**Ce document constitue un outil de documentation et n'engage pas la responsabilité des institutions**

►**B** **DIRECTIVE 2002/69/CE DE LA COMMISSION**

**du ►C1 30 juillet 2002 ◄**

**portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des dioxines et le dosage des PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires**

**(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)**

(JO L 209 du 6.8.2002, p. 5)

Rectifiée par:

►**C1** Rectificatif, JO L 252 du 20.9.2002, p. 40 (2002/69/CE)

▼B

# DIRECTIVE 2002/69/CE DE LA COMMISSION

**du ►C1 30 juillet 2002 ◄**

**portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des dioxines et le dosage des PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires**

**(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)**

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 85/591/CEE du Conseil du 20 décembre 1985 concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle des denrées destinées à la consommation humaine [1], ►C1 et notamment ses articles 1er et 4, ◄

considérant ce qui suit:

(1) Le règlement (CE) nº 466/2001 de la Commission [2], modifié en dernier lieu par le règlement (CE) nº 563/2002 [3], modifié par le règlement (CE) nº 2375/2001 du Conseil [4], établit des teneurs maximales pour les dioxines et les furanes dans certaines denrées alimentaires.

(2) La directive 89/397/CEE du Conseil du 14 juin 1989 relative au contrôle officiel des denrées alimentaires [5] établit les principes généraux relatifs à l'exercice du contrôle des denrées alimentaires. La directive 93/99/CEE du Conseil du 29 octobre 1993 relative à des mesures additionnelles concernant le contrôle officiel des denrées alimentaires [6] introduit un système de normes de qualité pour les laboratoires chargés par les États membres du contrôle officiel des denrées alimentaires.

(3) La directive 85/591/CEE a fixé des critères généraux pour les méthodes d'échantillonnage et d'analyse. Cependant, dans certains cas, il est nécessaire d'établir des critères et/ou des prescriptions plus spécifiques applicables à la méthode d'analyse, de façon à garantir que les laboratoires utilisent des méthodes d'analyse présentant des niveaux de performance comparables.

(4) Les dispositions concernant le mode de prélèvement des échantillons et les méthodes d'analyse ont été établies sur la base des connaissances actuelles et pourront être adaptées à l'évolution des connaissances scientifiques et techniques.

(5) Les dispositions de la présente directive concernent uniquement l'échantillonnage et l'analyse des dioxines et des PCB de type dioxine dans le cadre de la mise en œuvre du règlement (CE) nº 466/2001 et n'affectent ni la stratégie d'échantillonnage, ni les niveaux et fréquences d'échantillonnage définis dans les annexes III et IV de la directive 96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits. Ces dispositions, qui abrogent les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE [7], n'affectent pas non plus les critères de ciblage des échantillons définis dans la décision 98/179/CE de la Commission du 23 février 1998 fixant les modalités de prise d'échantillons officiels pour la recherche de certaines

---

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

▼B

substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits ([1]).

(6) Il convient de mettre en œuvre une stratégie active pour obtenir des données fiables et complètes sur la présence de PCB de type dioxine dans les denrées alimentaires. C'est pourquoi il convient d'établir des prescriptions concernant les méthodes d'analyse à utiliser pour déterminer la teneur en PCB de type dioxine des denrées alimentaires.

(7) Une méthode analytique de dépistage dont la validité a été démontrée et est largement reconnue, et qui est dotée d'une grande capacité, peut être utilisée en vue de sélectionner les échantillons présentant une teneur significative en dioxine. La teneur en dioxine de ces échantillons doit ensuite être déterminée au moyen d'une méthode analytique de confirmation. C'est pourquoi il convient de fixer des prescriptions strictes pour les méthodes analytiques de confirmation et des prescriptions minimales pour la méthode de dépistage.

(8) Les mesures prévues par la présente directive sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

*Article premier*

Les États membres garantissent que les prélèvements d'échantillons destinés au contrôle officiel des teneurs en dioxines et en furanes des denrées alimentaires et à la détermination des teneurs en PCB de type dioxine des denrées alimentaires soient effectués conformément aux méthodes décrites à l'annexe I.

*Article 2*

Les États membres garantissent que la préparation des échantillons et les méthodes d'analyse utilisées pour le contrôle officiel des teneurs en dioxines et en furanes des denrées alimentaires et pour la détermination des teneurs en PCB de type dioxine des denrées alimentaires soient conformes aux critères décrits à l'annexe II.

*Article 3*

Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive au plus tard le 28 février 2003. Ils en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

*Article 4*

La présente directive entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

*Article 5*

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

([1]) JO L 65 du 5.3.1998, p. 31.

▼B

*ANNEXE I*

**MÉTHODES DE PRÉLÈVEMENT D'ÉCHANTILLONS POUR LE CONTRÔLE OFFICIEL DES TENEURS EN DIOXINES (PCDD/PCDF) ET POUR LE DOSAGE DES PCB DE TYPE DIOXINE DANS CERTAINES DENRÉES ALIMENTAIRES**

1. **Objet et domaine d'application**

Les échantillons destinés au contrôle officiel des teneurs en dioxines (PCDD/PCDF) des denrées alimentaires ainsi qu'à la détermination des teneurs en PCB de type dioxine ([1]) des denrées alimentaires sont à prélever conformément aux méthodes décrites ci-dessous. Les échantillons globaux ainsi obtenus sont considérés comme représentatifs des lots ou sous-lots sur lesquels ils sont prélevés. Le respect des teneurs maximales fixées dans le règlement (CE) nº 466/2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, est établi sur la base des teneurs déterminées dans les échantillons de laboratoire.

([1]) Tableau de l'OMS TEF pour l'évaluation des risques pour les êtres humains, fondé sur les conclusions de la réunion de l'OMS tenue à Stockholm (Suède), du 15 au 18 juin 1997 [Van den Berg et al. (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. Environmental Health Perspectives, 106(12), 775].

| Congénère | Valeur du TEF |
|---|---|
| **Dibenzo-p-dioxines (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 |
| **Dibenzofuranes (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 «de type dioxine»* **PCB non-ortho + PCB mono-ortho** | |
| **PCB non-ortho** | |
| PCB 77 | 0,0001 |
| PCB 81 | 0,0001 |
| PCB 126 | 0,1 |
| PCB 169 | 0,01 |
| **PCB mono-ortho** | |
| 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 |

Abréviations utilisées: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = octa; CDD = clorodibenzodioxine; CDF = chlorodibenzofurane; CB = chlorobiphényle.

▼B

2. **Définitions**

«Lot»: quantité identifiable d'une denrée alimentaire, livrée en une fois, pour laquelle il est établi par l'agent responsable qu'elle présente des caractéristiques communes, telles que l'origine, la variété, le type d'emballage, l'emballeur, l'expéditeur ou le marquage. Dans le cas des poissons et des produits de la pêche, la taille de l'animal doit également être comparable.

«Sous-lot»: partie désignée d'un grand lot, afin d'appliquer le mode de prélèvement à cette partie désignée. Chaque sous-lot doit être physiquement séparé et identifiable.

«Échantillon élémentaire»: quantité de matière prélevée en un seul point du lot ou du sous-lot.

«Échantillon global»: agrégation de tous les échantillons élémentaires prélevés sur le lot ou le sous-lot.

«Échantillon de laboratoire»: partie ou quantité représentative de l'échantillon global destinée au laboratoire.

3. **Dispositions générales**

3.1. *Personnel*

Le prélèvement doit être effectué par une personne qualifiée, mandatée à cet effet, selon les prescriptions de l'État membre.

3.2. *Produit à échantillonner*

Tout lot à analyser fait l'objet d'un échantillonnage séparé.

3.3. *Précautions à prendre*

Au cours de l'échantillonnage et de la préparation des échantillons de laboratoire, des précautions doivent être prises afin d'éviter toute altération susceptible de modifier la teneur en dioxines et en PCB de type dioxine, de perturber les analyses ou de compromettre la représentativité des échantillons globaux.

3.4. *Échantillons élémentaires*

Dans la mesure du possible, les échantillons élémentaires sont prélevés en divers points du lot ou sous-lot. Toute dérogation à cette règle est à signaler dans le procès-verbal prévu au point 3.8.

3.5. *Préparation de l'échantillon global*

L'échantillon global est obtenu en assemblant tous les échantillons élémentaires. Il doit peser au moins 1 kilogramme (kg) à moins que ce ne soit pas possible, par exemple lorsqu'un seul emballage a été prélevé.

3.6. *Subdivision de l'échantillon global en échantillons de laboratoire à des fins de contrôle, de recours et d'arbitrage*

Les échantillons de laboratoire destinés à des fins de contrôle, de recours et d'arbitrage sont prélevés sur l'échantillon global homogénéisé à moins que cela ne soit contraire aux règles en matière d'échantillonnage en vigueur dans l'État membre. La taille des échantillons de laboratoire destinés aux mesures de contrôle doit être suffisante pour permettre au moins une double analyse.

3.7. *Conditionnement et envoi des échantillons globaux et de laboratoire*

Chaque échantillon global ou de laboratoire est placé dans un récipient propre, en matériau inerte, le protégeant convenablement contre tout facteur de contamination, toute perte de substance à analyser par adsorption sur la paroi interne du récipient et tout dommage pouvant résulter du transport. Toutes les précautions nécessaires doivent être prises pour éviter que la composition des échantillons globaux et de laboratoire ne se modifie au cours du transport ou du stockage.

3.8. *Fermeture et étiquetage des échantillons globaux et de laboratoire*

Chaque échantillon officiel est scellé sur le lieu de prélèvement et identifié selon les prescriptions en vigueur dans l'État membre. Pour chaque prélèvement, un procès-verbal d'échantillonnage doit être établi, permettant d'identifier sans ambiguïté le lot échantillonné et reprenant la date et le

▼B

lieu d'échantillonnage, ainsi que toute information supplémentaire pouvant être utile à l'analyste.

4. **Plans d'échantillonnage**

La méthode de prélèvement appliquée doit garantir que l'échantillon global est représentatif du lot à contrôler.

*Nombre d'échantillons élémentaires*

Dans le cas du lait et des huiles, pour lesquels on peut présumer une répartition homogène des contaminants concernés au sein d'un lot donné, il est suffisant de prélever trois échantillons élémentaires par lot constituant l'échantillon global. Pour les autres produits, le nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever du lot est indiqué dans le tableau 1.

Le poids de l'échantillon global réunissant tous les échantillons élémentaires sera d'au moins 1 kg (voir point 3.5). Les échantillons élémentaires doivent avoir un poids semblable. Un échantillon élémentaire doit peser au moins 100 grammes. Le poids de l'échantillon élémentaire dépend de la taille des particules dans le lot. Toute dérogation à cette règle est à signaler dans le procès-verbal prévu au point 3.8. Conformément aux dispositions de la décision 97/747/CE de la Commission du 27 octobre 1997 fixant les niveaux et fréquences de prélèvements d'échantillons prévus par la directive 96/23/CE du Conseil en vue de la recherche de certaines substances et de leurs résidus dans certains produits animaux [1], la taille de l'échantillon, pour les œufs de poule, est au moins de 12 œufs (pour des lots en vrac comme pour des lots se présentant en emballages distincts, voir tableaux 1 et 2).

TABLEAU 1

**Nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever sur le lot**

| Poids du lot (à exprimer en kg) | Nombre d'échantillons élémentaires à prélever |
|---|---|
| < 50 | 3 |
| 50 à 500 | 5 |
| > 500 | 10 |

Si le lot se présente en emballages distincts, le nombre d'emballages à prélever pour former l'échantillon global est indiqué dans le tableau 2.

TABLEAU 2

**Nombre d'emballages (échantillons élémentaires) à prélever pour former l'échantillon global si le lot se compose d'emballages distincts**

| Nombre d'emballages ou d'unités compris dans le lot | Nombre d'emballages ou d'unités à prélever |
|---|---|
| 1 à 25 | 1 emballage ou unité |
| 26 à 100 | 5 % environ, au moins 2 emballages ou unités |
| > 100 | 5 % environ, un maximum de 10 emballages ou unités |

5. **Conformité du lot ou sous-lot aux spécifications**

À des fins de contrôle, le laboratoire procède à une double analyse de l'échantillon de laboratoire si le résultat de la première analyse est inférieur ou supérieur de moins de 20 % à la teneur maximale, et calcule la moyenne des résultats. Le lot est accepté si le résultat de la première analyse est inférieur de plus de 20 % à la teneur maximale ou, lorsqu'une double analyse

[1] JO L 303 du 6.11.1997, p. 12.

▼B

est nécessaire, si la moyenne ne dépasse pas la teneur maximale correspondante fixée dans le règlement (CE) nº 466/2001.

▼B

*ANNEXE II*

**PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET PRESCRIPTIONS RELATIVES AUX MÉTHODES D'ANALYSE UTILISÉES POUR LE CONTRÔLE OFFICIEL DES TENEURS EN DIOXINES (PCDD/PCDF) DE CERTAINES DENRÉES ALIMENTAIRES ET POUR LE DOSAGE DES PCB DE TYPE DIOXINE DANS CERTAINES DENRÉES ALIMENTAIRES**

1. **Objet et domaine d'application**

Ces prescriptions s'appliquent aux analyses de denrées alimentaires effectuées aux fins du contrôle officiel des teneurs en dioxines [dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD) et dibenzofuranes polychlorés (PCDF)] et du dosage des PCB de type dioxine.

Pour surveiller la présence de dioxines dans les denrées alimentaires, il est possible de mettre en œuvre une stratégie reposant sur une méthode de dépistage, afin de sélectionner les échantillons dont la teneur en dioxines et en PCB de type dioxine est, soit inférieure au niveau considéré, sans que l'écart dépasse 30 à 40 %, soit supérieure au niveau considéré. La teneur en dioxines des échantillons présentant des teneurs significatives doit être déterminée et/ou confirmée au moyen d'une méthode de confirmation.

Les méthodes de dépistage visent à détecter la présence de dioxines et de PCB de type dioxine au niveau considéré. Elles sont dotées d'une grande capacité de traitement d'échantillons, ce qui permet de passer au crible de nombreux échantillons en vue de détecter ceux qui pourraient s'avérer positifs. Elles sont spécialement conçues pour éviter les faux résultats négatifs.

Les méthodes de confirmation fournissent des informations complètes ou complémentaires permettant l'identification et la quantification univoque de dioxines et de PCB de type dioxine au niveau considéré.

2. **Contexte**

Du fait que les échantillons de l'environnement et les échantillons biologiques (y compris les échantillons de denrées alimentaires) contiennent en général des mélanges complexes de différents congénères de dioxines, le concept de facteurs d'équivalence toxique (TEF) a été créé pour faciliter l'évaluation des risques. Ces TEF ont été établis pour exprimer les concentrations de mélanges de PCDD et de PCDF substitués en 2,3,7,8 et, depuis peu, de certains PCB non-ortho et mono-ortho substitués ayant des propriétés semblables à celles des dioxines, en équivalents toxiques (TEQ) de la 2,3,7,8-TCDD (annexe I, note 1 de bas de page).

Les concentrations de chaque substance dans un échantillon donné sont multipliées par leurs TEF respectifs, puis elles sont additionnées de façon à obtenir la concentration totale en composés de type dioxine, exprimée en TEQ.

Pour le calcul de l'«estimation haute», on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à la limite de quantification.

Pour le calcul de l'«estimation basse», on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à zéro.

Pour le calcul de l'«estimation intermédiaire», on considère que la contribution au TEQ de chaque congénère non quantifié est égale à la moitié de la limite de quantification.

3. **Prescriptions d'assurance qualité pour la préparation des échantillons**

— Des mesures doivent être prises en vue d'éviter toute contamination croisée à chaque étape de la procédure d'échantillonnage et d'analyse.

— Les échantillons doivent être conservés et transportés dans des récipients en verre, en aluminium, en polypropylène ou en polyéthylène. Toute trace de poussière de papier doit être enlevée du contenant de l'échantillon. La verrerie doit être rincée à l'aide de solvants préalablement soumis à un contrôle de détection de dioxines.

— La conservation et le transport de l'échantillon doivent être effectués d'une façon telle que l'intégrité de l'échantillon de denrée alimentaire soit préservée.

— Si nécessaire, chaque échantillon de laboratoire doit être broyé finement et soigneusement mélangé, selon une méthode garantissant une homo-

▼B

généisation complète [par exemple de façon à pouvoir passer au travers d'un tamis à mailles de 1 millimètre (mm)]; les échantillons doivent être séchés avant le broyage si leur teneur en eau est trop élevée.

— Un essai à blanc doit être réalisé, en effectuant l'ensemble de la procédure analytique avec pour seule différence l'absence de l'échantillon.

— Le poids de l'extrait doit être suffisamment élevé, de façon à répondre aux exigences de sensibilité.

— De nombreuses procédures spécifiques de préparation des échantillons peuvent être utilisées de manière satisfaisante pour les produits considérés. Les procédures doivent être validées selon des directives reconnues au plan international.

4. **Prescriptions applicables aux laboratoires**

— Les laboratoires doivent démontrer la validité de la méthode dans une certaine plage autour de la limite réglementaire, par exemple à des niveaux égaux à 0,5 fois, 1 fois et 2 fois ce niveau, avec un coefficient de variation acceptable pour les analyses répétées. Pour plus de précisions sur les critères de validité, se reporter au point 5.

— La limite de quantification pour une méthode de confirmation ne doit pas dépasser le cinquième du niveau considéré, pour garantir des coefficients de variation acceptables dans la plage susmentionnée.

— Des essais à blanc et des expériences avec enrichissement ou des analyses sur des échantillons de contrôle (si possible, des matériaux de référence certifiés) doivent être effectués régulièrement, dans le cadre des mesures d'assurance qualité internes.

— Des participations couronnées de succès à des études inter-laboratoires qui évaluent la compétence du laboratoire sont la meilleure façon de démontrer l'aptitude de ce dernier à effectuer des analyses spécifiques. Cependant, une participation réussie à une étude inter-laboratoire portant, par exemple, sur des échantillons de sols ou d'eaux usées, ne suffit pas à démontrer une compétence pour les échantillons de denrées alimentaires ou d'aliments des animaux, qui présentent des niveaux de contamination inférieurs. C'est pourquoi la participation continuelle à des études inter-laboratoires sur la détermination des teneurs en dioxine et en PCB de type dioxine des matrices d'aliments des animaux/de denrées alimentaires correspondantes est obligatoire.

— Conformément aux dispositions de la directive 93/99/CEE, les laboratoires doivent être accrédités par un organisme habilité qui se conforme au guide ISO/CEI 58, de manière à garantir qu'ils appliquent les procédures d'assurance qualité à leurs analyses. Les laboratoires doivent être agréés selon la norme ISO/CEI 17025:1999.

5. **Prescriptions concernant les procédures d'analyse relatives aux dioxines et aux PCB de type dioxine**

*Prescriptions fondamentales de validité des procédures d'analyse:*

— *Sensibilité élevée et faibles limites de détection*. En ce qui concerne les PCDD et les PCDF, les seuils de détection doivent être de l'ordre du picogramme de TEQ ($10^{-12}$ g), étant donné la toxicité extrêmement élevée de ces composés. Il est connu que les PCB se présentent en quantités plus élevées que les PCDD ou PCDF. Pour la plupart des congénères du groupe des PCB, une sensibilité de l'ordre du nanogramme ($10^{-9}$ g) est suffisante. Cependant, pour la mesure des congénères du groupe des PCB de type dioxine plus toxiques (en particulier les congénères non-ortho substitués), il convient d'atteindre la même sensibilité que pour les PCDD et les PCDF.

— *Grande sélectivité (spécificité)*. Il est nécessaire de distinguer les PCDD, les PCDF et les PCB de type dioxine d'une multitude d'autres composés extraits simultanément de l'échantillon, susceptibles d'interférer, et qui sont présents dans des concentrations supérieures de plusieurs ordres de grandeur à celle des analytes à doser. Pour les méthodes de chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM), il est nécessaire de distinguer entre plusieurs congénères, notamment entre les congénères toxiques (c'est-à-dire les dix-sept PCDD et PCDF substitués en 2,3,7,8 et les PCB de type dioxine) et les autres congénères. Les bio-essais doivent permettre de déterminer sélectivement les valeurs de TEQ, en tant que somme de PCDD, PCDF et PCB de type dioxine.

— *Grande exactitude (justesse et fidélité)*. L'essai doit fournir une estimation valide de la concentration réelle d'un échantillon. Une grande exactitude (exactitude de la mesure: degré de concordance entre le résultat de la mesure et la valeur réelle ou attribuée de la grandeur à mesurer) est nécessaire pour empêcher qu'un résultat d'analyse d'échantillon ne soit rejeté en raison du manque de fiabilité de l'estimation des

▼B

TEQ. L'exactitude est une expression de la justesse (la différence entre la valeur moyenne mesurée pour un analyte dans un matériau certifié et sa valeur certifiée, exprimée en pourcentage de cette valeur) et de la fidélité (la fidélité est généralement calculée sous forme d'écart-type; elle englobe la répétabilité et la reproductibilité et indique le degré de concordance entre les résultats obtenus par application répétée du procédé expérimental dans des conditions déterminées).

Les méthodes de dépistage peuvent comprendre des bio-essais et des méthodes CG/SM, tandis que les méthodes de confirmation sont des méthodes de chromatographie en phase gazeuse à haute résolution/de spectrométrie de masse à haute résolution (CGHR/SMHR). Les critères suivants doivent être remplis pour la valeur totale en TEQ:

| | Méthodes de dépistage | Méthodes de confirmation |
|---|---|---|
| Taux de faux négatifs | < 1 % | |
| Justesse | | – 20 % à + 20 % |
| Coefficient de variation | < 30 % | < 15 % |

6. **Prescriptions spécifiques concernant les méthodes CG/SM utilisées à des fins de dépistage ou de confirmation**

— Des étalons internes de PCDD/F substitués en 2,3,7,8 marqués au $^{13}C$ (et des étalons internes de PCB de type dioxine marqués au $^{13}C$, si des PCB de type dioxine doivent être dosés) doivent être ajoutés au tout début de la méthode d'analyse, par exemple avant la phase d'extraction, afin de valider la procédure analytique. Au moins un congénère doit être ajouté pour chacun des groupes isomères tetra à octachlorés des PCDD/F (et au moins un congénère pour chaque groupe isomère des PCB de type dioxine, si des PCB de type dioxine doivent être dosés) (une autre méthode consiste à ajouter au moins un congénère pour chaque fonction d'enregistrement d'un isomère sélectionné par spectrométrie de masse utilisée pour le contrôle des PCDD/F et des PCB de type dioxine). Il est fortement recommandé, surtout pour les méthodes de confirmation, d'utiliser l'ensemble des dix-sept étalons internes de PCDD/F substitués en 2,3,7,8 marqués au $^{13}C$ ainsi que la totalité des douze étalons internes de PCB de type dioxine marqués au $^{13}C$ (si des PCB de type dioxine doivent être dosés).

Des facteurs de réponse relatifs doivent également être déterminés dans le cas des congénères pour lesquels aucun analogue marqué au $^{13}C$ n'est ajouté, en utilisant des solutions d'étalonnage appropriées.

— Pour les denrées alimentaires d'origine végétale et les denrées alimentaires d'origine animale contenant moins de 10 % de graisses, il est obligatoire d'ajouter les étalons internes avant la phase d'extraction. Pour les denrées alimentaires d'origine animale contenant plus de 10 % de graisses, les étalons internes peuvent être ajoutés soit avant la phase d'extraction soit après l'extraction des graisses. Il convient de valider adéquatement l'efficacité de l'extraction, en fonction de la phase au cours de laquelle les étalons internes ont été introduits et de la façon dont les résultats sont consignés (sur base du produit ou des graisses).

— Avant l'analyse CG/SM, un ou deux étalons de substitution doivent être ajoutés.

— Un contrôle de récupération est nécessaire. Dans le cas des méthodes de confirmation, les taux de récupération des étalons internes doivent se situer dans une plage allant de 60 à 120 %. Pour des congénères individuels, en particulier pour certaines dibenzodioxines et dibenzofuranes hepta et octachlorés, des taux de récupération inférieurs ou supérieurs sont acceptables, à condition que leur contribution à la valeur TEQ ne dépasse pas 10 % de la valeur totale TEQ (en tenant compte uniquement des PCDD/F). Dans le cas des méthodes de dépistage, les taux de récupération doivent se situer dans une plage allant de 30 à 140 %.

— Il convient de séparer les dioxines des composés chlorés interférents, tels que les PCB et les diphényléthers chlorés, en utilisant des techniques chromatographiques appropriées (de préférence au moyen d'une colonne de florisil, d'alumine et/ou de charbon).

— La séparation des isomères par chromatographie en phase gazeuse doit être suffisante (< 25 % de pic à pic entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF et 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

▼B

— Le dosage doit être effectué conformément à la méthode EPA 1613, révision B, intitulée «Tetra- through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS» de l'agence pour la protection de l'environnement des États-Unis ou à une autre méthode présentant des critères d'efficacité équivalents.

— L'écart entre l'estimation haute et l'estimation basse de la teneur de l'ensemble des congénères ne doit pas dépasser 20 % pour les denrées alimentaires dont la contamination par les dioxines est d'environ 1 pg OMS-TEQ/g de graisse (en tenant compte uniquement des PCDD/PCDF). Les mêmes prescriptions s'appliquent aux denrées alimentaires à faible teneur en graisse dont la contamination est de l'ordre de 1 pg OMS-TEQ/g de produit. Pour des niveaux de contamination inférieurs, par exemple 0,50 pg OMS-TEQ/g de produit, la différence entre le niveau supérieur et le niveau inférieur peut se situer dans une plage allant de 25 à 40 %.

7. **Méthodes analytiques de dépistage**

7.1. *Introduction*

Différentes approches analytiques peuvent être mises en œuvre pour la méthode de dépistage: une approche de dépistage pure et une approche quantitative.

Approche de dépistage

La réponse des échantillons est comparée à celle d'un échantillon de référence, au niveau considéré. Les échantillons dont la réponse est inférieure à celle de la référence sont déclarés négatifs et ceux dont la réponse est supérieure à celle de la référence sont considérés comme positifs. Prescriptions:

— dans chaque série d'essais, un échantillon blanc et un ou des échantillons de référence doivent être extraits et testés au même moment et dans les mêmes conditions. La réponse de l'échantillon de référence doit être nettement plus élevée que celle du blanc,

— des échantillons de référence supplémentaires, d'une concentration égale à 0,5 fois et 2 fois le niveau considéré, doivent être inclus, pour démontrer l'efficacité de l'essai dans la plage pertinente pour le contrôle du niveau considéré,

— dans le cas où l'on procède à l'essai d'autres matrices, la validité du ou des échantillons de référence doit être prouvée, en utilisant de préférence des échantillons dont la valeur de TEQ, établie par CGHR/SMHR, est de l'ordre de celle de l'échantillon de référence ou, à défaut, un blanc enrichi pour atteindre ce niveau,

— étant donné qu'aucun étalon interne ne peut être utilisé dans le cadre des bio-essais, les tests de répétabilité sont d'une grande importance pour obtenir des données sur l'écart-type au sein d'une série d'essais. Le coefficient de variation doit être inférieur à 30 %,

— dans le cas des bio-essais, il convient de définir les composés cibles, les interférences potentielles, ainsi que la valeur maximale tolérée pour le blanc.

Approche quantitative

L'approche quantitative comprend obligatoirement des séries de dilutions types, un processus de nettoyage et de mesurage double ou triple, ainsi que des essais à blanc et des tests de récupération. Le résultat peut être exprimé en TEQ, ce qui suppose que les composés à l'origine du signal satisfont au principe du TEQ. À cette fin, on peut utiliser la TCDD (ou un mélange type de dioxines/furanes) pour élaborer une courbe d'étalonnage, qui permet de calculer la valeur de TEQ dans l'extrait et par conséquent, dans l'échantillon. Cette quantité est ensuite corrigée de la valeur de TEQ calculée pour l'échantillon blanc (pour tenir compte des impuretés provenant des solvants ou des substances chimiques utilisés) et pour la récupération (cette dernière quantité est calculée à partir de la valeur TEQ dans un échantillon de contrôle de la qualité dont la concentration est proche du niveau considéré). Il ne faut jamais perdre de vue qu'une partie de la perte apparente de la récupération peut être due à des effets de matrice et/ou à des écarts entre les valeurs des TEF pour les bio-essais et les valeurs officielles des TEF établies par l'OMS.

7.2. *Prescriptions concernant les méthodes analytiques de dépistage*

— Le dépistage peut être effectué au moyen de méthodes d'analyse CG/SM et de bio-essais. Les prescriptions établies au point 6 doivent être utilisées pour les méthodes CG/SM. Des prescriptions spécifiques sont

▼B

établies au point 7.3 pour les bio-essais cellulaires et au point 7.4 pour les bio-essais réalisés au moyen de kits.

— Des données doivent être fournies sur le nombre de résultats faux positifs et faux négatifs d'un grand nombre d'échantillons en dessous et au-dessus du niveau maximal ou du seuil d'intervention, par comparaison avec la valeur de TEQ déterminée par une méthode analytique de confirmation. Les taux réels de faux négatifs doivent être inférieurs à 1 %. Le taux de faux échantillons positifs doit être suffisamment faible pour que l'utilisation de la méthode de dépistage reste avantageuse.

— Les résultats positifs doivent toujours être confirmés par une méthode analytique de confirmation (CGHR/SMHR). En outre, des échantillons d'une large plage de TEQ doivent être confirmés par CGHR/SMHR (environ 2 à 10 % des échantillons négatifs). Des informations sur la correspondance entre les résultats des bio-essais et ceux de la CGHR/SMHR doivent être fournies.

7.3. *Prescriptions spécifiques aux bio-essais cellulaires*

— Pour les bio-essais, une série de concentrations de référence de TCDD ou d'un mélange dioxines/furanes (courbe de réponse avec $R^2 > 0,95$ pour une dose complète) est nécessaire lors de chaque essai. Cependant, pour le dépistage, une courbe plus détaillée dans la zone des faibles teneurs peut être utilisée pour l'analyse des échantillons à faible teneur.

— Pour les résultats du bio-essai dans un intervalle de temps constant, il convient d'utiliser une concentration de référence de TCDD (environ 3 fois la limite de quantification) sur un formulaire de contrôle qualité. On peut également se fonder sur la réponse relative d'un échantillon de référence comparée à une courbe d'étalonnage de TCDD, étant donné que la réponse des cellules peut dépendre d'un grand nombre de facteurs.

— Il convient de réaliser et de vérifier des graphiques de contrôle qualité pour chaque type de matériau de référence, afin de garantir que le résultat est conforme aux indications fournies.

— L'induction de la dilution de l'échantillon utilisée doit se situer dans la partie linéaire de la courbe de réponse, en particulier pour les calculs quantitatifs. Les échantillons qui se situent au-delà de cette partie linéaire doivent être dilués et faire l'objet d'un nouvel essai. C'est pourquoi il est conseillé de tester au moins trois dilutions à la fois.

— L'écart type ne doit ni dépasser 15 % lorsqu'une triple mesure est effectuée pour chaque dilution d'échantillon, ni dépasser 30 % pour trois expériences indépendantes.

— Il est possible de choisir comme limite de détection une valeur égale à trois fois l'écart type du blanc de solvant ou de la réponse de fond. Une autre méthode consiste à prendre une concentration qui correspond à une réponse supérieure à la réponse de fond sur la courbe d'étalonnage du jour (facteur d'induction 5 fois supérieur au blanc de solvant). Il est possible de choisir comme limite de quantification une valeur cinq à six fois supérieure à l'écart type du blanc de solvant ou de prendre une concentration qui correspond à une réponse supérieure à la réponse de fond sur la courbe d'étalonnage du jour (facteur d'induction 10 fois supérieur au blanc de solvant).

7.4. *Prescriptions spécifiques aux bio-essais réalisés au moyen de kits* [1]

— Il convient de suivre les instructions du fabricant en ce qui concerne la préparation des échantillons et les analyses.

— Les kits d'essai dont la date d'expiration est dépassée ne doivent pas être utilisés.

— Il convient de ne pas utiliser des matériaux ou composants prévus pour d'autres kits.

— La température de conservation des kits d'essais doit se situer dans la plage de températures de conservation spécifiée et leur température de fonctionnement doit être égale à la valeur spécifiée.

— La limite de détection pour les immuno-essais s'obtient en additionnant la moyenne et une valeur égale à trois fois l'écart-type, pour une série de dix analyses du blanc, et en divisant cette somme par la valeur de la pente dans l'équation de régression linéaire.

[1] À ce jour, il n'a pas encore été prouvé que, parmi les bio-essais réalisés au moyen de kits commercialisés, il en existe au moins un qui dispose d'une sensibilité et d'une fiabilité suffisantes pour pouvoir être utilisé à des fins de dépistage de dioxines, aux niveaux requis pour les échantillons de denrées alimentaires et d'aliments des animaux.

▼B

— Il convient d'utiliser des étalons de référence pour les essais en laboratoire, afin de garantir que la réponse à l'étalon se situe dans une plage acceptable.

8. **Indication des résultats**

Dans la mesure où la procédure analytique le permet, les résultats doivent comprendre les teneurs en congénères individuels des PCDD/PCDF et des PCB et les estimations haute, basse et intermédiaire doivent être indiquées, afin de consigner un maximum de données, ce qui permet une interprétation des résultats en fonction de prescriptions spécifiques.

Le rapport doit également mentionner la teneur en graisses de l'échantillon ainsi que la méthode utilisée pour extraire les graisses.

Les taux de récupérations des étalons internes individuels doivent être fournis s'ils se situent en dehors de la plage mentionnée au point 6 ou s'ils dépassent le niveau maximum. Dans tous les autres cas, ils doivent être fournis sur demande.