Este documento es un instrumento de documentación y no compromete la responsabilidad de las instituciones

►B

DIRECTIVA 2002/69/CE DE LA COMISIÓN

de ►C1 30 de julio de 2002 ◄

por la que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial de las dioxinas y la determinación de PCB similares a las dioxinas en los productos alimenticios

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(DO L 209 de 6.8.2002, p. 5)

Rectificada por:

►C1 Rectificación, DO L 252 de 20.9.2002, p. 40 (2002/69/CE)

▼B

DIRECTIVA 2002/69/CE DE LA COMISIÓN

de ►C1 30 de julio de 2002 ◄

por la que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial de las dioxinas y la determinación de PCB similares a las dioxinas en los productos alimenticios

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 85/591/CEE del Consejo, de 20 de diciembre de 1985, referente a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control de los productos destinados a la alimentación humana [1] ►C1 y, en particular, sus artículos 1 y 4, ◄

Considerando lo siguiente:

(1) El Reglamento (CE) nº 466/2001 de la Comisión [2], cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 563/2002 [3], y modificado por el Reglamento (CE) nº 2375/2001 del Consejo [4], establece los niveles máximos de dioxinas y furanos en determinados productos alimenticios.

(2) La Directiva 89/397/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1989, relativa al control oficial de los productos alimenticios [5], establece los principios generales para la realización del control de dichos productos. La Directiva 93/99/CEE del Consejo, de 29 de octubre de 1993, sobre medidas adicionales relativas al control oficial de los productos alimenticios [6], introduce un sistema de normas de calidad para los laboratorios a los que los Estados miembros han confiado el control oficial de los productos alimenticios.

(3) La Directiva 85/591/CEE estableció criterios generales para los métodos de muestreo y de análisis. No obstante, en algunos casos es necesario establecer criterios y/o requisitos más específicos que debería cumplir el método de análisis con el fin de garantizar que los laboratorios utilizan métodos de análisis con niveles de eficacia comparables.

(4) Las disposiciones que se refieren a la toma de muestras y a los métodos de análisis se han elaborado basándose en los conocimientos actuales y podrán adaptarse a fin de tener en cuenta la evolución de los conocimientos científicos y tecnológicos.

(5) Las disposiciones establecidas en la presente Directiva se refieren únicamente al muestreo y al análisis de las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas a efectos de la aplicación del Reglamento (CE) nº 466/2001 y no afectan a la estrategia de muestreo ni a los niveles y frecuencia de muestreo especificados en los anexos III y IV de la Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos, por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE [7]. Dichas disposiciones tampoco afectan a los criterios de selección relativos a la toma de muestras, establecidos en la Decisión 98/179/CE de la Comisión, de 23 de febrero de 1998, por la que se fijan normas específicas relativas a la toma de muestras oficiales

[1] DO L 372 de 31.12.1985, p. 50.
[2] DO L 77 de 16.3.2001, p. 1.
[3] DO L 86 de 3.4.2002, p. 5.
[4] DO L 321 de 6.12.2001, p. 1.
[5] DO L 186 de 30.6.1989, p. 23.
[6] DO L 290 de 24.11.1993, p. 14.
[7] DO L 125 de 23.5.1996, p. 10.

▼B

para el control de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos [1].

(6) Deberá adoptarse un enfoque activo que permita obtener datos completos y fiables sobre la presencia de PCB similares a las dioxinas en los productos alimenticios. Se considera, por tanto, necesario establecer requisitos para los métodos de análisis utilizados en la determinación de la presencia de PCB similares a las dioxinas en los productos alimenticios.

(7) Podría utilizarse un método analítico de cribado de gran eficacia, cuya validez se haya demostrado y sea ampliamente aceptable, para seleccionar las muestras con niveles significativos de dioxinas. Posteriormente, los niveles de dioxinas en estas muestras deberán determinarse mediante un método analítico de confirmación. Se considera, por tanto, necesario establecer requisitos estrictos para los métodos analíticos de confirmación y requisitos mínimos para el método de cribado.

(8) Las medidas previstas en la presente Directiva se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

Los Estados miembros deberán garantizar que la toma de muestras a fines del control oficial de los niveles de dioxinas y furanos y la determinación de los niveles de PCB similares a las dioxinas en los productos alimenticios se realiza conforme a los métodos descritos en el anexo I.

Artículo 2

Los Estados miembros deberán garantizar que la preparación de las muestras y los métodos de análisis utilizados para el control oficial de los niveles de dioxinas y furanos y la determinación de los niveles de PCB similares a las dioxinas en los productos alimenticios cumplen los criterios establecidos en el anexo II.

Artículo 3

Los Estados miembros pondrán en vigor las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a la presente Directiva, a más tardar el 28 de febrero de 2003. Informarán inmediatamente de ello a la Comisión.

Cuando los Estados miembros adopten dichas disposiciones, éstas harán referencia a la presente Directiva o irán acompañadas de dicha referencia en su publicación oficial. Los Estados miembros establecerán las modalidades de la mencionada referencia.

Artículo 4

La presente Directiva entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.

Artículo 5

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

[1] DO L 65 de 5.3.1998, p. 31.

▼B

ANEXO I

MÉTODOS DE MUESTREO PARA EL CONTROL OFICIAL DE LOS NIVELES DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) Y LA DETERMINACIÓN DE PCB SIMILARES A LAS DIOXINAS EN DETERMINADOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS

1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Las muestras destinadas al control oficial de los niveles de contenido de dioxinas (PCDD/PCDF), así como a la determinación del contenido de PCB ([1]) similares a las dioxinas en los productos alimenticios, se tomarán de conformidad con los métodos descritos a continuación. Las muestras globales así obtenidas se considerarán representativas de los lotes o sublotes de los que se obtengan. El cumplimiento de los niveles máximos establecidos en el Reglamento (CE) nº 466/2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, se determinará en función de los niveles hallados en las muestras de laboratorio.

([1]) Cuadro FET fijado por la OMS a fines de la evaluación del riesgo para la salud humana, basado en las conclusiones de la reunión de la OMS celebrada en Estocolmo (Suecia) del 15 al 18 de junio de 1997 [Van den Berg y otros., (1998). Factores de equivalencia tóxica (FET) para los PCB, PCDD y PCDF en seres humanos y animales. Environmental Health Perspectives, 106(12), 775].

Congéneres	Valor FET
Dibenzo-p-dioxinas («PCDD»)	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0001
Dibenzofuranos («PCDF»)	
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,0001
PCB «similares a las dioxinas» **PCB no-orto + PCB mono-orto**	
PCB no-orto	
PCB 77	0,0001
PCB 81	0,0001
PCB 126	0,1
PCB 169	0,01
PCB mono-orto	
PCB 105	0,0001
PCB 114	0,0005
PCB 118	0,0001
PCB 123	0,0001
PCB 156	0,0005
PCB 157	0,0005
PCB 167	0,00001
PCB 189	0,0001

Abreviaturas utulizadas: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = octo; CDD = clorodibenzodioxina; CDF = clorobibenzofurano; CB = clorobifenilo.

▼B

2. **Definiciones**

Lote: cantidad identificable de alimento entregada en una misma vez y que presenta, a juicio del agente responsable, características comunes, tales como el origen, la variedad, el tipo de embalaje, el envasador, el expedidor o el etiquetado. En el caso del pescado y de los productos pesqueros también deberá ser comparable su tamaño.

«Sublote»: parte de un lote más grande designada para aplicar sobre ella el método de toma de muestras. Cada sublote deberá estar separado físicamente y ser identificable.

«Muestra elemental»: cantidad de material tomado en un único lugar del lote o sublote.

«Muestra global»: el total combinado de todas las muestras elementales tomadas del lote o sublote.

«Muestra de laboratorio»: una parte/cantidad representativa de la muestra global destinada al laboratorio.

3. **Disposiciones generales**

3.1. *Personal*

La toma de muestras deberá ser efectuada por una persona cualificada autorizada a tal efecto, según especifique el Estado miembro.

3.2. *Muestreo del producto*

Todo lote para analizar será objeto de un muestreo separado.

3.3. *Precauciones*

Durante el muestreo y la preparación de las muestras de laboratorio, deberán tomarse precauciones con el fin de evitar toda alteración que pueda modificar el contenido en dioxinas y PCB similares a las dioxinas, o afectar a los análisis o a la representatividad de la muestra global.

3.4. *Muestras elementales*

En la medida de lo posible, las muestras elementales se tomarán en distintos puntos del lote o sublote. Toda excepción a esta norma deberá señalarse en el acta contemplada en el punto 3.8.

3.5. *Preparación de la muestra global*

La muestra global se obtiene por mezcla de todas las muestras elementales. Deberá pesar al menos 1 kg, a menos que no sea posible, por ejemplo, cuando sólo se haya tomado muestra de un envase.

3.6. *Subdivisión de la muestra global en muestras de laboratorio con fines sancionadores, comerciales o de arbitraje*

Las muestras de laboratorio con eventuales efectos sancionadores, comerciales o de arbitraje se tomarán de la muestra global homogeneizada, excepto si ello se opusiera a las normas de los Estados miembros en materia de muestreo. El tamaño de las muestras de laboratorio susceptibles de servir a efectos sancionadores será suficiente para que puedan hacerse al menos dos análisis.

3.7. *Acondicionamiento y envío de las muestras globales y de laboratorio*

Cada muestra global y cada muestra de laboratorio deberá colocarse en un recipiente limpio, de material inerte, que ofrezca protección adecuada contra todo factor de contaminación, contra la pérdida de analitos por adsorción a la pared interna del contenedor y contra todo daño que pudiera ocasionar el transporte. Han de tomarse también todas las precauciones necesarias para evitar cualquier modificación de la composición de las muestras globales y de laboratorio que pudiera ocurrir durante el transporte o el almacenamiento.

3.8. *Cierre y etiquetado de las muestras globales y de laboratorio*

Cada muestra tomada para su uso oficial se sellará en el lugar del muestreo y se identificará según las disposiciones vigentes en los Estados miembros. Para cada toma de muestras, deberá establecerse un acta de muestreo que permita identificar sin ambigüedad el lote e identificar la fecha y el lugar

▼B

del muestreo, así como toda información adicional que pueda resultar útil al analista.

4. **Planes de muestreo**

El método de muestreo utilizado garantizará que la muestra global sea representativa del lote que vaya a controlarse.

Número de muestras elementales

En el caso de la leche y los aceites, para los que se supone una distribución homogénea de los contaminantes en cuestión en un lote determinado, bastará con tomar tres muestras elementales para cada lote que forme la muestra global. Deberá indicarse el número de lote. Para los demás productos, el número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote será el indicado en el cuadro 1.

El peso de la muestra global, que incluye todas las muestras elementales, deberá ser de al menos 1 kg. (véase el punto 3.5). Las muestras elementales serán de un peso similar. El peso de una muestra elemental deberá ser de al menos 100 gramos, y depende del tamaño de las partículas del lote. Toda excepción a esta norma debe señalarse en el acta contemplada en el punto 3.8. Con arreglo a lo dispuesto en la Decisión 97/747/CE de la Comisión, de 27 de octubre de 1997, por la que se fijan los niveles y frecuencias de muestreo previstas en la Directiva 96/23/CE del Consejo, con vistas al control de determinadas sustancias y sus residuos en determinados productos animales [1], el tamaño de la muestra para los huevos de gallina es de 12 huevos o más (para lotes a granel, así como para paquetes individuales, cuadros 1 y 2).

CUADRO 1

Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse del lote

Peso del lote (expresado en kg)	Número mínimo de muestras elementales que deben tomarse
< 50	3
50 a 500	5
> 500	10

Si el lote está formado por envases individuales, el número de envases que han de tomarse para formar la muestra global se indica en el cuadro 2.

CUADRO 2

Número de envases (muestras elementales) que deben tomarse para formar una muestra global si el lote está formado por envases individuales

Número de envases o unidades del lote	Número de envases o unidades que deben tomarse
1 a 25	1 envase o unidad
26 a 100	un 5 %, un mínimo de 2 envases o unidades
> 100	un 5 %, como máximo 10 envases o unidades

5. **Conformidad del lote o sublote con la especificación**

El laboratorio de control analizará la muestra de laboratorio destinada a medidas sancionadoras en dos análisis independientes en caso de que el resultado obtenido en el primer análisis sea menos de un 20 % inferior al nivel máximo o exceda de dicho nivel, y calculará la media de los resultados. El lote será aceptado si el resultado del primer análisis es más de

[1] DO L 303 de 6.11.1997, p. 12.

▼B

un 20 % inferior al nivel máximo o, cuando el análisis por duplicado es necesario, si la media se ajusta al contenido máximo respectivo establecido en el Reglamento (CE) nº 466/2001.

▼B

ANEXO II

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y REQUISITOS PARA LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS UTILIZADOS EN EL CONTROL OFICIAL DE LOS NIVELES DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) Y EN LA DETERMINACIÓN DE PCB SIMILARES A LAS DIOXINAS EN DETERMINADOS PRODUCTOS ALIMENTICIOS

1. **Objetivo y ámbito de aplicación**

Estos requisitos deberán aplicarse en el análisis de los productos alimenticios realizado a efectos del control oficial del nivel de dioxinas [dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF)] y de la determinación de PCB similares a las dioxinas.

El control de la presencia de dioxinas en los productos alimenticios puede efectuarse mediante una estrategia que incluya un método de detección selectiva a fin de seleccionar las muestras cuyo contenido en dioxinas y PCB similares a las dioxinas sea menos de un 30-40 % inferior al nivel considerado o exceda de dicho nivel. El contenido de dioxinas en esas muestras deberá determinarse/confirmarse mediante un método de confirmación.

Los métodos de detección selectiva son los que se utilizan para detectar la presencia de dioxinas y PCB similares a dioxinas en el nivel considerado. Estos métodos se caracterizan por su capacidad de analizar un elevado número de muestras en poco tiempo con el fin de detectar posibles positivos. Están específicamente diseñados para evitar resultados falsos negativos.

Son métodos de confirmación los que proporcionan una información completa o complementaria que permite la identificación y cuantificación inequívoca de las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas en el nivel considerado.

2. **Contexto**

Habida cuenta de que las muestras ambientales y biológicas (incluidas las muestras de productos alimenticios) contienen, por lo general, mezclas complejas de diferentes congéneres de dioxinas, se ha desarrollado el concepto de factores de equivalencia tóxica (FET) a fin de facilitar la evaluación de los riesgos. Estos FET permiten expresar concentraciones de mezclas de PCDD y PCDF sustituidos en posiciones 2,3,7 y 8, y, más recientemente, de algunas formas de PCB con cloros sustituidos en posiciones no-orto y mono-orto que presentan una actividad similar a las dioxinas en equivalentes tóxicos (EQT) de 2,3,7,8-TCDD (véase la nota 1 del anexo I).

Las concentraciones de cada sustancia en una muestra dada se multiplican por sus respectivos FET y se suman a continuación para obtener la concentración total de compuestos similares a dioxinas expresados en EQT.

El concepto de «límite superior» exige la utilización del límite de cuantificación para la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT.

El concepto de «límite inferior» exige la utilización de cero para la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT.

El concepto de «límite intermedio» exige la utilización de la mitad del límite de cuantificación para calcular la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT.

3. **Requisitos de garantía de calidad que han de cumplirse en la preparación de las muestras**

— Deberán tomarse las medidas pertinentes para evitar la contaminación cruzada en cada fase del procedimiento de toma de muestras y de análisis.

— Las muestras deberán ser almacenadas y transportadas en recipientes de vidrio, aluminio, polipropileno o polietileno. Deberán eliminarse del recipiente que contiene la muestra los restos de polvo de papel. Los recipientes de vidrio deberán lavarse con disolventes previamente sometidos a un control de detección de dioxinas.

— El almacenamiento y el transporte de las muestras deberá realizarse de modo que se preserve la integridad de la muestra de producto alimenticio.

▼B

— En la medida en que sea pertinente, cada muestra de laboratorio deberá triturarse finamente y mezclarse minuciosamente utilizando un procedimiento reconocido que garantice una homogeneización completa (por ejemplo trituración que permita pasar a través de un tamiz de 1 mm); en caso de que el contenido de humedad sea demasiado elevado, las muestras deberán secarse antes de proceder a su trituración.

— Efectuar un análisis en blanco para lo cual se realizará todo el procedimiento analítico omitiendo únicamente la muestra.

— El peso de la muestra utilizada para la extracción deberá ser el suficiente para que se cumplan los requisitos relativos a la sensibilidad.

— Existen muchos procedimientos específicos para la preparación de muestras que son satisfactorios y pueden utilizarse para los productos considerados. Los procedimientos deberán ser validados con arreglo a las directrices aceptadas internacionalmente.

4. **Requisitos que deben cumplir los laboratorios**

— Los laboratorios deberán demostrar la eficacia de un método en el nivel considerado, por ejemplo 0,5, 1 y 2 veces el nivel considerado con un coeficiente de variación aceptable para análisis repetidos. Por lo que se refiere a los criterios de validez, véase el punto 5.

— El límite de cuantificación en un método de confirmación deberá situarse en un intervalo de aproximadamente un quinto del nivel considerado, a fin de garantizar coeficientes de variación aceptables en el intervalo de referencia.

— Como medidas internas de garantía de calidad, deberán realizarse regularmente controles en blanco y experimentos con muestras enriquecidas o análisis de muestras de control (de preferencia, si existe, material de referencia certificado).

— La participación con éxito en estudios entre laboratorios que evalúan la competencia del laboratorio es la mejor manera de demostrar la aptitud de éste para efectuar análisis específicos. No obstante, la participación con éxito en estudios entre laboratorios cuando se trata, por ejemplo, de muestras de suelos o de aguas residuales no prueba necesariamente la competencia en el ámbito de las muestras de alimentos o piensos, que presentan niveles de contaminación más bajos. Por lo tanto, la participación continua en estudios entre laboratorios para la detección de dioxinas y PCB similares a las dioxinas en las matrices de alimentos/piensos es obligatoria.

— De conformidad con lo dispuesto en la Directiva 93/99/CEE, los laboratorios deberán estar acreditados por un organismo reconocido que opere de conformidad con la Guía ISO 58, a fin de garantizar que cumplen la garantía de calidad analítica. Dicha acreditación debe ser conforme a la norma ISO/IEC/17025:1999.

5. **Requisitos para los procedimientos analíticos aplicables a las dioxinas y a los PCB similares a las dioxinas**

Requisitos básicos de aceptación de los procedimientos analíticos:

— *Sensibilidad elevada y límites de detección bajos*. En el caso de los PCDD y PCDF, los umbrales de detección deben situarse en el picogramo EQT (10^{-12} g) habida cuenta de la extrema toxicidad de algunos de estos compuestos. Se sabe que los PCB suelen presentarse en cantidades más elevadas que los PCDD y PCDF. Para la mayoría de los congéneres del grupo de los PCB, es suficiente una sensibilidad en el intervalo de nanogramos (10^{-9} g). No obstante, para medir los congéneres de PCB similares a las dioxinas más tóxicos (en particular, los congéneres sustituidos no-orto) es preciso conseguir la misma sensibilidad que para los PCDD y los PCDF.

— *Selectividad elevada (especificidad)*. Es necesario establecer una distinción entre los PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas, y una multitud de otros compuestos extraídos simultáneamente de la muestra, capaces de interferir, y que están presentes en concentraciones de hasta varios órdenes de magnitud superiores a las de los analitoss considerados. Por lo que respecta a los métodos de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS), es necesario distinguir entre varios congéneres, en particular entre los tóxicos (es decir, los diecisiete PCDD y PCDF sustituidos en 2,3,7 y 8 y los PCB similares a las dioxinas) y otros congéneres. Los bioensayos deberían permitir una determinación selectiva de los valores EQT como suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas.

— *Exactitud elevada (veracidad y precisión)*. La determinación debería proporcionar una estimación válida de la concentración real en una muestra. A fin de evitar que el resultado del análisis de una muestra sea rechazado debido a la escasa fiabilidad de la estimación de EQT,

▼B

es necesario lograr un alto grado de exactitud (exactitud de la medición: grado de concordancia entre el resultado de la medición y el valor real o atribuido de la medición). La exactitud se expresa como veracidad (diferencia entre el valor medio medido para un analito en un material certificado y su valor certificado, expresado en porcentaje de dicho valor) y como precisión (la precisión suele calcularse como desviación típica; incluye la repetibilidad y la reproducibilidad e indica la diferencia entre los resultados obtenidos aplicando varias veces el procedimiento experimental en condiciones establecidas).

Los métodos de cribado pueden incluir bioensayos y métodos GC/MS; los métodos de confirmación son métodos de cromatografía de gases de alta resolución/espectometría de masas de alta resolución (HRGC/HRMS). Deben cumplirse los siguientes criterios para el valor EQT total:

	Métodos de cribado	Métodos de confirmación
Porcentaje de falsos negativos	< 1 %	
Veracidad		– 20 % a + 20 %
CV (coeficiente de variación)	< 30 %	< 15 %

6. **Requisitos específicos que deben cumplir los métodos GC/MS utilizados con fines de cribado o de confirmación**

— A fin de validar el procedimiento analítico, es preciso añadir patrones internos de PCDD/F marcados con ^{13}C y con cloros sustituidos en 2,3,7 y 8 (y patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con ^{13}C, cuando sea necesario determinar los PCB similares a las dioxinas) desde el inicio o antes de comenzar el método analítico, por ejemplo previamente a la fase de extracción. Deberá añadirse al menos un congénere para cada grupo homólogo de PCDD/F tetra a octoclorados (y al menos un congénere para cada uno de los grupos homólogos de PCB similares a las dioxinas, cuando sea necesario determinar los PCB similares a las dioxinas) (alternativamente, deberá utilizarse para el control de PCDD/F y de PCB similares a las dioxinas al menos un congénere para cada función de registro de iones seleccionados para la espectrometría de masas). Se recomienda utilizar, sobre todo en los métodos de confirmación, el conjunto de los diecisiete patrones internos de PCDD/F sustituidos en 2,3,7 y 8 y marcados con ^{13}C, así como la totalidad de los doce patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con ^{13}C (en caso de que sea necesario determinar los PCB similares a dioxinas).

Habrán de determinarse asimismo los factores de respuesta relativos en el caso de los congéneres para los que no se añade ningún análogo marcado con ^{13}C, mediante la utilización de soluciones de calibración apropiadas.

— Para los productos alimenticios de origen vegetal y los productos alimenticios de origen animal con un contenido de grasa inferior al 10 %, es obligatorio añadir patrones internos antes de proceder a la extracción. Por lo que respecta a los productos alimenticios de origen animal con un contenido de grasa superior al 10 %, los patrones internos podrán añadirse antes de la fase de extracción o después de la extracción de grasas. Conviene validar adecuadamente la eficacia de la extracción, en función de la fase en la que se introduzcan los patrones internos y de si los resultados notificados se refieren al producto o a las grasas.

— Previamente al análisis mediante GC/MS, deberán añadirse uno o dos patrones de recuperación (sustituto).

— Es preciso realizar un control de recuperación. Para los métodos de confirmación, los porcentajes de recuperación de cada patrón interno deberán situarse en un intervalo del 60 % al 120 %. En el caso de congéneres individuales, en particular para algunas dibenzodioxinas y dibenzofuranos hepta y octoclorados, podrían aceptarse porcentajes de recuperación inferiores o superiores siempre y cuando su contribución al valor EQT no supere el 10 % del valor total de EQT (teniendo únicamente en cuenta los PCDD/F). Para los métodos de cribado los porcentajes de recuperación deberán situarse en un intervalo del 30 % al 140 %.

▼B

— Es conveniente separar las dioxinas de los compuestos clorados interferentes, tales como los PCB y los éteres difenílicos clorados, mediante técnicas de cromatografía adecuadas (de preferencia con una columna de florisil, alúmina y/o carbono).

— La separación de los isómeros por cromatografía de gases debería ser suficiente (< 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF y 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

— La determinación deberá realizarse con arreglo al método EPA 1613, revisión B: dioxinas y furanos tetra a octoclorados por dilución de isótopos con HRGC/HRMS u otro método con criterios de realización equivalentes.

— La diferencia entre el límite superior y el límite inferior de determinación no debe exceder el 20 % para los productos alimenticios cuya contaminación por dioxinas sea de aproximadamente 1 pg EQT-OMS/g grasa (teniendo únicamente en cuenta los PCDD/PCDF). En el caso de los productos alimenticios con bajo contenido de grasa, deberán aplicarse los mismos requisitos para niveles de contaminación del orden de 1 pg EQT-OMS/g de producto. Para niveles de contaminación inferiores, por ejemplo 0,50 pg. de producto EQT-OMS/g, la diferencia entre el límite superior y el límite inferior podrá situarse en un intervalo del 25 % al 40 %.

7. **Métodos analíticos de detección selectiva**

7.1. *Introducción*

Es posible aplicar distintos enfoques analíticos en un método de detección selectiva: un enfoque exclusivamente de cribado y un enfoque cuantitativo.

Técnica de cribado

La respuesta de las muestras se compara con la de una muestra de referencia en el nivel considerado. Las muestras cuya respuesta es inferior a la de la muestra de referencia se consideran negativas, y las muestras cuya respuesta es superior se consideran positivas. Requisitos:

— En cada serie de ensayos deberán utilizarse blancos y muestras de referencia, extraídas y analizadas al mismo tiempo y en condiciones idénticas. La respuesta de la muestra de referencia debe ser claramente superior a la del blanco.

— Deberán incluirse otras muestras de referencia con una concentración equivalente a 0,5 veces y 2 veces el nivel considerado a fin de demostrar la eficacia del ensayo en el intervalo de referencia para el control del nivel considerado.

— Cuando se analicen otras matrices, deberá demostrarse la validez de las muestras de referencia, utilizando de preferencia muestras cuya concentración en EQT, establecida mediante un método HRGC/HRMS, sea similar a la de la muestra de referencia o, en su defecto, de un blanco enriquecido hasta concentraciones del mismo orden.

— Puesto que en los bioensayos no pueden utilizarse patrones internos, las pruebas de repetibilidad son muy importantes para obtener datos sobre la desviación típica en una serie de ensayos. El coeficiente de variación debe ser inferior al 30 %.

— En el caso de los bioensayos, deberán identificarse claramente los compuestos diana, las posibles interferencias y los niveles máximos tolerables de blanco.

Enfoque cuantitativo

El enfoque cuantitativo exige varias series de diluciones del patrón, procesos de limpieza y mediciones dobles o triples, así como ensayos en blanco y controles de recuperación. El resultado podrá expresarse en EQT, dando por sentado que los compuestos responsables de la señal cumplen el principio de EQT. Para ello, puede utilizarse el TCDD (o una mezcla de patrones de dioxinas/furanos) a fin de producir una curva de calibración que permita calcular el nivel de EQT en el extracto y, por lo tanto, en la muestra. A continuación, este resultado se corrige con el nivel de EQT calculado para un blanco (para tener en cuenta las impurezas procedentes de los disolventes o productos químicos utilizados) y para la recuperación (calculada a partir del nivel de EQT en una muestra de control de calidad próxima al límite considerado). Es fundamental tener en cuenta que parte de la pérdida de recuperación aparente puede deberse a efectos matriciales y/o a diferencias entre los valores de FET en los bioensayos y los valores oficiales de FET definidos por la OMS.

▼B

7.2. *Requisitos aplicables a los métodos analíticos de cribado*

— El cribado puede realizarse utilizando métodos analíticos GC/MS o bioensayos. Para los métodos GC/MS deben utilizarse los criterios establecidos en el punto 6. Por lo que se refiere a los bioensayos celulares y los bioensayos realizados con kits, los requisitos específicos aplicables figuran, respectivamente, en los puntos 7.3 y 7.4.

— Es necesario proporcionar información sobre el número de resultados falsos positivos y falsos negativos obtenidos para una amplia serie de muestras por debajo y por encima del nivel máximo o umbral de intervención, en comparación con el contenido en EQT determinado mediante un método analítico de confirmación. Los porcentajes reales de falsos negativos deben ser inferiores al 1 %. La tasa de falsas muestras positivas debe ser lo suficientemente baja para que el método de cribado resulte eficaz.

— Los resultados positivos deberán confirmarse siempre mediante un método analítico de confirmación (HRGC/HRMS). Además, las muestras correspondientes a una amplia gama de EQT deberán ser confirmadas por un método HRGC/HRMS (aproximadamente 2 % a 10 % de las muestras negativas). Deberá facilitarse información sobre la correspondencia entre los resultados de los bioensayos y los del método HRGC/HRMS.

7.3. *Requisitos específicos aplicables a los bioensayos celulares*

— Cuando se efectúe un bioensayo, deberá utilizarse en cada prueba una serie de concentraciones de referencia de TCDD o una mezcla de dioxinas/furanos (curva de respuesta con un $R^2 > 0{,}95$ para una dosis completa). Sin embargo, a efectos del cribado, puede utilizarse en el análisis de las muestras de baja concentración una curva detallada en los niveles bajos.

— Para los resultados del bioensayo en un intervalo de tiempo constante, conviene utilizar una concentración de referencia de TCDD (aproximadamente 3 veces el límite de cuantificación) en una ficha de control de calidad. Otra posibilidad sería utilizar la respuesta relativa de una muestra de referencia comparada con una línea de calibración de TCDD, habida cuenta de que la respuesta de las células depende de múltiples factores.

— Se recomienda registrar y verificar los gráficos de control de calidad (QC) para cada tipo de material de referencia, a fin de garantizar que el resultado es conforme a las indicaciones establecidas.

— El punto de entrada de la dilución de la muestra utilizada debe situarse en la parte lineal de la curva de respuesta, en particular para los cálculos cuantitativos. Las muestras situadas por encima de la parte lineal de la curva de respuesta deberán diluirse y analizarse de nuevo. Por esta razón, se aconseja realizar el análisis con tres o más diluciones a la vez.

— La desviación típica no debe ser superior al 15 % cuando se lleva a cabo una determinación en triplicado para cada dilución de la muestra, ni superior al 30 % para tres análisis independientes.

— El límite de detección podrá fijarse en 3 veces la desviación típica del blanco de disolvente o de la respuesta de fondo. Otro método consistiría en aplicar una respuesta superior a la respuesta de fondo (factor de inducción 5 veces superior al blanco de disolvente) calculada a partir de la curva de calibración del día. El límite de cuantificación podrá fijarse en 5 a 6 veces la desviación típica del blanco de disolvente o de la respuesta de fondo o aplicar una respuesta superior a la respuesta de fondo (factor de inducción 10 veces superior al blanco de disolvente) calculada a partir de la curva de calibración del día.

7.4. *Requisitos específicos aplicables a los bioensayos realizados por medio de kits* [1]

— Deberán respetarse las instrucciones del fabricante por lo que respecta a la preparación de las muestras y los análisis.

— No deberán utilizarse los kits después de la fecha de caducidad indicada.

— No deberán utilizarse materiales o componentes previstos para otros kits.

[1] Hasta la fecha, los bioensayos realizados mediante kits disponibles en el mercado no han demostrado la suficiente sensibilidad y fiabilidad para poder ser utilizados a fines de detección de la presencia de dioxinas en los niveles exigidos para las muestras de productos alimenticios y de piensos.

▼B

— Los kits deberán conservarse y utilizarse en las condiciones de temperatura de conservación y de utilización indicadas.

— El límite de detección aceptable para los inmunoensayos se define como 3 veces la desviación típica, para una serie de diez análisis repetidos del blanco, dividido por el valor de la pendiente de la ecuación de regresión lineal.

— Conviene utilizar patrones de referencia para los análisis de laboratorio, a fin de garantizar que la capacidad de respuesta al patrón se sitúa en un intervalo aceptable.

8. **Notificación de los resultados**

En la medida en que el procedimiento analítico lo permita, los resultados del análisis deberán incluir los niveles de los congéneres individuales de PCDD/F y PCB e indicarse como límite inferior, límite superior y límite intermedio, a fin de incluir el máximo de información posible en la notificación de los resultados. Ello permitirá interpretar los resultados en función de los requisitos específicos.

El informe deberá indicar asimismo el contenido en lípidos de la muestra, así como el método utilizado para su extracción.

Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno en caso de que dichos porcentajes estén fuera del intervalo mencionado en el punto 6, en caso de que se supere el nivel máximo, y en los demás casos cuando se soliciten.