

Roma, 7 marzo 2024

## Metodi microbiologici alternativi e valutazione dell'equivalenza ai sensi dell'Allegato III del Decreto Legislativo 18/23

LUCIA BONADONNA  
già ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

1

DECRETO LEGISLATIVO 23 febbraio 2023, n. 18  
Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento  
europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2020, concernente la  
qualità delle acque destinate al consumo umano

### Allegato III

#### Art. 12 Controlli

Omissis

7. Il controllo dei parametri elencati nell'allegato I, parti A, B, C e D .....

a) possono essere usati metodi di analisi diversi da quelli indicati nell'allegato III, Parte A, per i quali sia stata valutata l'equivalenza secondo quanto previsto nello stesso allegato, purché si possa dimostrare che i risultati ottenuti sono affidabili almeno quanto quelli ottenuti con i metodi specificati nello stesso allegato, formulando richiesta in tal senso al CeNSIA che, previa valutazione del caso, comunicherà alla Commissione europea le informazioni pertinenti su tali metodi e sulla loro equivalenza»

#### SPECIFICHE PER L'ANALISI DEI PARAMETRI

I laboratori, o i terzi che ottengono appalti dai laboratori, sono accreditati UNI CEI EN ISO/IEC 17025 almeno per i parametri di cui alla parte A, lettere da a) a f)

Per la valutazione dell'equivalenza dei metodi alternativi ai metodi previsti fare riferimento a UNI EN ISO 17994 o a UNI EN ISO 16140 (parti 2 e 6), o a qualsiasi altro protocollo analogo riconosciuto a livello internazionale, per stabilire l'equivalenza dei metodi non colturali che esulano dall'ambito di applicazione di UNI EN ISO 17994

2

**ALLEGATO III**  
SPECIFICHE PER L'ANALISI DEI PARAMETRI

DECRETO LEGISLATIVO 23 febbraio 2023 , n. 18  
**Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2020, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano**

**«Parte A**  
**Parametri microbiologici per i quali sono specificati i metodi di analisi**

Per ciascuno dei parametri microbiologici elencati nelle Parti A, C e D, i metodi d'analisi per i parametri microbiologici sono:

a) *Escherichia coli* e batteri coliformi (UNI EN ISO 9308-1 o UNI EN ISO 9308-2);  
b) Enterococchi intestinali (UNI EN ISO 7899-2);  
c) conteggio delle colonie o conteggio degli eterotrofi su piastra a 22°C (UNI EN ISO 6222);  
d) *Clostridium perfringens* spore comprese (UNI EN ISO 14189);  
e) *Legionella* (UNI EN ISO 11731 conforme al valore stabilito nell'allegato I, Parte D)

sia per il controllo di verifica basato sul rischio, sia per integrare i metodi colturali, possono essere utilizzati in aggiunta altri metodi, quali metodi colturali rapidi, metodi non colturali, metodi molecolari, tra cui qPCR, eseguita in accordo alla ISO/TS 12869

f) colifagi somatici;  
per il monitoraggio operativo, è possibile fare riferimento all'allegato II, Parte A, norme UNI EN ISO 10705-2 e ISO 10705-3

Per la ricerca di parametri microbiologici anche supplementari e stabiliti nel PSA, possono essere adottate le metodiche previste in Rapporti ISTISAN 07/5 e s.m.i.»

Aggiornamento Rapporti ISTISAN 07/5  
parametri Allegato III: «istruzione operativa»  
+ parametri non regolamentati ma di interesse sanitario

3

**UNI EN ISO 16140-1**

**Reference method**  
internationally recognized and widely accepted method

**Alternative method\***  
method of analysis that detects or quantifies, for a given category of products, the same analyte as is detected or quantified using the corresponding reference method

**PERCHÉ?**

- Overcome any shortcomings of reference methods
- Provide faster results versus traditional culture methods
- Cost effective
- More efficient/sensible/reliable

\*può essere proprietario, coperto da brevetto, ecc.

4

<p><b>REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE</b> del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari</p>	<p><b>DECRETO LEGISLATIVO 23 febbraio 2023, n. 18.</b> <u>Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2020, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano.</u></p>
<p><b>«metodi di analisi alternativi»:</b> — validati in base al metodo di riferimento specifico in conformità al protocollo di cui alla norma EN ISO 16140-2</p> <p><b>«metodi proprietari»</b> come metodi alternativi: — validati, secondo il protocollo di cui alla norma EN ISO 16140-2, conformemente al metodo di riferimento specifico — <u>certificati da un organismo di certificazione indipendente</u></p>	<p style="text-align: right;"><b>Allegato III</b></p> <p>UNI EN ISO <b>16140-2</b>: Protocollo per la validazione di <b>metodi (proprietary) alternativi</b> rispetto al metodo di riferimento</p> <p>UNI EN ISO <b>16140-6</b>: Protocollo per la validazione di <b>metodi (proprietary) alternativi per conferma microbiologica e procedure di tipizzazione</b></p> <div style="background-color: #4a7ebb; color: white; padding: 5px; border-radius: 5px;"> <ul style="list-style-type: none"> <li>ISO <a href="http://www.iso.org">www.iso.org</a></li> <li>AFNOR <a href="http://www.afnor.org">www.afnor.org</a></li> <li>MICROVAL <a href="http://www.microval.org">www.microval.org</a></li> <li>NORDVAL <a href="http://www.nmkl.org">www.nmkl.org</a></li> </ul> </div>

5

**Enterolert-DW**

**COMPARATIVE EVALUATION ACCORDING TO ISO 17994 BETWEEN ENTEROLERT\*-DW QUANTI-TRAY\* AND THE ISO 7899-2:2000 MEMBRANE FILTRATION METHOD FOR THE ENUMERATION OF ENTEROCOCCI IN DRINKING WATER**

Association française de normalisation (AFNOR) (2013). **AFNOR certification validation of the method Enterolert-DW/Quanti-Tray for the enumeration of enterococci**. NF Validation Report.

[https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-IDX-33-03-1013\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/sites/2/2014/03/Synt-IDX-33-03-1013_en.pdf)

0039532-20/12/2023-DGPRE-MDS-P

**SUBJECT: Communication of Enterolert-DW as alternative microbiological method for the analysis of water intended for human consumption under Directive (UE) 2020/2184 (Part A of Annex III).**

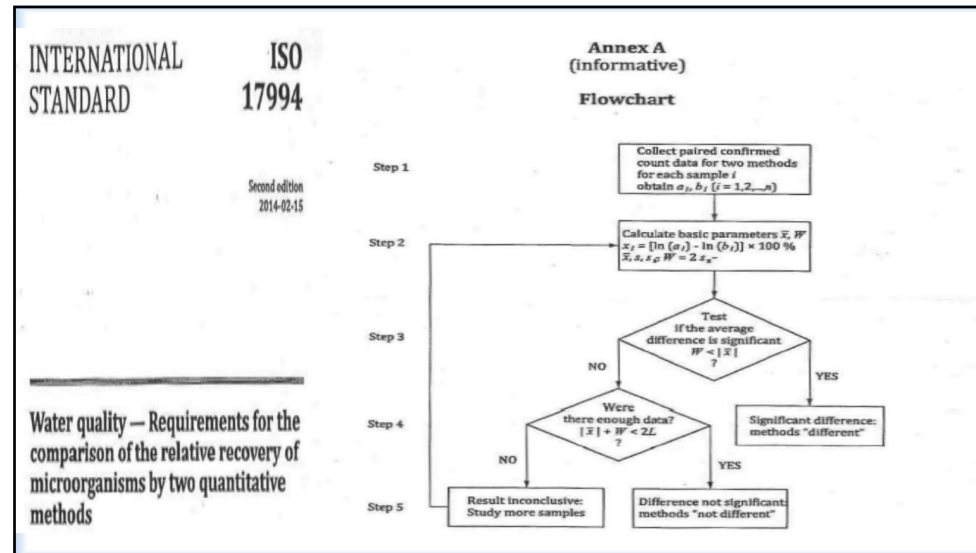
6

<p>INTERNATIONAL STANDARD</p> <p style="text-align: right;"><b>ISO 17994</b></p> <p style="text-align: right; font-size: small;">Second edition 2014-02-15</p> <hr/> <p><b>Water quality — Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods</b></p> <p><small>*se i dati non permettono di stabilire l'equivalenza ("not different, or "different"), analizzare altri campioni e eseguire di nuovo il calcolo</small></p> <p><small>se i metodi differiscono marcatamente, sono sufficienti pochi campioni</small></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• selezione di un numero significativo di laboratori distribuiti in un'ampia area territoriale e ripartiti in diverse zone geografiche</li> <li>• laboratori accreditati con esperienza e capacità tecnica</li> <li>• svolgimento di un training per uniformare l'attività</li> <li>• analisi di un numero congruo di campioni, funzione delle tecniche utilizzate, della differenza media relativa osservata, della differenza relativa considerata significativa, della deviazione standard sperimentale</li> <li>• conferma dei microrganismi bersaglio presuntivi e di un numero significativo di organismi interferenti</li> <li>• calcolo statistico dei valori ottenuti, effettuato da un esperto di statistica*</li> </ul>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

7

<p>INTERNATIONAL STANDARD</p> <p style="text-align: right;"><b>ISO 17994</b></p> <p style="text-align: right; font-size: small;">Second edition 2014-02-15</p> <hr/> <p><b>Water quality — Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods</b></p>	<p>two methods are considered quantitatively "not-different" if the mean relative difference of the paired confirmed counts does not differ significantly from zero and the confidence interval does not extend beyond the level of the predetermined limit</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

8



9

nel 2002, la CE ha istituito il Gruppo consultivo europeo di microbiologia, confermato nel 2012 insieme a un nuovo mandato di supporto per tutte le direttive europee relative all'acqua

**Assessment of Submission of Comparison of an Alternative Method by ISO 17994**

Requirement or Component	Present Y/N	Comments	5. Data Handling
<b>1. Scope</b>			5.1 No rounding of raw whole integer counts
1.1 Intended for the detection or quantification of the same target group or species of microorganisms			5.2 Presumptive and confirmed count data shall at least be reported as confirmation rates information
<b>2. Organisation</b>			5.3 Exclude samples where both counts are zero or at least one count is TNIC
2.1 Panel of Experts, including appropriate statistical expertise			5.4 Preliminary statistical evaluations for differences between water types or laboratories and for outliers
2.2 Agreed written protocol shall be strictly followed			Exclusion of outliers only in case of (technical) reasons
2.3 Training session			5.5 Merging of data or, if necessary, calculations in separate groups before making conclusions
<b>3. General</b>			5.6 Calculations and evaluation
3.1 Both methods to satisfy minimum requirements of ISO 13843			5.7 Value for the maximum acceptable deviation
3.2 All labs to have recognised Quality Assurance system			
<b>4. Study Design</b>			<b>6. Report (Section 8)</b>
4.1 Basic data are pairs of confirmed counts from equal portions from the same vessel			6.1 Reference to ISO 17994:2004
4.2 Sample range over large geographical or environmental area			6.2 Explanation or reference to methods
4.3 Samples should represent types in scope of both methods			6.3 Descriptive details of experiments
4.4 Appropriate stress of the microbial population (e.g. chlorination)			6.4 Evaluation in words (conclusions)
4.5 The samples should contain enough number of target organisms (10 - 30) so as to minimise number of samples with zero counts from one of the paired counts			6.5 Mean relative difference and standard deviation
4.6 Number of laboratories tentatively suggested as minimum six			6.6 Annex of raw data
4.7 Confirm every count (colony or well) in methods that require confirmation			

10

