Trattandosi di un semplice strumento di documentazione, esso non impegna la responsabilità delle istituzioni

►B

DIRETTIVA 2002/69/CE DELLA COMMISSIONE

del ►C1 30 luglio 2002 ◄

che stabilisce i metodi di campionamento e d'analisi per il controllo ufficiale di diossine e la determinazione di PCB diossina-simili nei prodotti alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(GU L 209 del 6.8.2002, pag. 5)

Rettificata da:

►C1 Rettifica, GU L 252 del 20.9.2002, pag. 40 (2002/69/CE)

▼B

DIRETTIVA 2002/69/CE DELLA COMMISSIONE

del ►C1 30 luglio 2002 ◄

che stabilisce i metodi di campionamento e d'analisi per il controllo ufficiale di diossine e la determinazione di PCB diossina-simili nei prodotti alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 85/591/CEE del Consiglio, del 20 dicembre 1985, concernente l'introduzione di modalità di prelievo di campioni e di metodi d'analisi comunitari per il controllo di prodotti destinati all'alimentazione umana [1] ►C1 , in particolare gli articoli 1 e 4, ◄

considerando quanto segue:

(1) Il regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione [2], modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 563/2002 [3], e modificato dal regolamento (CE) n. 2375/2001 del Consiglio [4], stabilisce i limiti massimi di diossine e furani in taluni prodotti alimentari.

(2) La direttiva 89/397/CEE del Consiglio, del 14 giugno 1989, relativa al controllo ufficiale dei prodotti alimentari [5], definisce i principi generali per l'esecuzione del controllo dei prodotti alimentari. La direttiva 93/99/CEE del Consiglio, del 29 ottobre 1993, riguardante misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari [6], introduce un sistema di standard qualitativi per i laboratori incaricati dagli Stati membri di effettuare il controllo ufficiale dei prodotti alimentari.

(3) La direttiva 85/591/CEE ha fissato criteri generali per i metodi di campionamento e analisi. In certi casi è tuttavia necessario stabilire criteri e/o requisiti più specifici cui il metodo d'analisi deve attenersi, per far sì che i laboratori utilizzino metodi d'analisi con livelli di prestazione paragonabili.

(4) Le disposizioni riguardanti le modalità di prelievo di campioni e i metodi d'analisi vengono stabilite in base alle conoscenze attuali e possono essere adeguate in funzione dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche e tecniche.

(5) Le disposizioni stabilite nella presente direttiva si riferiscono unicamente al prelievo di campioni e all'analisi di diossine e PCB diossina-simili ai fini dell'attuazione del regolamento (CE) n. 466/2001 e non pregiudicano la strategia di campionamento, i livelli e la frequenza dei prelievi quali indicati agli allegati III e IV della direttiva 96/23/CE del Consiglio, del 29 aprile 1996, concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti. Esse abrogano le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE [7] e non pregiudicano peraltro i criteri per il prelievo mirato di campioni prescritto dalla decisione 98/179/CE della Commissione, del 23 febbraio 1998, recante modalità d'applicazione per il prelievo ufficiale di campioni al fine della sorveglianza su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei prodotti di origine animale [8].

---

[1] GU L 372 del 31.12.1985, pag. 50.
[2] GU L 77 del 16.3.2001, pag. 1.
[3] GU L 86 del 3.4.2002, pag. 5.
[4] GU L 321 del 6.12.2001, pag. 1.
[5] GU L 186 del 30.6.1989, pag. 23.
[6] GU L 290 del 24.11.1993, pag. 14.
[7] GU L 125 del 23.5.1996, pag. 10.
[8] GU L 65 del 5.3.1998, pag. 31.

▼B

(6) Occorre applicare un approccio attivo per ottenere un insieme di dati affidabili sulla presenza di PCB diossina-simili nei prodotti alimentari. È pertanto necessario fissare criteri generali per i metodi d'analisi da impiegare nella determinazione di PCB diossina-simili nei prodotti alimentari.

(7) Si potrebbe impiegare un metodo di screening ad alto rendimento, di comprovata validità e ampiamente accettato, per selezionare i campioni che presentano livelli significativi di diossina, livelli che occorre poi determinare tramite un metodo di conferma. Occorre pertanto stabilire criteri severi per il metodo di conferma e criteri minimi per il metodo di screening.

(8) Le misure previste dalla presente direttiva sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

Gli Stati membri garantiscono che i campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di diossine e furani, nonché alla determinazione dei livelli di PCB diossina-simili, nei prodotti alimentari, sono prelevati secondo le modalità descritte nell'allegato I.

Articolo 2

Gli Stati membri garantiscono che i campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di diossine e di furani, nonché alla determinazione dei livelli di PCB diossina-simili, nei prodotti alimentari sono conformi ai criteri descritti nell'allegato II.

Articolo 3

Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva al più tardi entro il 28 febbraio 2003. Esse ne informano immediatamente la Commissione.

Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, queste contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate di un siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità di tale riferimento sono decise dagli Stati membri.

Articolo 4

La presente direttiva entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*.

Articolo 5

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

▼B

ALLEGATO I

METODI DI CAMPIONAMENTO PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E LA DETERMINAZIONE DI PCB DIOSSINA-SIMILI IN TALUNI PRODOTTI ALIMENTARI

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Il prelievo dei campioni destinati al controllo ufficiale delle concentrazioni di diossina (PCDD/PCDF), nonché alla determinazione del contenuto di PCB diossina-simili ([1]), nei prodotti alimentari deve essere effettuato secondo i metodi qui descritti. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi delle partite o sottopartite da cui sono prelevati. Il rispetto dei livelli massimi stabiliti nel regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione, che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari, sarà stabilito in base ai livelli determinati nei campioni di laboratorio.

([1]) Tabella TEF per la valutazione dei rischi umani stabiliti dall'OMS sulla base delle conclusioni dell'incontro di Stoccolma del 15-18 giugno 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) pag. 775].

Congenere	Valore TEF
Policlorodibenzodiossine («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
Dibenzofurani («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 «diossina-simili» **Non orto PCB + Mono orto PCB**	
Non orto PCB	
PCB 77	0,0001
PCB 81	0,0001
PCB 126	0,1
PCB 169	0,01
Mono orto PCB	
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

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

▼B

2. **Definizioni**

Partita: quantità identificabile di prodotto alimentare, contenuta in un'unica consegna e avente caratteristiche comuni ufficialmente riconosciute, quali l'origine, la varietà, il tipo d'imballaggio, l'imballatore, lo speditore e la marcatura. Nel caso del pesce e dei prodotti della pesca, è comparabile anche la dimensione.

Sottopartita: porzione di una partita designata per essere sottoposta a campionamento secondo le modalità stabilite. Ogni sottopartita deve essere fisicamente separata e identificabile.

Campione elementare: quantitativo di materiale prelevato in un solo punto della partita o della sottopartita.

Campione globale: aggregazione di tutti i campioni elementari prelevati dalla partita o dalla sottopartita

Campione di laboratorio: parte/quantità rappresentativa del campione globale destinata al laboratorio.

3. **Disposizioni generali**

3.1. *Personale*

Il prelievo è effettuato da persona qualificata e abilitata, secondo quanto specificato dagli Stati membri.

3.2. *Materiale da campionare*

Ciascuna partita da analizzare è oggetto di campionatura separata.

3.3. *Precauzioni*

Durante la campionatura e la preparazione dei campioni di laboratorio, è necessario evitare qualsiasi alterazione che possa modificare il tenore di diossine e di PCB diossina-simili, compromettendo le analisi o la rappresentatività del campione globale.

3.4. *Campioni elementari*

I campioni elementari sono prelevati per quanto possibile in punti diversi della partita o sottopartita. Qualsiasi deroga a tale norma va segnalata nel verbale di cui al punto 3.8.

3.5. *Preparazione del campione globale*

Il campione globale è costituito da tutti i campioni elementari. È di almeno un kg, a meno che ciò non sia poco pratico, ad esempio, nel caso di campionamento di una singola confezione.

3.6. *Suddivisione del campione globale in campioni di laboratorio a fini di attuazione, difesa e riferimento*

I campioni di laboratorio prelevati a fini di attuazione, difesa e riferimento sono ottenuti dal campione globale omogeneizzato, a condizione che tale procedura non sia in contrasto con la regolamentazione degli Stati membri. Le dimensioni dei campioni di laboratorio devono essere tali da consentire almeno lo svolgimento di analisi duplici.

3.7. *Confezionamento e inoltro di campioni globali e campioni di laboratorio*

Ciascun campione globale e di laboratorio va collocato in un recipiente pulito, di materiale inerte, che lo protegga adeguatamente contro qualsiasi fattore di contaminazione, da perdita di analiti per assorbimento nella parete interna del recipiente e dai danni che potrebbero essere causati dal trasporto. Si prendano altresì tutte le precauzioni necessarie per evitare alterazioni della composizione del campione globale e di laboratorio durante il trasporto o la conservazione.

3.8. *Sigillatura ed etichettatura dei campioni globali e di laboratorio*

Ogni campione ufficiale viene sigillato sul luogo del prelievo e identificato secondo le prescrizioni vigenti nello Stato membro. Per ciascun prelievo di campione, si redige un verbale di campionamento che consenta d'identificare con certezza la partita campionata, la data e il luogo di campionamento, nonché qualsiasi informazione supplementare che possa essere utile all'analista.

▼B

4. **Modalità di prelievo dei campioni**

Il metodo di prelievo applicato deve assicurare che il campione globale sia rappresentativo della partita che deve essere controllata.

Numero dei campioni elementari

Nel caso del latte e degli oli, per i quali si può presumere una distribuzione omogenea dei contaminanti in oggetto all'interno di una data partita, è sufficiente prelevare tre campioni elementari da ogni partita che forma il campione globale, indicando il numero della partita. Per gli altri prodotti, il numero minimo di campioni elementari da prelevare per partita è indicato alla tabella 1.

Il peso del campione globale che raggruppa tutti i campioni elementari deve essere di almeno 1 kg (cfr. punto 3.5). I campioni elementari sono di peso analogo. Il peso di un campione elementare deve essere di almeno 100 grammi e dipende dalle dimensioni dei componenti della partita. Qualsiasi deroga a tale norma va segnalata nel verbale di cui al punto 3.8. Secondo quanto disposto dalla decisione 97/747/CE della Commissione, del 27 ottobre 1997, che fissa i livelli e le frequenze di prelievo di campioni, previsti dalla direttiva 96/23/CE del Consiglio, per il controllo di talune sostanze e dei loro residui in alcuni prodotti di origine animale [1], un campione di uova di gallina è costituito da almeno 12 uova (per partite sfuse e per partite formate da confezioni singole, si vedano le tabelle 1 e 2).

Tabella 1

Numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita

Peso della partita (in kg)	Numero minimo di campioni elementari da prelevare
< 50	3
50 a 500	5
> 500	10

Se la partita è costituita da confezioni singole, il numero di confezioni che va prelevato per formare un campione globale è indicato nella tabella 2.

Tabella 2

Numero di confezioni (campioni elementari) da prelevera per formare un campione globale se la partita è costituita da confezioni singole

Numero di confezioni o unità della partita	Numero minimo di confezioni o unità da prelevare
1 a 25	1 confezione o unità
26 a 100	circa il 5 %, almeno 2 confezioni o unità
> 100	circa il 5 %, fino a un massimo di 10 confezioni o unità

5. **Conformità della partita o sottopartita alle specifiche**

Il laboratorio di controllo procede a una doppia analisi del campione di laboratorio e calcola la media dei risultati, qualora il risultato ottenuto nella prima analisi ecceda il livello massimo o sia inferiore al livello massimo di un valore che non superi il 20 %. La partita è accettata se il risultato della prima analisi è al di sotto del livello massimo di un valore superiore al 20 % o, dove la doppia analisi è necessaria, se la media è conforme al corrispondente livello massimo indicato nel regolamento (CE) n. 466/2001.

[1] GU L 303 del 6.11.1997, pag. 12.

▼B

ALLEGATO II

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E SPECIFICHE PER I METODI D'ANALISI IMPIEGATI NEL CONTROLLO UFFICIALE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E NELLA DETERMINAZIONE DI PCB DIOSSINA-SIMILI IN TALUNI PRODOTTI ALIMENTARI

1. **Finalità e campo d'applicazione**

Queste specifiche si applicano all'analisi di prodotti alimentari nell'ambito dei controlli ufficiali del tenore di diossine [policlorodibenzodiossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF)] e della determinazione di PCB diossina-simili.

Il controllo della presenza di diossine nei prodotti alimentari può essere effettuato mediante una strategia che preveda un metodo di screening per selezionare i campioni con livelli di diossine e di PCB diossina-simili superiori al livello considerato o inferiori di un valore al di sotto del 30-40 %. Occorre poi determinare/confermare la concentrazione di diossine nei campioni con livelli significativi tramite un metodo di conferma.

I metodi di screening sono impiegati per rilevare la presenza di diossine e PCB diossina-simili ai livelli considerati. Essi sono dotati di una grande capacità di trattamento di campioni, il che consente di passare al vaglio un'elevata quantità di campioni per ricercare quelli che potrebbero rivelarsi positivi. Questi metodi sono specialmente concepiti in modo da evitare i falsi risultati negativi.

I metodi di conferma forniscono informazioni complete o complementari che consentono di individuare e quantificare in maniera inequivocabile le diossine e i PCB diossina-simili al livello considerato.

2. **Contesto**

Poiché i campioni ambientali e biologici (inclusi i campioni di prodotti alimentari) generalmente contengono miscele complesse di diversi congeneri di diossine, per agevolare la valutazione dei rischi è stato elaborato il concetto di «fattori di tossicità equivalente» (TEF). I TEF consentono di esprimere concentrazioni di miscele di PCDD e PCDF sostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e, di recente, alcune forme di PCB non orto e orto clorosostituiti aventi proprietà simili a quelle delle diossine in equivalenti tossici (TE) di 2,3,7,8-TCDD (cfr. nota 1, allegato I).

Le concentrazioni delle singole sostanze in un dato campione vengono dapprima moltiplicate per il corrispondente TEF e poi sommate per ottenere la concentrazione totale dei composti diossina-simili espressa in TE.

Per il calcolo del «limite superiore», si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale alla soglia di determinazione.

Per il calcolo del «limite inferiore», si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale a zero.

Per il calcolo del «valore intermedio», si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale alla metà della soglia di quantificazione.

3. **Requisiti applicabili alla garanzia della qualità nella preparazione dei campioni**

— Occorre adottare tutte le precauzioni possibili per evitare qualsiasi contaminazione durante ogni fase del campionamento e dell'analisi.

— I campioni devono essere conservati e trasportati in appositi contenitori di vetro, alluminio, polipropilene o polietilene, dopo avere rimosso eventuali tracce di polvere di carta dal contenitore. Gli strumenti in vetro devono essere risciacquati con solventi sottoposti a un controllo volto a determinare la presenza di diossine.

— La conservazione e il trasporto devono svolgersi in modo da preservare l'integrità del campione alimentare.

— Se necessario, triturare e mescolare bene ogni campione di laboratorio ricorrendo a un metodo che garantisca una completa omogeneizzazione (ad esempio, la triturazione deve consentire al materiale di passare attraverso un setaccio a maglie di 1 mm); prima della triturazione, i campioni devono essere asciugati, nel caso il livello di umidità sia troppo elevato.

— Occorre fare un'analisi in bianco, ovvero effettuare l'intera procedura analitica senza il campione.

▼B

— Il peso del campione utilizzato per l'estrazione deve essere tale da rispondere ai requisiti relativi alla sensibilità.

— Esistono numerose procedure specifiche per la preparazione dei campioni, che possono essere impiegate in modo soddisfacente per i prodotti considerati. Le procedure devono essere convalidate in base a orientamenti riconosciuti sul piano internazionale.

4. **Requisiti applicabili ai laboratori**

— I laboratori devono dimostrare la validità del metodo nell'intervallo di tolleranza del livello considerato, ad esempio, 0,5x, 1x e 2x il livello considerato, con un coefficiente di variazione accettabile per analisi ripetute. Per ulteriori informazioni sui criteri di validità, cfr. il punto 5.

— Il limite di quantificazione per un metodo di conferma non deve essere superiore a un quinto del livello considerato, per garantire coefficienti di variazione accettabili nell'intervallo summenzionato.

— Si devono costantemente effettuare controlli in bianco ed esperimenti o analisi dei campioni di controllo con l'aggiunta di indicatori (di preferenza, se disponibile, materiale di riferimento certificato), quali misure interne di garanzia della qualità.

— La riuscita partecipazione a studi condotti in collaborazione con altri laboratori che valutano la competenza del laboratorio è il modo migliore per dimostrarne la perizia nell'ambito di analisi specifiche. Tuttavia, il buon esito della partecipazione a studi condotti con altri laboratori, ad esempio, su campioni di terreno o di acque residue, non dimostra necessariamente che il laboratorio sia altrettanto competente a trattare campioni di prodotti alimentari o mangimi, caratterizzati da livelli di contaminazione minore. È pertanto requisito imprescindibile la partecipazione regolare a studi condotti in collaborazione con altri laboratori sulla determinazione di diossina e di PCB diossina-simili nelle corrispondenti matrici di prodotti alimentari/mangimi.

— In conformità con quanto prescritto dalla direttiva 93/99/CEE del Consiglio, i laboratori devono essere accreditati da un organismo riconosciuto in base alla Guida ISO 58, che certifichi l'applicazione della garanzia della qualità relativamente ai metodi d'analisi. I laboratori devono essere accreditati in base alla norma ISO/IEC/17025:1999.

5. **Requisiti applicabili alla procedura d'analisi per le diossine e i PCB diossina-simili**

Requisiti di base di validità delle procedure d'analisi:

— *Elevata sensibilità e limiti di rilevabilità bassi*. Per quanto concerne le PCDD e i PCDF, le quantità rilevabili devono essere dell'ordine del picogrammo di TE (10^{-12} g), data l'estrema tossicità di alcuni di questi composti. È noto che i PCB si presentano in quantità più elevate rispetto alle PCDD e ai PCDF. Per quanto concerne la maggior parte dei congeneri di PCB, una sensibilità dell'ordine del nanogrammo (10^{-9} g) è sufficiente. Tuttavia, per la determinazione dei congeneri più tossici di PCB diossina-simili (in particolare i congeneri non orto sostituiti) si deve ottenere la stessa sensibilità delle PCDD e dei PCDF.

— *Alta selettività (specificità)*. Occorre distinguere le PCDD, i PCDF e i PCB diossina-simili da una moltitudine di altri composti che, estratti simultaneamente dal campione e suscettibili d'interferire, sono presenti in concentrazioni di molto superiori a quelle degli analiti da rilevare. Per quanto concerne i metodi di gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS), è necessario distinguere tra vari congeneri, in particolare tra quelli tossici (ad esempio, i diciassette PCDD e PCDF sostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e i PCB diossina-simili) e altri congeneri. Mediante biotest dovrebbe essere possibile determinare selettivamente i valori di TE, quale somma di PCDD, PCDF e PCB diossina-simili.

— *Estrema accuratezza (esattezza e precisione)*. La determinazione deve fornire una stima valida della concentrazione reale presente in un campione. È necessario porre estrema cura (accuratezza della misurazione: grado di concordanza tra il risultato di una misurazione e il valore reale o assegnato del misurando) per evitare che i risultati dell'analisi di un campione siano respinti a causa della scarsa affidabilità della stima dei TE. L'accuratezza è la risultante di esattezza (differenza tra il valore medio misurato per un analita in un materiale certificato, espressa in percentuale di tale valore) e precisione (la precisione viene generalmente calcolata sotto forma di scarto-tipo; essa include la ripetibilità e la riproducibilità e indica il grado di concordanza tra i risultati ottenuti applicando ripetutamente la procedura sperimentale in determinate condizioni).

I metodi di screening possono comprendere biotest e metodi GC/MS, mentre i metodi di conferma sono costituiti dalla gascromatografia ad

▼B

alta risoluzione e dalla spettrometria ad alta risoluzione (HRGC/HRMS). Si devono osservare i seguenti criteri per il valore totale in TE:

	Metodi di screening	Metodi di conferma
Percentuale di falsi negativi	< 1 %	
Esattezza		– 20 % a + 20 %
CV (coefficiente di variazione)	< 30 %	< 15 %

6. **Requisiti specifici applicabili ai metodi d'analisi GC/MS con finalità di screening o di conferma**

— Quale primo passo dell'analisi, da effettuare, ad esempio prima dell'estrazione per convalidare la procedura d'analisi, occorre aggiungere standard interni di PCDD/F clorosostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e marcati con ^{13}C (e standard interni di PCB diossina-simile marcati con ^{13}C, se si devono determinare PCB diossina-simili). Va aggiunto almeno un congenere per ciascun gruppo omologo di PCDD/F da tetra a octaclorati (e almeno un congenere per ciascun gruppo omologo di PCB diossina-simile, se si devono determinare PCB diossina-simili) (in alternativa, è possibile aggiungere almeno un congenere per ciascuna funzione di registrazione di ioni selezionati tramite spettrografia di massa utilizzata per il controllo di PCDD/F e PCB diossina-simile. Si consiglia vivamente, soprattutto per i metodi di conferma, di utilizzare l'insieme dei diciassette standard interni di PCDD/F clorosostituiti alle posizioni 2,3,7,8 marcati con ^{13}C, nonché la totalità dei dodici standard interni di PCB diossina-simile marcati con ^{13}C (nel caso si debbano determinare PCB diossina-simili).

  Vanno inoltre determinati i fattori di risposta relativa per quei congeneri ai quali non è stato aggiunto alcun analogo marcato con ^{13}C, utilizzando soluzioni di taratura adeguate.

— Per i prodotti alimentari d'origine vegetale e per i prodotti alimentari d'origine animale con un contenuto di grasso inferiore al 10 %, l'aggiunta di standard interni prima dell'estrazione è obbligatoria. Per i prodotti d'origine animale con un contenuto di grasso superiore al 10 %, gli standard interni possono essere aggiunti o prima dell'estrazione o dopo l'estrazione del grasso. Occorre convalidare adeguatamente l'efficacia dell'estrazione, a seconda della fase in cui sono stati introdotti gli standard interni e del modo in cui i risultati sono riportati (sulla base del prodotto o del grasso).

— Prima dell'analisi GC/MS, occorre aggiungere 1 o 2 standard di recupero (surrogato).

— È necessario effettuare il controllo del recupero. Per i metodi di conferma, i recuperi dei singoli standard interni devono essere compresi tra il 60 % e il 120 %. Recuperi inferiori o superiori per singoli congeneri, in particolare alcune dibenzodiossine e alcuni dibenzofurani epta e octaclorati, sono accettabili, purché il loro contributo al valore TE non superi il 10 % del valore totale TE (tenendo conto unicamente di PCDD/F). Per quanto concerne i metodi di screening, i recuperi devono essere compresi tra il 30 % e il 140 %.

— È opportuno separare le diossine dai composti clorurati interferenti, quali i PCB e gli eteri clorurati di difenile, ricorrendo ad adeguate tecniche cromatografiche (di preferenza tramite una colonna di florisil, d'allumina e/o di carbone).

— La separazione gascromatografica degli isomeri deve essere adeguata (overlapping < 25 % tra 1,2,3,4,7,8-HxCDD e 1,2,3,6,7,8-HxCDD).

— Per la determinazione, si consiglia di fare riferimento al metodo «EPA Method 1613, Revision B: Tetra- through Octachlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC-HRMS», o ad un altro metodo con criteri di rendimento equivalenti.

— La differenza tra il livello massimo e il livello minimo non deve essere superiore al 20 % per i prodotti alimentari con una contaminazione da diossina di circa 1 pg. WHO/TE/g di base lipidica (tenendo conto unicamente di PCDD/PCDF). La stessa prescrizione si applica ai prodotti alimentari a basso contenuto di grasso che presentano livelli di contaminazione dell'ordine di circa 1 pg. WHO/TE/g di prodotto. Per livelli di contaminazione inferiori, ad esempio 0,50 pg. TE/g di prodotto, la differenza tra il livello massimo e il livello minimo può essere dell'ordine del 25-40 %.

▼B

7. **Metodi d'analisi di screening**

7.1. *Introduzione*

Il metodo di screening consente di applicare vari approcci analitici: un approccio puramente di screening e un approccio quantitativo.

Approccio di screening

La risposta dei campioni è confrontata con quella di un campione di riferimento al livello considerato. I campioni la cui risposta è inferiore a quella del campione di riferimento sono considerati negativi, mentre quelli con risposta superiore sono ritenuti positivi. Requisiti:

— In ogni serie di prove si devono includere un campione di riferimento e uno in bianco, estratti e analizzati allo stesso tempo e alle medesime condizioni. Il campione di riferimento deve presentare una risposta nettamente superiore a quella del bianco.

— Si devono includere campioni di riferimento supplementari con concentrazione pari a 0,5x e 2x il livello considerato, per dimostrare l'efficacia del test nell'intervallo considerato per il controllo del livello considerato.

— Qualora si analizzino altre matrici, occorre dimostrare la validità dei campioni di riferimento, utilizzando di preferenza campioni il cui livello di TE, stabilito tramite HRGC/HRMS, sia equivalente a quello del campione di riferimento o di un bianco arricchito.

— Poiché nei biotest non si possono utilizzare standard interni, i test di ripetibilità sono estremamente importanti per ottenere informazioni sullo scarto-tipo nell'ambito di una serie di test. Il coefficiente di variazione deve essere inferiore al 30 %.

— Per quanto concerne i biotest, occorre definire quali sono i composti-bersaglio, le potenziali interferenze e il valore massimo tollerato per il bianco.

Approccio quantitativo

L'approccio quantitativo comprende obbligatoriamente una serie di diluizioni-tipo, un processo di purificazione e di misurazione doppio o triplo, nonché analisi in bianco e controlli di recupero. Il risultato può essere espresso in TE, dando per scontato che i composti responsabili del segnale soddisfano il principio di TE. A tal fine, si può impiegare la TCDD (o una miscela-tipo di diossine/furani) per elaborare una curva di taratura che consenta di calcolare il livello di TE nell'estratto e, di conseguenza, nel campione. Tale risultato è poi corretto con il livello di TE calcolato per un campione in bianco (per tenere conto di impurezze derivanti dai solventi e dalle sostanze chimiche utilizzate) e per il recupero (quest'ultima quantità è calcolata a partire dal livello di TE in un campione di controllo qualità la cui concentrazione è equivalente a quella del livello massimo considerato). È fondamentale tenere conto che una parte della perdita apparente del recupero può essere dovuta agli effetti della matrice e/o alle differenze tra i valori dei TEF nei biotest e i valori dei TEF ufficiali stabiliti dall'OMS.

7.2. *Requisiti per i metodi d'analisi utilizzati per lo screening*

— Lo screening può essere effettuato tramite metodi d'analisi GC/MS e biotest. Ai metodi GC/MS si applicano le prescrizioni stabilite al punto 6. Prescrizioni specifiche sono stabilite al punto 7.3 per i biotest cellulari, e al punto 7.4 per i biotest realizzati con kit.

— Si devono fornire informazioni sul numero di risultati falsi positivi e falsi negativi di un'ampia serie di campioni al di sopra e al di sotto dei livelli massimi o dei valori delle soglie d'intervento, raffrontati al contenuto di TE determinato tramite metodo analitico di conferma. La percentuale reale di falsi negativi deve essere inferiore all'1 %. Affinché il metodo di screening risulti vantaggioso, la percentuale di campioni falsi positivi deve essere sufficientemente bassa.

— I risultati positivi devono essere sempre convalidati tramite un metodo analitico di conferma (HRGC/HRMS). I campioni corrispondenti a una vasta gamma di TE devono inoltre essere confermati tramite HRGC/HRMS (circa 2-10 % dei campioni negativi). Si devono fornire dati sulle corrispondenze tra i risultati dei biotest e quelli della HRGC/HRMS.

7.3. *Requisiti specifici per i biotest cellulari*

— Quando si effettua un biotest, si deve utilizzare in ogni prova una serie di concentrazioni di riferimento di TCDD o una miscela di diossine/furani (curva di risposta con un $R^2 > 0,95$ per una dose completa).

▼B

Tuttavia, ai fini dello screening, si può utilizzare nell'analisi dei campioni a bassa concentrazione una curva dettagliata nei livelli bassi.

— Per i risultati del biotest in un intervallo di tempo costante, è opportuno usare una concentrazione di riferimento di TCDD (circa 3x il limite di determinazione) su un modulo di controllo della qualità. In alternativa, si può utilizzare la risposta relativa di un campione di riferimento paragonata a una curva di taratura di TCDD, dato che la risposta delle cellule può dipendere da molteplici fattori.

— Si raccomanda di compilare e verificare i grafici del controllo della qualità (QC) per ogni tipo di materiale di riferimento, per garantire che il risultato sia conforme alle linee guida indicate.

— L'induzione della diluizione utilizzata per il campione deve situarsi nella parte lineare della curva di risposta, in particolare per i calcoli quantitativi. I campioni che non rientrano nella parte lineare della curva di risposta devono essere diluiti e nuovamente analizzati. Si consiglia pertanto di analizzare almeno 3 diluizioni alla volta.

— Lo scarto percentuale-tipo non deve essere superiore al 15 % quando si effettua una determinazione tripla per ogni diluizione del campione, né superiore al 30 % fra tre esperimenti indipendenti.

— È possibile scegliere come limite di rilevamento un valore equivalente a 3 volte lo scarto-tipo della soluzione di solvente in bianco o della risposta di fondo. Un altro metodo consiste nell'applicare una risposta che sia superiore alla risposta di fondo (fattore d'induzione 5 volte il solvente in bianco) calcolata dalla curva di taratura del giorno. È possibile scegliere come limite di quantificazione un valore equivalente a 5-6 volte lo scarto-tipo della soluzione di solvente in bianco o della risposta di fondo oppure applicare una risposta che sia nettamente superiore alla risposta di fondo (fattore d'induzione 10 volte il solvente in bianco) calcolata dalla curva di taratura del giorno.

7.4. *Requisiti specifici per i biotest effettuati con kit* ([1])

— Occorre seguire le istruzioni del fabbricante relative alla preparazione dei campioni e alle analisi.

— Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza indicata.

— Non si devono utilizzare materiali o componenti previsti per altri kit.

— I kit vanno conservati e utilizzati alle condizioni di temperatura di conservazione e di impiego indicate.

— Il limite di rilevazione per gli immunodosaggi è pari alla somma della media e 3x lo scarto tipo, basandosi su 10 analisi ripetute del bianco, diviso per il valore della pendenza dell'equazione di regressione lineare.

— È opportuno impiegare standard di riferimento per le prove di laboratorio, al fine di garantire che la risposta allo standard rientri in un intervallo di valori accettabile.

8. **Comunicazione dei risultati**

A condizione che il metodo d'analisi impiegato lo consenta, i risultati dell'analisi devono contenere i livelli dei singoli congeneri di PCDD/F e PCB, nonché essere indicati come limite inferiore, limite superiore e valore intermedio, onde fornire la maggior quantità di dati possibile e permettere così d'interpretare i risultati in base alle prescrizioni specifiche.

La relazione deve inoltre menzionare il contenuto lipidico del campione e il metodo impiegato per l'estrazione del grasso.

I recuperi dei singoli standard interni devono essere forniti se si situano al di fuori dell'intervallo menzionato al punto 6 e qualora eccedano il livello massimo; negli altri casi, dietro richiesta.

([1]) I kit per biotest attualmente in commercio non hanno dato prove sufficienti di sensibilità e affidabilità, tali da poterli utilizzare per rilevare la presenza di diossine ai livelli richiesti nei campioni di prodotti alimentari e mangimi.