

# REGOLAMENTI

## REGOLAMENTO (UE) 2017/771 DELLA COMMISSIONE

del 3 maggio 2017

**che modifica il regolamento (CE) n. 152/2009 per quanto riguarda i metodi per la determinazione dei livelli di diossine e policlorobifenili**

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (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 <sup>(1)</sup>, in particolare l'articolo 11, paragrafo 4,

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione <sup>(2)</sup> contempla i metodi per la determinazione dei livelli di policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF), policlorobifenili (PCB) diossina-simili e PCB non diossina-simili negli alimenti per animali.
- (2) Il laboratorio UE di riferimento per le diossine e i PCB nei mangimi e negli alimenti ha fornito elementi di prova del fatto che in alcuni casi i risultati delle analisi per le diossine e i PCB non sono attendibili, laddove i laboratori che effettuano l'analisi dei campioni prelevati dagli operatori del settore dei mangimi a norma del regolamento (CE) n. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio <sup>(3)</sup> non applichino i criteri di performance di cui all'allegato V, parte B, del regolamento (CE) n. 152/2009. È quindi opportuno rendere obbligatoria l'applicazione dei criteri di performance per l'analisi dei campioni.
- (3) Poiché il metodo che prevede il ricorso a un limite di decisione al fine di garantire, con una certa probabilità, che un risultato analitico superi il livello massimo, come previsto dalla decisione 2002/657/CE della Commissione <sup>(4)</sup>, non è più applicato all'analisi di diossine, furani e PCB nei mangimi, è opportuno eliminare tale metodo e mantenere soltanto il metodo dell'incertezza estesa per mezzo del fattore di copertura 2 corrispondente ad un livello di fiducia del 95 % circa.
- (4) Sono stati elaborati documenti di orientamento per l'incertezza di misura e per la stima del limite di rilevazione (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ), ai quali è opportuno fare riferimento.
- (5) In linea con gli obblighi di reporting per i metodi di screening bioanalitici di cui all'allegato V, parte B, del regolamento (CE) n. 152/2009, al capo II della medesima parte è altresì opportuno prevedere obblighi di reporting specifici per i metodi fisico-chimici da utilizzare per lo screening.
- (6) Poiché nella maggior parte dei casi le analisi delle diossine, dei PCB diossina-simili e dei PCB non diossina-simili sono effettuate congiuntamente, è opportuno allineare i criteri di performance relativi ai PCB non diossina-simili di cui all'allegato V, parte B, capo III, punto 3.3, del regolamento (CE) n. 152/2009 ai criteri di performance relativi alle diossine e ai PCB diossina-simili. Si tratta di una semplificazione che non comporta in pratica modifiche sostanziali in quanto per i PCB non diossina-simili l'intensità relativa degli ioni qualificatori rispetto agli ioni bersaglio è > 50 %.

<sup>(1)</sup> GUL 165 del 30.4.2004, pag. 1.

<sup>(2)</sup> Regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione, del 27 gennaio 2009, che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali (GU L 54 del 26.2.2009, pag. 1).

<sup>(3)</sup> Regolamento (CE) n. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 gennaio 2005, che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi (GU L 35 dell'8.2.2005, pag. 1).

<sup>(4)</sup> Decisione 2002/657/CE della Commissione, del 14 agosto 2002, che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (GU L 221 del 17.8.2002, pag. 8).

- (7) Alla luce dell'esperienza acquisita è opportuno adeguare alcune specifiche tecniche quali i recuperi degli standard interni marcati con isotopi di cui all'allegato V, parte B, capo III, punti 7.3 e 7.5, del regolamento (CE) n. 152/2009.
- (8) Sono inoltre proposte altre piccole modifiche delle attuali disposizioni al fine di migliorare la coerenza della terminologia utilizzata, che impongono la sostituzione completa dell'allegato V, parte B, del regolamento (CE) n. 152/2009 al fine di preservare la leggibilità del testo.
- (9) È pertanto opportuno modificare di conseguenza il regolamento (CE) n. 152/2009.
- (10) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

*Articolo 1*

L'allegato V, parte B, del regolamento (CE) n. 152/2009 è modificato come indicato nell'allegato del presente regolamento.

*Articolo 2*

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 3 maggio 2017

*Per la Commissione*  
*Il presidente*  
Jean-Claude JUNCKER

## ALLEGATO

Nell'allegato V del regolamento (CE) n. 152/2009 la parte B «DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E PCB» è sostituita dalla seguente:

«B. DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E PCB

## CAPO I

**Metodi di campionamento e interpretazione dei risultati analitici****1. Campo d'applicazione e definizioni**

I campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF), policlorobifenili (PCB) diossina-simili<sup>(1)</sup> e PCB non diossina-simili negli alimenti per animali sono prelevati secondo le disposizioni dell'allegato I. Si applicano le prescrizioni quantitative relative al controllo delle sostanze o dei prodotti ripartiti in modo uniforme negli alimenti per animali di cui all'allegato I, punto 5.1. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi delle partite o sottopartite da cui sono prelevati. Il rispetto dei livelli massimi fissati dalla direttiva 2002/32/CE è accertato in base ai livelli determinati nei campioni di laboratorio.

Ai fini della presente parte B si applicano le definizioni di cui all'allegato I della decisione 2002/657/CE della Commissione<sup>(2)</sup>.

(<sup>1</sup>) Tabella dei fattori di equivalenza tossica (TEF) per i PCDD, i PCDF e i PCB diossina-simili: TEF dell'OMS per la valutazione dei rischi per l'uomo basati sulle conclusioni della riunione di esperti del Programma internazionale sulla sicurezza delle sostanze chimiche dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) svoltasi a Ginevra nel giugno 2005 [Martin Van den Berg et al. «The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds». Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)].

Congenero	Valore TEF	Congenero	Valore TEF
Dibenzo-p-diossine (PCDD) e dibenzo-p-furani (PCDF)		PCB «diossina-simili» PCB non-orto + PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB non-orto	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Abbreviazioni: «T» = tetra; «Pe» = penta; «Hx» = esa; «Hp» = epta; «O» = octa; «CDD» = clorodibenzodiossina; «CDF» = clorodibenzofurano; «CB» = clorobifenile.

(<sup>2</sup>) Decisione 2002/657/CE della Commissione, del 14 agosto 2002, che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (GU L 221 del 17.8.2002, pag. 8).

In aggiunta a tali definizioni, ai fini della presente parte B si applicano inoltre le seguenti definizioni:

«Metodi di screening»: i metodi impiegati per la selezione di campioni con livelli di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili superiori ai livelli massimi o alle soglie di intervento. Essi consentono un alto throughput di campioni a costi commisurati all'efficacia, in modo da aumentare la possibilità di scoprire nuovi incidenti caratterizzati da alta esposizione e rischi per la salute dei consumatori. I metodi di screening si basano su metodi bioanalitici o GC-MS. I risultati derivanti da campioni che superano il valore di cut-off utilizzato per controllare la conformità con il livello massimo sono verificati mediante una nuova analisi completa del campione originale avvalendosi di un metodo di conferma.

«Metodi di conferma»: metodi che forniscono informazioni complete o complementari che permettono di identificare e di quantificare in modo inequivoco i PCDD/PCDF e i PCB diossina-simili al livello massimo o, se del caso, alla soglia di intervento. Tali metodi utilizzano la gascromatografia/spettrometria di massa ad alta risoluzione (GC-HRMS) o la gascromatografia/spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS).

## 2. Conformità della partita o sottopartita al livello massimo

### 2.1. PCB non diossina-simili

La partita o sottopartita è conforme al livello massimo se il risultato analitico della somma di PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180 (nel seguito «PCB non diossina-simili») non supera il livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa <sup>(1)</sup>. La partita o sottopartita non è conforme al livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE se la media di due risultati analitici upperbound <sup>(2)</sup> ottenuti attraverso una doppia analisi <sup>(3)</sup>, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa, supera il livello massimo oltre ogni ragionevole dubbio; ciò vale a dire che al fine di valutare la conformità si utilizza la concentrazione risultante dall'analisi dopo aver dedotto l'incertezza di misura estesa.

L'incertezza di misura estesa è calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa. Una partita o sottopartita non è conforme se la media dei valori misurati meno l'incertezza estesa della media supera il livello massimo.

Le norme di cui ai paragrafi precedenti del presente punto si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione utilizzato per il controllo ufficiale. Per le analisi effettuate nel quadro di procedure di ricorso o di arbitrato si applicano le norme nazionali.

### 2.2. PCDD/PCDF e PCB diossina-simili

La partita o sottopartita è conforme al livello massimo se il risultato di una singola analisi,

- eseguita con un metodo di screening il cui tasso di falsi conformi è inferiore al 5 %, indica che il livello non supera i livelli massimi fissati dalla direttiva 2002/32/CE rispettivamente per PCDD/PCDF e per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili,
- eseguita con un metodo di conferma, non supera i livelli massimi fissati dalla direttiva 2002/32/CE rispettivamente per PCDD/PCDF e per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili tenendo conto dell'incertezza di misura estesa.

<sup>(1)</sup> Ove applicabili sono seguiti i principi descritti nel documento «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

<sup>(2)</sup> «Upperbound»: valore calcolato considerando pari al limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato. «Lowerbound»: valore calcolato considerando pari a zero il contributo di ogni congenere non quantificato. «Mediumbound»: valore calcolato considerando pari alla metà del limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato.

<sup>(3)</sup> Doppia analisi: analisi separata degli analiti di interesse utilizzando una seconda aliquota del medesimo campione omogeneizzato. Di norma si applicano le prescrizioni relative alla doppia analisi di cui all'allegato II, capitolo C, punto 3. Si rende tuttavia necessaria la doppia analisi solo qualora il risultato della prima determinazione, eseguita applicando metodi che utilizzano lo standard interno marcato con <sup>13</sup>C per gli analiti di interesse, non sia conforme. La doppia analisi è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione incrociata interna o di una mescolanza accidentale dei campioni. Se l'analisi è effettuata nel corso di un incidente di contaminazione, la conferma mediante doppia analisi può essere omessa nel caso in cui la tracciabilità permetta di stabilire il legame tra i campioni selezionati per l'analisi e tale incidente, e quando il livello rilevato è notevolmente superiore al livello massimo.

Per i dosaggi di screening è stabilito un valore di cut-off per le decisioni sulla conformità del campione ai livelli massimi stabiliti rispettivamente per PCDD/PCDF o per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.

La partita o sottopartita non è conforme al livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE se la media di due risultati analitici upperbound <sup>(1)</sup> ottenuti attraverso una doppia analisi <sup>(2)</sup> eseguita con un metodo di conferma, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa, supera il livello massimo oltre ogni ragionevole dubbio; ciò vale a dire che al fine di valutare la conformità si utilizza la concentrazione risultante dall'analisi dopo aver dedotto l'incertezza di misura estesa.

L'incertezza di misura estesa è calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa. Una partita o sottopartita non è conforme se la media dei valori misurati meno l'incertezza estesa della media supera il livello massimo.

Per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili è utilizzata la somma delle incertezze estese stimate dei risultati analitici separati di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.

Le norme di cui ai paragrafi precedenti del presente punto si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione utilizzato per il controllo ufficiale. Per le analisi effettuate nel quadro di procedure di ricorso o di arbitrato si applicano le norme nazionali.

### 3. Risultati eccedenti le soglie di intervento di cui all'allegato II della direttiva 2002/32/CE

Le soglie di intervento fungono da strumento per la selezione dei campioni nei casi in cui è necessario identificare una fonte di contaminazione e prendere provvedimenti per la sua riduzione o eliminazione. I metodi di screening stabiliscono appropriati valori di cut-off per la selezione di tali campioni. Qualora siano necessarie azioni significative per identificare una fonte e ridurre o eliminare la contaminazione è opportuno confermare il superamento delle soglie di intervento mediante una doppia analisi eseguita con un metodo di conferma e tenendo conto dell'incertezza di misura estesa <sup>(3)</sup>.

## CAPO II

### *Preparazione dei campioni e prescrizioni per i metodi di analisi impiegati nel controllo ufficiale dei livelli di diossine (PCDD/PCDF) e di PCB diossina-simili negli alimenti per animali*

#### 1. Campo d'applicazione

Le prescrizioni di cui al presente capo si applicano alle analisi degli alimenti per animali effettuate ai fini del controllo ufficiale dei livelli di PCDD/PCDF 2,3,7,8-sostituiti e di PCB diossina-simili e per quanto riguarda la preparazione dei campioni e le prescrizioni analitiche per altre finalità di legge, che comprendono i controlli effettuati dagli operatori del settore dei mangimi per garantire la conformità con le disposizioni del regolamento (CE) n. 1831/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio <sup>(4)</sup>.

<sup>(1)</sup> «Upperbound»: valore calcolato considerando pari al limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato all'equivalente tossico (TEQ). «Lowerbound»: valore calcolato considerando pari a zero il contributo di ogni congenere non quantificato al TEQ. «Mediumbound»: valore calcolato considerando pari alla metà del limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato al TEQ.

<sup>(2)</sup> Di norma si applicano le prescrizioni relative alla doppia analisi di cui all'allegato II, capitolo C, punto 2. Si rende tuttavia necessaria la doppia analisi solo qualora il risultato della prima determinazione, eseguita applicando metodi di conferma che utilizzano lo standard interno marcato con <sup>13</sup>C per gli analiti di interesse, non sia conforme. La doppia analisi è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione incrociata interna o di una miscelazione accidentale dei campioni. Se l'analisi è effettuata nel corso di un incidente di contaminazione, la conferma mediante doppia analisi può essere omessa nel caso in cui la tracciabilità permetta di stabilire il legame tra i campioni selezionati per l'analisi e tale incidente, e quando il livello rilevato è notevolmente superiore al livello massimo.

<sup>(3)</sup> Le precisazioni e le prescrizioni relative alla doppia analisi per il controllo delle soglie di intervento sono identiche a quelle indicate sopra alla nota 2 per i livelli massimi.

<sup>(4)</sup> Regolamento (CE) n. 1831/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 gennaio 2005, che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi (GU L 35 dell'8.2.2005, pag. 1).

Il monitoraggio della presenza di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili negli alimenti per animali può essere effettuato con due differenti tipologie di metodi analitici:

a) *Metodi di screening*

L'obiettivo dei metodi di screening è selezionare i campioni con livelli di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili superiori ai livelli massimi o alle soglie di intervento. I metodi di screening consentono un alto throughput di campioni a costi commisurati all'efficacia, in modo da accrescere la possibilità di scoprire nuovi incidenti con alta esposizione e rischi per la salute dei consumatori. La loro applicazione ha lo scopo di evitare i risultati falsi conformi. I metodi di screening possono comprendere metodi bioanalitici e metodi GC-MS.

I metodi di screening confrontano il risultato analitico con un valore di cut-off e danno una decisione sì/no indicativa del possibile superamento del livello massimo o della soglia di intervento. La concentrazione di PCDD/PCDF e la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nei campioni che si sospetta non siano conformi al livello massimo è determinata o confermata mediante un metodo di conferma.

I metodi di screening possono inoltre fornire un'indicazione dei livelli di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili presenti nel campione. In caso di applicazione di metodi di screening bioanalitici il risultato è espresso in equivalenti bioanalitici (BEQ), mentre in caso di applicazione di metodi fisico-chimici GC-MS tale risultato è espresso in equivalenti tossici (TEQ). I risultati numerici dei metodi di screening sono atti a dimostrare la conformità o la sospetta non conformità delle soglie di intervento nonché il loro superamento; forniscono inoltre un'indicazione del range dei livelli in caso di follow-up con metodi di conferma. Non sono idonei per attività quali la valutazione dei livelli di background, la stima dell'assunzione, il monitoraggio delle tendenze nel tempo dei livelli o la ri-valutazione delle soglie di intervento e dei livelli massimi.

b) *Metodi di conferma*

I metodi di conferma consentono di identificare e di quantificare in modo inequivoco i PCDD/PCDF e i PCB diossina-simili presenti in un campione e forniscono informazioni complete a livello di congeneri. Questi metodi permettono pertanto di controllare i livelli massimi e le soglie di intervento, compresa la conferma dei risultati ottenuti con i metodi di screening. I risultati possono inoltre essere utilizzati per altri scopi quali la determinazione dei livelli di background bassi nel controllo degli alimenti per animali, il monitoraggio delle tendenze nel tempo, la valutazione dell'esposizione e la creazione di una base di dati per l'eventuale ri-valutazione delle soglie di intervento e dei livelli massimi. Essi sono importanti anche per stabilire pattern di congeneri al fine di identificare la fonte di un'eventuale contaminazione. Tali metodi impiegano la GC-HRMS. Al fine di confermare la conformità o la non conformità con il livello massimo può essere impiegata anche la GC-MS/MS.

## 2. **Premessa**

Per il calcolo delle concentrazioni di TEQ, le concentrazioni delle singole sostanze in un dato campione sono moltiplicate per il rispettivo fattore di equivalenza tossica (TEF) (cfr. nota 1 al capo I) e quindi sommate per ottenere la concentrazione totale di composti diossina-simili espressa in TEQ.

Ai fini della presente parte B, il limite di quantificazione specifico accettato di un singolo congenero è il tenore più basso dell'analita che può essere misurato con ragionevole certezza statistica nel rispetto dei criteri di identificazione definiti in norme riconosciute a livello internazionale come, ad esempio, la norma EN 16215:2012 (Alimenti per animali — Determinazione di diossine e PCB diossina-simili mediante GC-HRMS e di PCB indicatori mediante GC-HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1688 riveduti.

Il limite di quantificazione di un singolo congenero può essere identificato come:

- a) la concentrazione di un analita nell'estratto di un campione che produce una risposta strumentale a due diversi ioni da monitorare con un rapporto S/R (segnale/rumore) di 3:1 per il segnale meno intenso dei dati grezzi; o

- b) il punto di concentrazione più basso su una curva di calibrazione che produce una deviazione accettabile ( $\leq 30\%$ ) e coerente (misurata almeno all'inizio e alla fine della serie analitica di campioni) rispetto al fattore di risposta relativo medio calcolato per tutti i punti sulla curva di calibrazione per ciascuna serie di campioni se per motivi tecnici il calcolo del rapporto segnale/rumore non fornisce risultati affidabili. Il limite di quantificazione (LOQ) è calcolato a partire dal punto di concentrazione più basso, tenendo conto del recupero degli standard interni e delle grandezze dei campioni.

I metodi di screening bioanalitici non danno risultati al livello del congenere, ma solo un'indicazione<sup>(1)</sup> del livello di TEQ espresso in BEQ, in considerazione del fatto che non tutti i composti presenti in un estratto di campione che producono una risposta nel test possono soddisfare tutte le prescrizioni del principio di TEQ.

I metodi di screening e di conferma possono essere applicati per il controllo di una determinata matrice solo se sono sufficientemente sensibili per rilevare i livelli in modo attendibile alla soglia d'intervento o al livello massimo.

### 3. Prescrizioni di garanzia della qualità

- 3.1. Sono adottate misure per evitare contaminazioni incrociate durante ogni fase del campionamento e dell'analisi.
- 3.2. I campioni sono conservati e trasportati in contenitori di vetro, alluminio, polipropilene o polietilene, che ne permettano la conservazione senza influenzare i livelli di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili. Le tracce di polvere di carta sono rimosse dal contenitore.
- 3.3. La conservazione e il trasporto avvengono in modo da preservare l'integrità del campione di alimenti per animali.
- 3.4. Se del caso, macinare finemente e mescolare accuratamente ogni campione di laboratorio utilizzando un metodo che garantisca una completa omogeneizzazione (ad esempio, macinazione che consenta il passaggio attraverso un setaccio a maglie di 1 mm); prima della macinazione, qualora il tenore di umidità sia troppo elevato, i campioni sono asciugati.
- 3.5. I reagenti, la vetreria e le apparecchiature sono sottoposti a controlli per evitare che influenzino i risultati espressi in TEQ o BEQ.
- 3.6. È effettuata un'analisi in bianco, eseguendo l'intera procedura di analisi senza il campione.
- 3.7. Per i metodi bioanalitici occorre verificare che la vetreria e i solventi utilizzati nell'analisi siano esenti da composti che interferiscono con la rilevazione dei composti bersaglio nel working range. La vetreria è risciacquata con solventi o riscaldata a temperature che consentano di eliminare dalla superficie le tracce di PCDD/PCDF, composti diossina-simili e composti interferenti.
- 3.8. La quantità del campione utilizzato per l'estrazione è sufficiente a permettere la conformità alle prescrizioni in relazione ad un working range sufficientemente basso comprendente le concentrazioni di livelli massimi o della soglia di intervento.
- 3.9. Le procedure specifiche di preparazione dei campioni utilizzate per i prodotti considerati sono conformi a linee guida accettate a livello internazionale.

### 4. Prescrizioni per i laboratori

- 4.1. Come prescritto dal regolamento (CE) n. 882/2004, i laboratori sono accreditati da un organismo riconosciuto operante in conformità alla Guida ISO 58, per garantire che alle loro analisi sia applicata l'assicurazione qualità. I laboratori sono accreditati in base alla norma EN ISO/IEC 17025. Ove applicabili, sono seguiti i principi descritti negli orientamenti tecnici per la stima dell'incertezza di misura e dei limiti di quantificazione per l'analisi dei PCDD/PCDF e dei PCB<sup>(2)</sup>.

<sup>(1)</sup> I metodi bioanalitici non sono specifici ai congeneri inclusi nel sistema TEF. Nell'estratto del campione possono essere presenti altri composti strutturalmente affini AhR-attivi che contribuiscono alla risposta globale. I risultati bioanalitici non sono pertanto una stima ma piuttosto un'indicazione del livello di TEQ nel campione.

<sup>(2)</sup> «Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry» ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)) e «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

- 4.2. La competenza del laboratorio è dimostrata dalla partecipazione regolare ed efficace a studi condotti in collaborazione con altri laboratori per la determinazione di PCDD/PCDF e di PCB diossina-simili nelle matrici di alimenti per animali e nei range di concentrazioni corrispondenti.
- 4.3. I laboratori che applicano metodi di screening per il controllo di routine dei campioni instaurano una stretta cooperazione con i laboratori che applicano il metodo di conferma per il controllo della qualità e per la conferma del risultato analitico di campioni sospetti.

## 5. **Prescrizioni di base per la procedura di analisi per le diossine (PCDD/PCDF) e i PCB diossina-simili**

### 5.1. *Working range e limiti di quantificazione bassi*

Per i PCDD/PCDF le quantità rilevabili si situano nel range superiore del femtogrammo ( $10^{-15}$  g), data l'estrema tossicità di alcuni di questi composti. Per la maggior parte dei congeneri dei PCB è già sufficiente un limite di quantificazione dell'ordine del nanogrammo ( $10^{-9}$  g). Per la misura dei congeneri più tossici dei PCB diossina-simili (in particolare i congeneri non orto-sostituiti) il limite inferiore del working range raggiunge i livelli bassi del picogrammo ( $10^{-12}$  g). Per tutti gli altri congeneri dei PCB è sufficiente un limite di quantificazione dell'ordine del nanogrammo ( $10^{-9}$  g).

### 5.2. *Alta selettività (specificità)*

- 5.2.1. Occorre distinguere tra PCDD/PCDF e PCB diossina-simili e una moltitudine di altri composti coestratti che possono generare un'interferenza, presenti anche in concentrazioni superiori di vari ordini di grandezza rispetto a quelle degli analiti di interesse. Per i metodi GC-MS è necessaria una differenziazione tra i vari congeneri, in particolare tra quelli tossici (ad esempio, i diciassette PCDD/PCDF 2,3,7,8-sostituiti e i dodici PCB diossina-simili) e gli altri congeneri.
- 5.2.2. I metodi bioanalitici permettono di rilevare i composti bersaglio come somma di PCDD/PCDF e/o PCB diossina-simili. Il clean-up del campione ha lo scopo di eliminare i composti che causano risultati falsi non conformi o che possono diminuire la risposta, causando risultati falsi conformi.

### 5.3. *Alta accuratezza (esattezza e precisione, recupero apparente del biosaggio)*

- 5.3.1. Per i metodi GC-MS la determinazione fornisce una stima valida dell'esatta concentrazione in un campione. È necessaria un'alta accuratezza per evitare che il risultato dell'analisi di un campione sia respinto a causa della scarsa affidabilità del livello di TEQ determinato. L'accuratezza è espressa come *esattezza* (differenza tra il valore medio misurato per un analita in un materiale certificato e il suo valore certificato, espressa in percentuale di tale valore) e *precisione* (deviazione standard relativa  $RSD_R$  calcolata in base a risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità).
- 5.3.2. Per i metodi bioanalitici è determinato il recupero apparente del biosaggio. Il recupero apparente del biosaggio è il livello di BEQ calcolato a partire dalla curva di calibrazione della TCDD o del PCB 126 corretto del bianco e poi diviso per il livello di TEQ determinato dal metodo di conferma. Mira a correggere fattori quali la perdita di PCDD/PCDF e composti diossina-simili durante le fasi di estrazione e clean-up, composti coestratti che aumentano o diminuiscono la risposta (effetti agonistici e antagonistici), la qualità del fit della curva o le differenze tra i valori TEF e REP (potenzialità relativa). Il recupero apparente del biosaggio è calcolato a partire da idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello di interesse.

### 5.4. *Validazione nel range del livello massimo e misure generali di controllo della qualità*

- 5.4.1. I laboratori dimostrano la performance di un metodo nel range del livello massimo, ad esempio 0,5x, 1x e 2x il livello massimo con un coefficiente di variazione accettabile per le analisi ripetute, durante la procedura di validazione e durante le analisi di routine.

5.4.2. Controlli regolari in bianco ed esperimenti spiking o analisi di campioni di controllo (di preferenza, se disponibile, materiale di riferimento certificato) sono effettuati come misure interne di controllo della qualità. Per i controlli in bianco, gli esperimenti spiking o le analisi dei campioni di controllo, sono registrati e verificati diagrammi di controllo qualità per assicurare che la performance analitica sia conforme alle prescrizioni.

#### 5.5. *Limite di quantificazione*

5.5.1. Per un metodo di screening bioanalitico non è indispensabile fissare il limite di quantificazione, ma il metodo deve dimostrare di poter differenziare tra il valore bianco e il valore di cut-off. Quando è fornito un livello BEQ, è fissato un livello di reporting per trattare i campioni che presentano una risposta al di sotto di tale livello. Il livello di reporting è dimostrato diverso dai campioni bianchi di procedura almeno di un fattore tre, con una risposta al di sotto del working range. È quindi calcolato a partire da campioni contenenti i composti bersaglio attorno al livello minimo richiesto, e non da un rapporto S/R o un dosaggio bianco.

5.5.2. Il limite di quantificazione per un metodo di conferma è dell'ordine di circa un quinto del livello massimo.

#### 5.6. *Criteri analitici*

Affinché i metodi di conferma o di screening diano risultati affidabili, devono essere soddisfatti i seguenti criteri nel range del livello massimo rispettivamente per il valore TEQ o BEQ, determinati come TEQ o BEQ totali (somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili) o separatamente per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.

	Screening con metodi bioanalitici o fisico-chimici	Metodi di conferma
Tasso di falsi conformi (*)	< 5 %	
Esattezza		da - 20 % a + 20 %
Ripetibilità (RSD <sub>r</sub> )	< 20 %	
Precisione intermedia (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %

(\*) rispetto ai livelli massimi.

#### 5.7. *Prescrizioni specifiche per i metodi di screening*

5.7.1. Per lo screening possono essere utilizzati metodi GC-MS e metodi bioanalitici. Per i metodi GC-MS valgono le prescrizioni indicate al punto 6. Per i metodi bioanalitici cellulari valgono le prescrizioni specifiche indicate al punto 7.

5.7.2. I laboratori che applicano metodi di screening per il controllo di routine dei campioni instaurano una stretta cooperazione con i laboratori che applicano il metodo di conferma.

5.7.3. Durante l'analisi di routine la performance del metodo di screening deve essere verificata mediante un controllo della qualità analitica e una validazione del metodo on-going. È necessario un programma continuo per il controllo dei risultati conformi.

5.7.4. Controllo dell'eventuale soppressione della risposta cellulare e della citotossicità:

il 20 % degli estratti del campione è misurato in screening di routine senza e con aggiunta di 2,3,7,8-TCDD corrispondente al livello massimo o alla soglia di intervento, per verificare se la risposta è soppressa da sostanze interferenti presenti nell'estratto del campione. La concentrazione misurata del campione spiked è comparata con la somma della concentrazione dell'estratto unspiked e della concentrazione dello spiking. Se la concentrazione misurata è inferiore di più del 25 % alla concentrazione (somma) calcolata, questo indica una potenziale soppressione del segnale e il rispettivo campione deve essere sottoposto ad analisi di conferma GC-HRMS. I risultati sono monitorati in diagrammi di controllo qualità.

5.7.5. Controllo di qualità sui campioni conformi:

sono confermati mediante GC/HRMS dal 2 al 10 % circa dei campioni conformi, secondo la matrice del campione e l'esperienza di laboratorio.

5.7.6. Determinazione dei tassi di falsi conformi a partire dai dati di controllo di qualità:

è determinato il tasso dei risultati falsi conformi dello screening di campioni al di sotto e al di sopra del livello massimo o della soglia di intervento. I tassi reali di falsi conformi sono inferiori al 5 %. Se si dispone di un minimo di 20 risultati confermati per matrice/gruppo di matrici dal controllo di qualità dei campioni conformi, da questa base di dati sono tratte conclusioni sul tasso di falsi conformi. Anche i risultati dei campioni analizzati in ring trial o durante incidenti di contaminazione, che coprono un range di concentrazione fino a per esempio 2x il livello massimo (LM), possono essere inclusi nel minimo dei 20 risultati richiesti per la valutazione del tasso di falsi conformi. I campioni coprono i pattern di congeneri più frequenti, rappresentanti varie fonti.

Anche se i dosaggi di screening sono diretti principalmente a individuare campioni che superano la soglia di intervento, il criterio per la determinazione dei tassi di falsi conformi è il livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa del metodo di conferma.

5.7.7. I campioni dello screening potenzialmente non conformi sono sempre verificati con una nuova analisi completa del campione originale mediante un metodo analitico di conferma. Questi campioni possono anche essere utilizzati per valutare il tasso di risultati falsi non conformi. Per i metodi di screening, il tasso di risultati falsi non conformi è la frazione dei risultati confermati conformi dall'analisi di conferma, quando nello screening precedente il campione è stato dichiarato potenzialmente non conforme. La valutazione dei vantaggi del metodo di screening si basa sul confronto dei campioni falsi non conformi con il numero totale di campioni controllati. Tale tasso deve essere sufficientemente basso da rendere vantaggioso l'uso di uno strumento di screening.

5.7.8. In condizioni di validazione i metodi bioanalitici forniscono una valida indicazione del livello di TEQ, calcolato ed espresso in BEQ.

Anche per i metodi bioanalitici applicati in condizioni di ripetibilità, la  $RSD_i$  intralaboratorio è di norma inferiore rispetto al risultato ottenuto in condizioni di riproducibilità ( $RSD_R$ ).

## 6. Prescrizioni specifiche per i metodi GC-MS da rispettare a fini di screening o di conferma

6.1. *Differenze accettabili tra i risultati OMS-TEQ upperbound e lowerbound*

La differenza tra il livello upperbound e il livello lowerbound non è superiore al 20 % per la conferma del superamento dei livelli massimi o, ove opportuno, delle soglie di intervento.

## 6.2. *Controllo dei recuperi*

6.2.1. All'inizio del metodo di analisi, ad esempio prima dell'estrazione, sono aggiunti standard interni di PCDD/PCDF 2,3,7,8-clorosostituiti e marcati con  $^{13}\text{C}$  e standard interni di PCB diossina-simili marcati con  $^{13}\text{C}$  per validare la procedura di analisi. È aggiunto almeno un congenere per ciascuno dei gruppi omologhi da tetra a octaclorati di PCDD/PCDF e almeno un congenere per ciascuno dei gruppi omologhi di PCB diossina-simili (in alternativa, almeno un congenere per ciascuna funzione di registrazione di ioni selezionati tramite spettrometria di massa utilizzata per il monitoraggio di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili). Nel caso dei metodi di conferma, sono utilizzati tutti i 17 standard interni di PCDD/PCDF 2,3,7,8-sostituiti marcati con  $^{13}\text{C}$  e tutti i 12 standard interni di PCB diossina-simili marcati con  $^{13}\text{C}$ .

6.2.2. Sono inoltre determinati i fattori di risposta relativa per i congeneri ai quali non è aggiunto alcun analogo marcato con  $^{13}\text{C}$ , utilizzando appropriate soluzioni di calibrazione.

6.2.3. Per gli alimenti per animali di origine vegetale e per gli alimenti per animali di origine animale con tenore di grassi inferiore al 10 %, l'aggiunta di standard interni prima dell'estrazione è obbligatoria. Per gli alimenti per animali di origine animale con tenore di grassi superiore al 10 %, gli standard interni possono essere aggiunti prima o dopo l'estrazione dei grassi. È effettuata un'adeguata validazione dell'efficienza dell'estrazione, a seconda della fase in cui sono introdotti gli standard interni.

6.2.4. Prima dell'analisi GC-MS sono aggiunti 1 o 2 standard di recupero (surrogato/i).

6.2.5. È necessario il controllo del recupero. Per i metodi di conferma, i recuperi dei singoli standard interni sono compresi tra il 60 % e il 120 %. Recuperi inferiori o superiori per singoli congeneri, in particolare per alcune dibenzo-p-diossine e alcuni dibenzofurani epta e octaclorati, sono accettabili, purché il loro contributo al valore di TEQ non superi il 10 % del valore totale di TEQ (in base alla somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili). Per i metodi di screening GC-MS i recuperi sono compresi tra il 30 % e il 140 %.

## 6.3. *Rimozione delle sostanze interferenti*

— La separazione di PCDD/PCDF dai composti clorurati interferenti, quali i PCB non diossina-simili e gli eteri clorurati di difenile, è effettuata mediante appropriate tecniche cromatografiche (di preferenza con una colonna di florisil, di allumina e/o di carbone).

— La separazione gascromatografica degli isomeri è < 25 % da picco a picco tra 1,2,3,4,7,8-HxCDF e 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

## 6.4. *Calibrazione con curva standard*

Il range della curva di calibrazione copre il corrispondente range del livello massimo o delle soglie di intervento.

## 6.5. *Criteri specifici per i metodi di conferma*

— Per la GC-HRMS:

nella HRMS la risoluzione dovrà essere generalmente superiore o pari a 10 000 per tutto il range di massa al 10 % della valle.

Rispetto di ulteriori criteri di identificazione e di conferma quali definiti in norme riconosciute a livello internazionale come, ad esempio, la norma EN 16215:2012 (Alimenti per animali — Determinazione di diossine e PCB diossina-simili mediante GC-HRMS e di PCB indicatori mediante GC-HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1688 riveduti.

— Per la GC-MS/MS:

monitoraggio di almeno 2 ioni precursori specifici, ciascuno con un corrispondente ione, prodotto dalla transizione per tutti gli analiti marcati e non marcati nel campo di applicazione dell'analisi.

Tolleranza massima consentita per intensità di ioni relative del  $\pm 15$  % per gli ioni prodotti dalla transizione selezionati rispetto a valori calcolati o misurati (media delle calibrazioni standard), applicando condizioni di MS/MS identiche, in particolare l'energia di collisione e la pressione del gas di collisione, per ciascuna transizione di un dato analita.

La risoluzione per ciascun quadrupolo è pari o migliore rispetto alla risoluzione di massa unitaria (risoluzione di massa unitaria: risoluzione sufficiente a distinguere due picchi di una unità di massa) al fine di minimizzare eventuali interferenze sull'analita di interesse.

Rispetto di ulteriori criteri quali definiti in norme riconosciute a livello internazionale come, ad esempio, la norma EN 16215:2012 (Alimenti per animali — Determinazione di diossine e PCB diossina-simili mediante GC-HRMS e di PCB indicatori mediante GC-HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1688 riveduti, fatto salvo l'obbligo di impiegare la GC-HRMS.

## 7. Prescrizioni specifiche per i metodi bioanalitici

I metodi bioanalitici sono metodi basati su principi biologici come i dosaggi cellulari, i dosaggi di recettori o gli immunodosaggi. Le prescrizioni figuranti in questo punto 7 si riferiscono ai metodi bioanalitici in generale.

Un metodo di screening classifica in via di principio un campione come conforme o sospetto non conforme. Per questo, il livello di BEQ calcolato è comparato al valore di cut-off (cfr. punto 7.3). I campioni al di sotto del valore di cut-off sono dichiarati conformi, i campioni uguali o superiori al valore di cut-off sono dichiarati sospetti non conformi e devono essere analizzati con un metodo di conferma. In pratica, un livello di BEQ corrispondente a due terzi del livello massimo può servire come valore di cut-off purché si garantisca un tasso di falsi conformi inferiore al 5 % e un tasso accettabile di risultati falsi non conformi. Con livelli massimi distinti per PCDD/PCDF e per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, il controllo della conformità dei campioni senza frazionamento richiede appropriati valori di cut-off dei biosaggi per i PCDD/PCDF. Per il controllo dei campioni che superano le soglie di intervento una percentuale appropriata della rispettiva soglia di intervento funge da valore di cut-off.

Se un livello indicativo è espresso in BEQ, i risultati dei campioni sono compresi nel working range e superano il limite di reporting (cfr. 7.1.1 e 7.1.6).

### 7.1. Valutazione della risposta al test

#### 7.1.1. Prescrizioni generali

— Nel calcolo delle concentrazioni a partire da una curva di calibrazione della TCDD, i valori all'estremo superiore della curva presenteranno una forte variazione [coefficiente di variazione (CV) elevato]. Il working range è costituito dalla zona in cui il CV è inferiore al 15 %. L'estremo inferiore del working range (limite di reporting) è inoltre fissato al di sopra dei bianchi di procedura almeno di un fattore tre. L'estremo superiore del working range è di norma rappresentato dal valore  $EC_{70}$  (70 % della concentrazione effettiva massima), ma è più basso se il CV è superiore al 15 % in questo range. Il working range è stabilito durante la validazione. I valori di cut-off (cfr. punto 7.3) si situano entro il working range.

— Le soluzioni standard e gli estratti dei campioni sono testati in triplo o almeno in doppio. Nel caso di uso di doppi, una soluzione standard o un estratto di controllo testati in quattro-sei pozzetti distribuiti sulla piastra producono una risposta o una concentrazione (possibile solo nel working range) in base a un CV < 15 %.

## 7.1.2. Calibrazione

### 7.1.2.1. Calibrazione con curva standard

- I livelli nei campioni sono stimati comparando la risposta al test a una curva di calibrazione della TCDD (o del PCB 126 o di una miscela standard PCDD/PCDF/PCB diossina-simili) per calcolare il livello BEQ nell'estratto e poi nel campione.
- Le curve di calibrazione contengono da 8 a 12 concentrazioni (almeno in doppio) con concentrazioni sufficienti nella parte inferiore della curva (working range). Particolare attenzione è prestata alla qualità del fit della curva nel working range. Il valore  $R^2$ , come tale, è di scarsa o nessuna utilità nella stima della bontà del fit in regressione non lineare. Un migliore fit è ottenuto minimizzando la differenza tra i livelli calcolati e osservati nel working range della curva, ad esempio diminuendo la somma dei quadrati residui.
- Il livello stimato nell'estratto del campione è quindi corretto del livello BEQ calcolato per un campione bianco di matrice o solvente (per tener conto delle impurità provenienti dai solventi e dalle sostanze chimiche utilizzate) e del recupero apparente (calcolato a partire dal livello BEQ di idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello massimo o alla soglia di intervento). Per effettuare una correzione del recupero, il recupero apparente deve situarsi entro il range richiesto (cfr. punto 7.1.4). I campioni di riferimento utilizzati per la correzione del recupero sono conformi alle prescrizioni di cui al punto 7.2.

### 7.1.2.2. Calibrazione con campioni di riferimento

In alternativa, può essere utilizzata una curva di calibrazione preparata a partire da almeno quattro campioni di riferimento (cfr. punto 7.2.4): un bianco matrice, più tre campioni di riferimento a 0,5x, 1,0x e 2,0x il livello massimo o la soglia di intervento, il che rende superflua la correzione del bianco e del recupero se le proprietà della matrice dei campioni di riferimento corrispondono a quelle dei campioni incogniti. In tal caso, la risposta al test corrispondente a due terzi del livello massimo (cfr. punto 7.3) può essere calcolata direttamente a partire da questi campioni e utilizzata come valore di cut-off. Per il controllo dei campioni che superano le soglie di intervento il valore di cut-off è costituito da una percentuale appropriata di queste soglie di intervento.

## 7.1.3. Determinazione separata di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili

Gli estratti possono essere suddivisi in frazioni contenenti PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, il che permette un'identificazione separata dei livelli di TEQ (in BEQ) di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili. Per valutare i risultati per la frazione contenente PCB diossina-simili è da utilizzarsi di preferenza una curva di calibrazione standard del PCB 126.

## 7.1.4. Recuperi apparenti del biodosaggio

Il «recupero apparente del biodosaggio» è calcolato a partire da idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello massimo o alla soglia di intervento ed espresso in percentuale del livello BEQ rispetto al livello di TEQ. A seconda del tipo di dosaggio e di TEF <sup>(1)</sup> utilizzati, le differenze tra fattori TEF e REP per i PCB diossina-simili possono causare per i PCB diossina-simili recuperi apparenti bassi rispetto ai PCDD/PCDF. Pertanto, se è eseguita una determinazione separata di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, i recuperi apparenti del biodosaggio sono: per i PCB diossina-simili dal 20 % al 60 %, per i PCDD/PCDF dal 50 % al 130 % (i range valgono per la curva di calibrazione della TCDD). Poiché il contributo dei PCB diossina-simili alla somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili può variare secondo le matrici e i campioni, i recuperi apparenti del biodosaggio per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili riflettono questi range e sono compresi tra il 30 % e il 130 %. Ogni modifica sostanziale dei valori TEF per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nella legislazione dell'Unione richiede la revisione di questi range.

<sup>(1)</sup> Le attuali prescrizioni si basano sui TEF pubblicati in: M. Van den Berg et al., Toxicol. Sci. 93 (2), 223-241 (2006).

### 7.1.5. Controllo dei recuperi per il clean-up

La perdita di composti durante il clean-up è verificata durante la validazione. Un campione bianco spiked con una miscela dei diversi congeneri è sottoposto a clean-up (almeno  $n = 3$ ) e il recupero e la variabilità sono verificati mediante un metodo di conferma. Il recupero è compreso tra 60 % e 120 %, in particolare per i congeneri che contribuiscono per più del 10 % al livello di TEQ presente in varie miscele.

### 7.1.6. Limite di reporting

Per i livelli BEQ un limite di reporting è determinato a partire dai corrispondenti campioni matrice implicanti pattern di congeneri tipici, ma non dalla curva di calibrazione degli standard, data la scarsa precisione nel range inferiore della curva. Occorre tenere conto degli effetti dell'estrazione e del clean-up. Il limite di reporting è fissato al di sopra dei bianchi di procedura di almeno un fattore tre.

## 7.2. *Uso di campioni di riferimento*

7.2.1. I campioni di riferimento rappresentano la matrice campione, i pattern di congeneri e i range di concentrazione per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili attorno al livello massimo o alla soglia di intervento.

7.2.2. Un bianco matrice e, se questo non è possibile, un bianco di procedura e un campione di riferimento al livello massimo o alla soglia di intervento sono inclusi in ciascuna serie di test. Questi campioni sono estratti e testati nello stesso momento in condizioni identiche. Il campione di riferimento presenta una risposta notevolmente più elevata del campione in bianco, in modo da garantire l'idoneità del test. Questi campioni possono essere utilizzati per le correzioni del bianco e del recupero.

7.2.3. I campioni di riferimento scelti per effettuare una correzione del recupero sono rappresentativi dei campioni da analizzare, il che significa che i pattern di congeneri non possono portare a una sottostima dei livelli.

7.2.4. Campioni di riferimento supplementari, per esempio a 0,5x e 2x il livello massimo o la soglia di intervento possono essere inclusi per dimostrare la performance adeguata del test nel range di interesse per il controllo del livello massimo o della soglia di intervento. Combinati, questi campioni possono essere utilizzati per calcolare i livelli BEQ nei campioni da analizzare (cfr. punto 7.1.2.2).

## 7.3. *Determinazione dei valori di cut-off*

È stabilito il rapporto tra i risultati bioanalitici in BEQ e i risultati del metodo di conferma in TEQ, ad esempio mediante esperimenti di calibrazione matrix-matched, con campioni di riferimento spiked a 0, 0,5x, 1x e 2x l'LM, con 6 ripetizioni ad ogni livello ( $n = 24$ ). I fattori di correzione (bianco e recupero) possono essere stimati in base a questo rapporto, ma sono controllati come stabilito al punto 7.2.2.

Sono stabiliti valori di cut-off per le decisioni sulla conformità del campione ai livelli massimi o per il controllo delle soglie di intervento, se pertinente, con i rispettivi livelli massimi o le rispettive soglie di intervento fissati singolarmente per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili o per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili. Essi sono rappresentati dall'endpoint *inferiore* della distribuzione dei risultati bioanalitici (corretti del bianco e del recupero) corrispondente al limite di decisione del metodo di conferma in base ad un livello di fiducia del 95 %, implicante un tasso di falsi conformi  $< 5$  % e a una  $RSD_R < 25$  %. Il limite di decisione del metodo di conferma è il livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa.

Il valore di cut-off (in BEQ) può essere calcolato in uno dei modi indicati ai punti 7.3.1, 7.3.2 e 7.3.3. (cfr. figura 1).

7.3.1. Uso della banda *inferiore* dell'intervallo di predizione del 95 % al limite di decisione del metodo di conferma

$$\text{Valore di cut-off} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

dove:

$\text{BEQ}_{\text{DL}}$  BEQ corrispondente al limite di decisione del metodo di conferma, ossia al livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura estesa

$s_{y,x}$  deviazione standard residua

$t_{\alpha, f=m-2}$  fattore di Student ( $\alpha = 5\%$ ,  $f =$  gradi di libertà, un lato)

$m$  numero totale dei punti di calibrazione (indice  $j$ )

$n$  numero di ripetizioni ad ogni livello

$x_i$  concentrazione del campione (in TEQ) del punto di calibrazione  $i$  determinato con un metodo di conferma

$\bar{x}$  media delle concentrazioni (in TEQ) di tutti i campioni di calibrazione

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \text{ parametro somma dei quadrati, } i = \text{indice per il punto di calibrazione } i$$

7.3.2. Calcolo a partire dai risultati bioanalitici (corretti del bianco e del recupero) di analisi multiple di campioni ( $n \geq 6$ ) contaminati al limite di decisione del metodo di conferma, come endpoint *inferiore* della distribuzione dei dati al corrispondente valore BEQ medio:

$$\text{valore di cut-off} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

dove:

$\text{SD}_R$  deviazione standard dei risultati del biosaggio a  $\text{BEQ}_{\text{DL}}$ , misurata in condizioni di riproducibilità in laboratorio

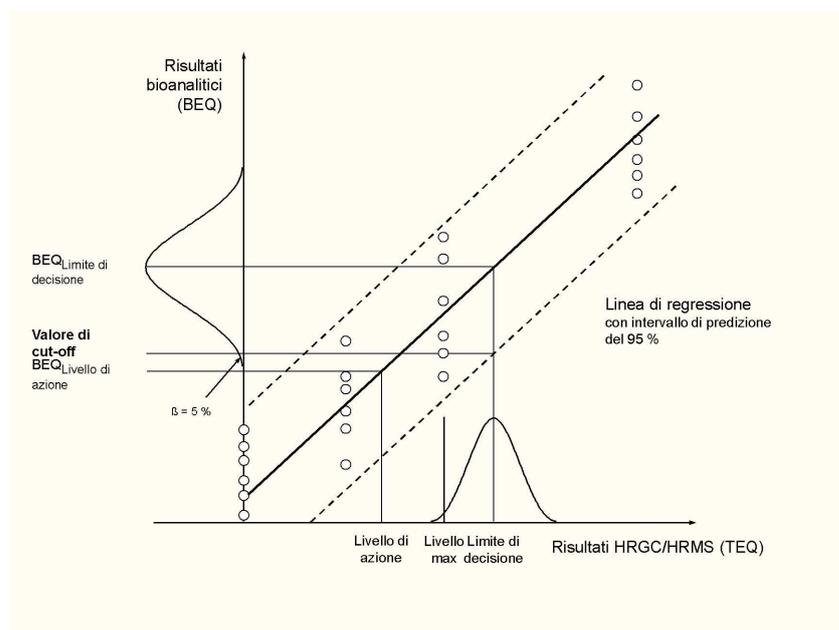
7.3.3. Calcolo come valore medio dei risultati bioanalitici (in BEQ, corretto del bianco e del recupero) a partire dall'analisi multipla di campioni ( $n \geq 6$ ) contaminati a due terzi del livello massimo o della soglia di intervento, sulla base dell'osservazione che questo livello sarà prossimo al valore di cut-off determinato come indicato ai punti 7.3.1 o 7.3.2.

Calcolo dei valori di cut-off in base a un livello di fiducia del 95 % implicante un tasso di falsi conformi  $< 5\%$ , e una  $\text{RSD}_R < 25\%$ :

1) a partire dalla banda *inferiore* dell'intervallo di predizione del 95 % al limite di decisione del metodo di conferma,

2) da analisi multiple di campioni ( $n \geq 6$ ) contaminati al limite di decisione del metodo di conferma, come endpoint *inferiore* della distribuzione dei dati (rappresentata nella figura da una curva a campana) al corrispondente valore BEQ medio.

Figura 1



#### 7.3.4. Restrizioni dei valori di cut-off

I valori di cut-off espressi in BEQ calcolati a partire dalla  $RSD_R$  ottenuta durante la validazione utilizzando un numero limitato di campioni con differenti matrici/pattern di congeneri possono essere superiori ai livelli massimi o alle soglie di intervento espressi in TEQ in quanto la precisione è maggiore di quella raggiungibile in routine quando deve essere controllato uno spettro sconosciuto di possibili pattern di congeneri. In tali casi, i valori di cut-off sono calcolati a partire da una  $RSD_R = 25\%$ , o sono preferiti i due terzi del livello massimo o della soglia di intervento.

#### 7.4. Caratteristiche di performance

- 7.4.1. Poiché nei metodi bioanalitici non possono essere utilizzati standard interni, sono eseguiti test di ripetibilità dei metodi bioanalitici per ottenere informazioni sulla deviazione standard nelle e tra le serie di test. La ripetibilità è inferiore al 20% e la riproducibilità in laboratorio inferiore al 25%, in base ai livelli calcolati in BEQ dopo correzione del bianco e del recupero.
- 7.4.2. Nel processo di validazione il test permette di distinguere tra un campione in bianco e un livello al valore di cut-off, consentendo l'identificazione dei campioni al di sopra del corrispondente valore di cut-off (cfr. punto 7.1.2).
- 7.4.3. Sono definiti i composti bersaglio, le possibili interferenze e i livelli massimi tollerabili di bianco.
- 7.4.4. La deviazione standard percentuale nella risposta o nella concentrazione calcolata a partire dalla risposta (possibile solo nel working range) di una determinazione triplice di un estratto del campione non può essere superiore al 15%.
- 7.4.5. I risultati non corretti dei campioni di riferimento, espressi in BEQ (bianco e al livello massimo o alla soglia di intervento), sono utilizzati per valutare la performance del metodo bioanalitico su un periodo di tempo costante.
- 7.4.6. I diagrammi di controllo qualità per i bianchi di procedura e ciascun tipo di campione di riferimento sono registrati e controllati per assicurare che la performance analitica sia conforme alle prescrizioni, in particolare per i bianchi di procedura per quanto concerne la differenza minima richiesta rispetto all'estremo inferiore del working range e per i campioni di riferimento per quanto riguarda la riproducibilità in laboratorio. I bianchi di procedura sono controllati in modo da evitare risultati falsi conformi quando sono sottratti.

- 7.4.7. I risultati dei metodi di conferma dei campioni sospetti e del 2-10 % dei campioni conformi (almeno 20 campioni per matrice) sono raccolti e utilizzati per valutare la performance del metodo di screening e il rapporto tra BEQ e TEQ. Questa base di dati può essere utilizzata per la rivalutazione dei valori di cut-off applicabili ai campioni di routine per le matrici validate.
- 7.4.8. La buona performance del metodo può essere dimostrata anche con la partecipazione a ring trial. Anche i risultati dei campioni analizzati in ring trial, che coprono un range di concentrazione fino a, per esempio, due volte il limite massimo, possono essere inclusi nella valutazione del tasso di falsi conformi, se il laboratorio è in grado di dimostrare la sua buona performance. I campioni coprono i pattern di congeneri più frequenti, rappresentanti varie fonti.
- 7.4.9. Durante gli incidenti i valori di cut-off possono essere rivalutati, tenendo conto della matrice e dei pattern di congeneri specifici del singolo incidente.

## 8. Reporting dei risultati

### 8.1. Metodi di conferma

- 8.1.1. I risultati dell'analisi contengono i livelli dei singoli congeneri di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili e i valori di TEQ sono espressi come lowerbound, upperbound e mediumbound, per includere un massimo di informazione nel reporting dei risultati e permettere così l'interpretazione dei risultati secondo prescrizioni specifiche.
- 8.1.2. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.
- 8.1.3. I recuperi dei singoli standard interni sono indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 6.2.5, se il livello massimo è superato (in questo caso, i recuperi per una delle due doppie analisi) e in altri casi su richiesta.
- 8.1.4. Poiché nel decidere in merito alla conformità di un campione occorre tener conto dell'incertezza di misura estesa, è indicato anche questo parametro. I risultati analitici sono pertanto espressi come  $x \pm U$ , dove  $x$  è il risultato analitico e  $U$  l'incertezza di misura estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa. Nel caso di una determinazione separata di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, la somma dell'incertezza estesa stimata dei risultati analitici separati di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili è utilizzata per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.
- 8.1.5. I risultati sono espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei livelli massimi stabiliti dalla direttiva 2002/32/CE.

### 8.2. Metodi di screening bioanalitici

- 8.2.1. Il risultato dello screening è espresso come «conforme» o «sospetto non conforme» («sospetto»).
- 8.2.2. Inoltre, per PCDD/PCDF e/o PCB diossina-simili può essere dato un risultato indicativo espresso in BEQ e non in TEQ.
- 8.2.3. I campioni con una risposta al di sotto del limite di reporting sono espressi come «inferiori al limite di reporting». I campioni con una risposta al di sopra del working range sono indicati come «superiori al working range» e il livello corrispondente all'estremo superiore del working range è espresso in BEQ.
- 8.2.4. Per ciascun tipo di matrice del campione il rapporto menziona il livello massimo o la soglia di intervento su cui si basa la valutazione.
- 8.2.5. Il rapporto menziona il tipo di test applicato, il principio base del test e il tipo di calibrazione.

- 8.2.6. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.
- 8.2.7. In caso di campioni sospetti non conformi, il rapporto deve includere una nota sulle azioni da intraprendere. La concentrazione di PCDD/PCDF e la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nei campioni con livelli elevati deve essere determinata/confermata mediante un metodo di conferma.
- 8.2.8. I risultati non conformi sono espressi solo sulla base di un'analisi di conferma
- 8.3. *Metodi di screening fisico-chimici*
- 8.3.1. Il risultato dello screening è espresso come «conforme» o «sospetto non conforme» («sospetto»).
- 8.3.2. Per ciascun tipo di matrice del campione il rapporto menziona il livello massimo o la soglia di intervento su cui si basa la valutazione.
- 8.3.3. Possono inoltre essere indicati i livelli dei singoli congeneri di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili e i valori di TEQ espressi come lowerbound, upperbound e mediumbound. I risultati sono espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei livelli massimi stabiliti dalla direttiva 2002/32/CE.
- 8.3.4. I recuperi dei singoli standard interni sono indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 6.2.5, se il livello massimo è superato (in questo caso, i recuperi per una delle due doppie analisi) e in altri casi su richiesta.
- 8.3.5. Il rapporto menziona il metodo GC-MS applicato.
- 8.3.6. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.
- 8.3.7. In caso di campioni sospetti non conformi, il rapporto deve includere una nota sulle azioni da intraprendere. La concentrazione di PCDD/PCDF e la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nei campioni con livelli elevati deve essere determinata/confermata mediante un metodo di conferma.
- 8.3.8. La non conformità può essere decisa solo a seguito di un'analisi di conferma.

### CAPO III

#### ***Preparazione dei campioni e prescrizioni per i metodi di analisi impiegati nel controllo ufficiale dei livelli di pcb non diossina-simili negli alimenti per animali***

##### **1. Campo d'applicazione**

Le prescrizioni di cui al presente capo si applicano alle analisi degli alimenti per animali effettuate ai fini del controllo ufficiale dei livelli di PCB non diossina-simili e per quanto riguarda la preparazione dei campioni e le prescrizioni analitiche per altre finalità di legge, che comprendono i controlli effettuati dagli operatori del settore alimentare per garantire la conformità con le disposizioni del regolamento (CE) n. 1831/2005.

##### **2. Metodi di rilevazione applicabili**

Gascromatografia con rilevazione a cattura di elettroni (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS o metodi equivalenti.

### 3. **Identificazione e conferma degli analiti di interesse**

- 3.1. Tempo di ritenzione relativo rispetto agli standard interni o agli standard di riferimento (deviazione accettabile di +/- 0,25 %).
- 3.2. Separazione gascromatografica dei PCB non diossina-simili dalle sostanze interferenti, specie PCB coeluenti, in particolare se i livelli dei campioni si situano entro i limiti legali e la non conformità deve essere confermata <sup>(1)</sup>.
- 3.3. Prescrizioni per le tecniche GC-MS

Monitoraggio di almeno il seguente numero di ioni molecolari o ioni caratteristici del gruppo molecolare:

- a) due ioni specifici per HRMS;
- b) tre ioni specifici per LRMS;
- c) due ioni precursori specifici, ciascuno con un corrispondente ione specifico prodotto dalla transizione per la MS-MS.

Tolleranze massime ammesse per i rapporti di abbondanza per i frammenti di massa selezionati:

deviazione relativa del rapporto di abbondanza dei frammenti di massa selezionati rispetto all'abbondanza teorica o standard di calibrazione per lo ione bersaglio (lo ione monitorato più abbondante) e gli ioni qualificatori:  $\pm 15\%$

- 3.4. Prescrizioni per le tecniche di GC-ECD

Conferma dei risultati che oltrepassano il livello massimo con due colonne GC con fasi stazionarie di diversa polarità.

### 4. **Dimostrazione della performance del metodo**

La performance del metodo è validata nel range del livello massimo (da 0,5 a 2 volte il livello massimo) con un coefficiente di variazione accettabile per le analisi ripetute (cfr. prescrizioni per la precisione intermedia al punto 9).

### 5. **Limite di quantificazione**

La somma degli LOQ <sup>(2)</sup> dei PCB non diossina-simili non è superiore a un terzo del livello massimo <sup>(3)</sup>.

### 6. **Controllo di qualità**

Controlli in bianco regolari, analisi di campioni spiked, campioni di controllo di qualità, partecipazione a studi interlaboratorio su matrici rilevanti.

### 7. **Controllo dei recuperi**

- 7.1. Sono utilizzati idonei standard interni con proprietà fisico-chimiche comparabili agli analiti di interesse.

<sup>(1)</sup> I congeneri che spesso coeluiscono sono per esempio PCB 28/31, PCB 52/69 e PCB 138/163/164. Per la GC-MS sono considerate anche le possibili interferenze di frammenti di congeneri più altamente clorurati.

<sup>(2)</sup> Ove applicabili, sono seguiti i principi descritti nel documento «Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food» ([http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed\\_en](http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en)).

<sup>(3)</sup> È altamente raccomandato un contributo del livello del bianco reagente inferiore al livello di un contaminante in un campione. È compito del laboratorio controllare la variazione dei livelli del bianco, in particolare se sono sottratti.

- 7.2. Aggiunta di standard interni:  
aggiunta ai prodotti (prima dell'estrazione e del processo di clean-up).
- 7.3. Prescrizioni per i metodi che utilizzano tutti i sei congeneri di PCB non diossina-simili marcati con isotopi:
- correzione dei risultati in funzione dei recuperi degli standard interni;
  - recuperi degli standard interni marcati con isotopi compresi tra il 60 % e 120 %;
  - recuperi inferiori o superiori per i singoli congeneri con un contributo alla somma dei PCB non diossina-simili inferiore al 10 % sono accettabili.
- 7.4. Prescrizioni per i metodi che non utilizzano tutti i sei standard interni marcati con isotopi o utilizzano altri standard interni:
- controllo del recupero degli standard interni per ogni campione;
  - recuperi degli standard interni compresi tra il 60 % e il 120 %;
  - correzione dei risultati in funzione dei recuperi degli standard interni.
- 7.5. I recuperi dei congeneri non marcati sono controllati per mezzo di campioni spiked o campioni di controllo qualità con concentrazioni nel range del livello massimo. I recuperi per questi congeneri sono considerati accettabili se sono compresi tra il 60 % e il 120 %.

## 8. Prescrizioni per i laboratori

Come prescritto dal regolamento (CE) n. 882/2004, i laboratori sono accreditati da un organismo riconosciuto operante in conformità alla Guida ISO 58, per garantire che alle loro analisi sia applicata l'assicurazione qualità. I laboratori sono accreditati in base alla norma EN ISO/IEC 17025. Ove applicabili, sono inoltre seguiti i principi descritti negli orientamenti tecnici per la stima dell'incertezza di misura e dei limiti di quantificazione per l'analisi dei PCB <sup>(1)</sup>.

## 9. Caratteristiche di performance: criteri per la somma dei PCB non diossina-simili al livello massimo

	Spettrometria di massa con diluizione isotopica <sup>(1)</sup>	Altre tecniche
Esattezza	da - 20 a + 20 %	da - 30 a + 30 %
Precisione intermedia (RSD%)	≤ 15 %	≤ 20 %
Differenza tra calcolo upperbound e lowerbound	≤ 20 %	≤ 20 %

<sup>(1)</sup> È richiesto l'uso di tutti e sei gli analoghi marcati con <sup>13</sup>C come standard interni.

## 10. Reporting dei risultati

- 10.1. I risultati dell'analisi contengono i livelli dei singoli PCB non diossina-simili e la somma di tali congeneri di PCB espressa come lowerbound, upperbound e mediuibound, per includere un massimo di informazione nel reporting dei risultati e permettere così l'interpretazione dei risultati secondo prescrizioni specifiche.

<sup>(1)</sup> Le attuali prescrizioni si basano sui TEF pubblicati in: M. Van den Berg et al., Toxicol. Sci. 93 (2), 223-241 (2006).

- 10.2. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione dei PCB.
  - 10.3. I recuperi dei singoli standard interni sono indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 7, se il livello massimo è superato e in altri casi su richiesta.
  - 10.4. Poiché nel decidere in merito alla conformità di un campione occorre tener conto dell'incertezza di misura estesa, è indicato anche tale parametro. I risultati analitici sono pertanto espressi come  $x \pm U$ , dove  $x$  è il risultato analitico e  $U$  l'incertezza di misura estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di fiducia del 95 % circa.
  - 10.5. I risultati sono espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei livelli massimi stabiliti dalla direttiva 2002/32/CE.»
-