostanza, come un materiale di riferimento. Ciascuna proprietà deve essere rintracciabile e contribuire all'incertezza totale del risultato ottenuto. Perciò, le dichiarazioni circa la rintracciabilità di un risultato non devono basarsi solo sulla descrizione dei riferimenti e dell'incertezza complessiva, ma anche sulla descrizione di cosa rientri nella rintracciabilità.

I laboratori devono pertanto considerare attentamente il processo di misura condotto. Ciò comporta un iter completo di validazione che conduca a dati attendibili, compreso un trattamento realistico in termini statistici dell'incertezza della misura che tenga il debito conto dell'incertezza dei riferimenti relativi. Se la validazione è condotta con la necessaria attenzione alla rintracciabilità, essa potrà fornire informazioni sufficienti per la successiva stima dell'incertezza di misura. In questo modo, viene a realizzarsi una catena di rintracciabilità come parte essenziale della validazione.

Un contributo primario alla rintracciabilità esterna al laboratorio è dato dalla possibilità di ricondurre i valori sperimentali a specifici riferimenti, in special modo a materiali di riferimento certificati. Dal momento che questi valori sono a loro volta ottenuti per mezzo di misure, le stesse garanzie richieste ai laboratori valgono anche per i produttori di materiali di riferimento. Informazioni ulteriori sulla stabilità ed omogeneità dei materiali di riferimento, tramite ad esempio la data di scadenza, sono essenziali. I produttori di materiali di riferimento devono essere consapevoli che i valori che essi forniscono sono un anello indispensabile nella catena della rintracciabilità. Da parte loro vanno quindi messe a punto tutte le procedure necessarie per comprovare, esternamente ed internamente, che in ogni caso siano state rispettate tutte le condizioni indispensabili per ottenere risultati rintracciabili, come ad esempio tramite il ricorso a circuiti di confronto interlaboratoriale ed alla verifica da parte di altri esperti del settore.

La materia suesposta è parte integrante dei sistemi di qualità internazionalmente riconosciuti, come quelli descritti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 o dai principi di buona pratica di laboratorio (BPL) dell'OECD [5, 6]. In particolare, i concetti di fondo che ispirano il sistema di qualità totale intrinseco ai principi di BPL, infatti, sono oggi efficacemente applicabili a molti altri settori di sperimentazione e controllo, anche se originariamente essi erano stati concepiti in modo particolare per studi tossicologici ed ecotossicologici. Va comunque doverosamente sottolineato che, da un punto di vista pratico, i principi dell'accreditamento e della certificazione di conformità sono non solo largamente sovrapponibili, ma anche utilmente integrabili gli uni con gli altri.

La validazione dei metodi

Nell'ambito di quanto suesposto, assume un rilievo di primaria importanza l'ormai imminente adozione della Decisione della Commissione, provvisoriamente denominata SANCO/1805/2000, intesa a prescrivere quali criteri debbano presiedere all'impiego di metodi analitici di riferimento e di uso frequente per l'analisi di campioni ufficiali in accordo a quanto richiesto dalla Direttiva 96/23/CE. Tali criteri codificano in dettaglio come procedere per l'identificazione e la quantificazione di tracce di elementi chimici e di residui di sostanze e contaminanti organici, quali caratteristiche debbano essere possedute dai metodi di riferimento perché questi possano essere considerati tali ed in che modo si possa effettuare la validazione dei metodi stessi. Per convenzione, si intende per validazione il processo in base al quale un metodo analitico viene sottoposto ad uno studio multilaboratoriale per accertarne le prestazioni in termini di accuratezza, precisione,

riproducibilità, limiti di rivelabilità, specificità e robustezza, essendo quest'ultima caratteristica la capacità del metodo di adattarsi a diverse tipologie di campioni e a variazioni delle condizioni di lavoro senza provocare significative alterazioni delle altre caratteristiche. Il processo di validazione comporta il raggiungimento di un equilibrio ottimale tra costi, possibilità di errore e capacità tecniche e deve condurre alla dimostrazione della idoneità di un dato metodo allo scopo per il quale esso è stato sviluppato. L'impostazione sulla quale oggi converge l'opinione della comunità scientifica fa un significativo passo in più in questa direzione, prefiggendosi di privilegiare l'adozione e la dimostrabilità del sistema di qualità impiegato da un laboratorio rispetto alla pedissequa esecuzione di metodi descritti dettagliatamente, ma comunque sempre suscettibili di essere erroneamente applicati. La definitiva approvazione di questo provvedimento, che sostituirà le Decisioni della Commissione 90/515 del 18 ottobre 1990 e 93/256/CE e 93/257/CE del 14 maggio 1993, non potrà che contribuire significativamente al progressivo sviluppo di sistemi di qualità nella rete degli LCR-LRN che siano sempre più rispettosi dei principi di BPL.

Va peraltro considerato che negli ultimi anni si sono moltiplicate le iniziative, i documenti e gli atti normativi incentrati sulla validazione dei metodi analitici per la determinazione di residui e contaminanti in matrici alimentari. I risultati di queste determinazioni hanno svolto una funzione essenziale nella soluzione di controversie rilevanti circa la protezione della salute o la commercializzazione internazionale dei prodotti alimentari, come nel caso di ormoni o diossine. Attività significative in questo contesto sono state intraprese da organizzazioni ed associazioni internazionali come il Codex Alimentarius della Food and Agricultural Organization (FAO) della World Health Organization (WHO), la Commissione Europea e la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA), anche se con finalità diverse legate alla propria specifica missione [7-9].

Da un punto di vista formale, la Decisione SANCO/1805/2000 è stata approntata in ottemperanza a quanto indicato dalla Direttiva del Consiglio 96/23/CE in merito alla successiva emanazione di norme dettagliate per i metodi di impiego frequente e di riferimento per l'analisi dei campioni ufficiali. L'art. 4 della Decisione 90/515/CE del 18 ottobre 1990, l'art. 4 della Decisione 93/256/CE del 14 maggio 1993 e l'art. 5 della Decisione 93/257/CE del 14 maggio 1993 sanciscono che i metodi da esse contemplate debbano essere rivisti entro il 1° gennaio 1996 per tener conto del progresso tecnico e scientifico. La Decisione 98/179/CE del 23 febbraio 1998 prescrive che l'analisi dei campioni ufficiali sia effettuata solo da laboratori approvati dalle autorità competenti. È essenziale che tali laboratori siano accreditati a partire almeno dal 1° gennaio 2002 e che abbiano partecipato

ad opportuni circuiti per la valutazione delle prestazioni sotto la supervisione degli LNR o degli LCR competenti. Vanno pertanto sviluppati ed impiegati criteri opportuni per l'impiego dei metodi per la interpretazione dei risultati analitici al fine di garantire la confrontabilità e l'attendibilità delle informazioni sperimentali sui residui nei prodotti di origine animale all'interno della UE.

Gli argomenti trattati nell'allegato tecnico alla Decisione SANCO/1805/2000 sono i seguenti:

- parte 1 - definizioni e considerazioni generali;
- parte 2 - requisiti generali;
- parte 3 - criteri per l'identificazione e la quantificazione di residui e contaminanti organici;
- parte 4 - criteri per l'identificazione e la quantificazione degli elementi chimici;
- parte 5 - metodi di riferimento per la conferma dei residui delle sostanze appartenenti al gruppo A dell'Allegato 1 alla Direttiva 96/23/CE;
- parte 6 - validazione dei metodi;
- parte 7 - abbreviazioni impiegate.

Definizioni di particolare rilievo in quest'ambito per il sistema LCR-LNR sono elencate qui di seguito.

Metodi di selezione (screening methods). - Sono i metodi usati per determinare un analita od una classe di analiti al livello di interesse. Questi metodi sono caratterizzati dalla capacità di analizzare un gran numero di campioni e sono usati per identificare potenziali campioni positivi all'interno di un vasto numero di campioni. Essi sono particolarmente concepiti per evitare che campioni realmente eccedenti i limiti di legge risultino invece falsi negativi.

Metodi di conferma (confirmatory methods). - Forniscono una piena ed articolata informazione per la identificazione certa dell'analita al livello di interesse. Questi metodi sono concepiti specificamente per dare una informazione sicura sulle identità di sostanze non autorizzate e di sostanze con un limite massimo per i residui (LMR) prefissato. Qualora possibile, questi metodi devono avere un potere di rivelabilità simile a quello dei metodi di selezione.

Metodi di routine (routine methods). - Possono comprendere tanto i metodi di selezione che quelli di conferma.

Metodi di riferimento (reference methods). - Forniscono una identificazione certa e/o la quantificazione degli analiti e devono essere usati, secondo l'art. 5 della Direttiva del Consiglio 96/23/CE, per la conferma di tutti i risultati positivi per le sostanze elencate nel Gruppo A dell'Allegato I della Direttiva stessa. I metodi di riferimento devono basarsi sulla spettrometria molecolare e fornire una informazione diretta circa la struttura molecolare dell'analita in esame.

Validazione dei metodi. - È il processo che si prefigge di dimostrare sperimentalmente che un metodo è adatto allo scopo per cui è stato concepito. Se richieste di natura regolatoria specificano la necessità di criteri di qualità od efficacia, la validazione deve anche dimostrare la idoneità del metodo analitico a soddisfare tali richieste. Il risultato della validazione dovrebbe consentire che il metodo venga caratterizzato qualitativamente e quantitativamente secondo indicatori prestabiliti di prestazioni.

Errore α . - È la probabilità che il campione esaminato non sia veramente da respingere, anche se è stata effettuata una determinazione che porta a constatare una violazione (decisione di falso positivo).

Errore β . - È la probabilità che il campione esaminato sia veramente da respingere, anche se non è stata ottenuta una determinazione che porta a constatare una violazione (decisione di falso negativo).

Limite minimo richiesto per le prestazioni (LMRP). - È il limite stabilito dalla CE e dagli LCR. Esso mira ad armonizzare le prestazioni analitiche dei metodi per le sostanze non autorizzate negli stati membri. L'LMRP dovrebbe poter includere tutte le matrici di interesse per i piani nazionali di controllo dei residui in accordo con quanto prescritto dalla Direttiva 96/23/CE.

I parametri necessari per la validazione sono i limiti analitici e la probabilità di errore (limite decisionale, limite di rivelabilità, relazione tra errore β e livelli di concentrazione, curva di potenza), accuratezza (esattezza, recupero, ripetibilità, riproducibilità), specificità (separazione e identificazione), applicabilità (analiti, matrici, intervalli di concentrazione, intervallo di tempo, robustezza) e stabilità (degli analiti nel solvente durante la conservazione, degli analiti nella matrice durante la conservazione e la preparazione del campione e degli analiti negli estratti durante la conservazione e l'analisi).

I principali aspetti critici della Decisione SANCO/1805/2000 sono riassumibili nei punti seguenti:

- a) la definizione di alcuni termini è in parte difforme da quanto dato in precedenza da altre organizzazioni e tuttora in vigore (ad esempio, le definizioni di specificità, accuratezza, precisione, esattezza e materiali di riferimento);
- b) alcune definizioni sono state inserite in un gruppo di cosiddette "Definizioni varie" ancorché fossero più appropriatamente riconducibili ad altre sezioni o non fossero comunque necessarie;
- c) la procedura semplificata suggerita per la validazione dei metodi è di applicazione complessa e non interamente dimostrabile;
- d) come richiesto dalla Direttiva 96/23/CE, una integrazione tra criteri di accreditamento e principi di BPL è possibile ed auspicabile. Si è già sottolineato, infatti, in che misura i principi di BPL trovino oggi concreta applicazione anche nell'ambito delle attività prescritte per il sistema degli LCR ed LNR.

Conclusioni

La piena e responsabile adozione di un sistema di qualità rispondente alle funzioni assegnate ai laboratori incaricati della determinazione di residui negli alimenti di origine animale è la principale garanzia della affidabilità del dato sperimentale. In questo ambito, l'adozione dei nuovi criteri di validazione dei metodi analitici fornisce uno strumento potente per l'effettuazione di analisi sempre meno soggette ad errore e, quindi, per una più efficiente salvaguardia della salute umana.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 14 febbraio 2002.

BIBLIOGRAFIA

1. Consiglio delle Comunità Europee. Direttiva 96/23/CE del Consiglio concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le Direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le Decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 125, 23/5/1996.
2. Italia. Decreto legislativo 4 agosto 1999, n. 336. Attuazione delle Direttive 96/22/CE e 96/23/CE concernenti il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze β -agoniste nelle produzioni di animali e le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti. *Gazzetta Ufficiale* n. 230, 30 settembre 1999.
3. Bureau International des Poids et Mesures. *Mutual recognition of national measurement standards and of calibration and measurement certificates issued by National Metrology Institutes*. Sèvres: BIPM; 1999. http://bipm.org/enus/2_committees/cgpm21/res2.pdf.
4. GUM. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Geneva: International Organization for Standardization; 1993. <http://www.iso.ch/infoc/otherpub.html#>.
5. UNI-CEI EN ISO/IEC 17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano: UNI-CEI; novembre 2000.
6. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD Principles of good laboratory practice (as revised in 1997)*. Paris: OECD; 1998 (OECD Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring, no. 1, ENV/MC/CHEM(98)17).
7. FAO/WHO. *Proposed draft guidelines for the assessment of the competence of laboratories involved in the import and export control of foods*. Rome: FAO; 1997 (ALINORM 97/23A).
8. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *EMEA Workshop on the requirements and provision of analytical methods for drug residue control in animal products*. London: EMEA; 15 February 2000 (EMEA/V/3362/00).
9. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. *EMEA Workshop on the requirements and provision of analytical methods for drug residue control in animal products*. London: EMEA; 15 February 2000 (EMEA/V/4856/00).