REGOLAMENTO (UE) N. 589/2014 DELLA COMMISSIONE

del 2 giugno 2014

che stabilisce i metodi di campionamento e di analisi per il controllo dei livelli di diossine, PCB diossina-simili e PCB non diossina-simili in alcuni prodotti alimentari e che abroga il regolamento (UE) n. 252/2012

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004,, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali ([1]), in particolare l'articolo 11, paragrafo 4,

considerando quando segue:

(1) Il regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione ([2]) stabilisce i tenori massimi per i PCB non diossina-simili, le diossine e i furani e per la somma di diossine, furani e PCB diossina-simili in alcuni prodotti alimentari.

(2) La raccomandazione 2013/711/UE della Commissione ([3]) definisce i livelli di azione al fine di stimolare un approccio proattivo volto a ridurre la presenza di policlorodibenzo-para-diossine e di policlorodibenzofurani (PCDD/F) nonché di PCB diossina-simili nei prodotti alimentari. Tali livelli di azione sono uno strumento che permette alle autorità competenti e agli operatori di evidenziare i casi in cui è opportuno identificare le fonti di contaminazione e prendere provvedimenti per la loro riduzione o eliminazione.

(3) Il regolamento (UE) n. 252/2012 della Commissione, del 21 marzo 2012 ([4]), stabilisce disposizioni specifiche relative ai metodi di campionamento e di analisi da applicare per il controllo ufficiale.

(4) Le disposizioni del presente regolamento riguardano unicamente i metodi di campionamento e di analisi impiegati per determinare i livelli di diossine, PCB diossina-simili e PCB non diossina-simili in applicazione del regolamento (CE) n. 1881/2006 e della raccomandazione 2013/711/UE. Esse non modificano la strategia di campionamento, i livelli e la frequenza del campionamento indicati negli allegati III e IV della direttiva 96/23/CE del Consiglio ([5]) né i criteri da seguire per un campionamento mirato di cui alla decisione 98/179/CE della Commissione ([6]).

(5) Per identificare i campioni con livelli significativi di PCDD/F e di PCB diossina-simili può essere impiegato un metodo di screening di validità ampiamente riconosciuta e ad alto throughput (preferibilmente che selezioni campioni che superano i livelli di azione e che assicuri la selezione di campioni che superano i livelli massimi). I livelli di PCDD/F e di PCB diossina-simili in questi campioni devono essere determinati con un metodo analitico di conferma. È quindi opportuno stabilire per il metodo di screening prescrizioni appropriate, che assicurino un tasso di falsi conformi in rapporto ai livelli massimi inferiore al 5 %, e prescrizioni rigorose per i metodi analitici di conferma. Inoltre i metodi di conferma permettono la determinazione dei livelli anche nel range di background basso. Questo è importante per seguire le tendenze nel tempo, la valutazione dell'esposizione e la ri-valutazione dei livelli massimi e dei livelli di azione.

(6) Per quanto riguarda il campionamento di pesci molto grandi è necessario specificare le modalità di campionamento per armonizzare i metodi impiegati nell'Unione.

([1]) GU L 165 del 30.4.2004, pag. 1.
([2]) Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione, del 19 dicembre 2006, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (GU L 364 del 20.12.2006, pag. 5).
([3]) Raccomandazione 2013/711/UE della Commissione, del 3 dicembre 2013, sulla riduzione della presenza di diossine, furani e PCB nei mangimi e negli alimenti (GU L 323 del 4.12.2013, pag. 37).
([4]) Regolamento (UE) n. 252/2012 della Commissione, del 21 marzo 2012, che stabilisce i metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei livelli di diossine, PCB diossina-simili e PCB non diossina-simili in alcuni prodotti alimentari e che abroga il regolamento (CE) n. 1883/2006 (GU L 84 del 23.3.2012, pag. 1).
([5]) 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 e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE (GU L 125 del 23.5.1996, pag. 10).
([6]) 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 (GU L 65 del 5.3.1998, pag. 31).

(7) Nei pesci della stessa specie originari della stessa regione il livello di diossine, di PCB diossina-simili e di PCB non diossina-simili può variare in funzione della dimensione e/o dell'età. Inoltre il livello di diossine, di PCB diossina-simili e di PCB non diossina-simili non è necessariamente lo stesso in tutte le parti del pesce. Per il campionamento dei pesci è quindi necessario specificare le modalità di campionamento e di preparazione dei campioni per armonizzare i metodi impiegati nell'Unione.

(8) È importante che i risultati analitici siano resi noti e interpretati in modo uniforme affinché possano essere armonizzate le misure esecutive adottate nell'Unione.

(9) In aggiunta alla gascromatografia/spettrometria di massa ad alta risoluzione (GC/HRMS) i progressi e gli sviluppi tecnici hanno dimostrato che anche la gascromatografia/spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS) può essere impiegata come metodo di conferma per il controllo di conformità con il livello massimo (LM). È pertanto opportuno sostituire il regolamento (UE) n. 252/2012 con un nuovo regolamento che preveda l'utilizzo della gascromatografia/spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS) come metodo di conferma appropriato per il controllo di conformità con il livello massimo.

(10) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Ai fini del presente regolamento si applicano le definizioni e le abbreviazioni figuranti nell'allegato I.

Articolo 2

Il campionamento per il controllo ufficiale dei livelli di diossine, furani, PCB diossina-simili e PCB non diossina-simili nei prodotti alimentari elencati nella sezione 5 dell'allegato del regolamento (CE) n. 1881/2006 è effettuato secondo i metodi di cui all'allegato II del presente regolamento.

Articolo 3

La preparazione dei campioni e le analisi per il controllo dei livelli di diossine, furani e PCB diossina-simili nei prodotti alimentari elencati nella sezione 5 dell'allegato del regolamento (CE) n. 1881/2006 sono effettuate secondo i metodi specificati nell'allegato III del presente regolamento.

Articolo 4

Le analisi per il controllo ufficiale dei livelli di PCB non diossina-simili nei prodotti alimentari elencati nella sezione 5 dell'allegato del regolamento (CE) n. 1881/2006 sono effettuate in conformità alle prescrizioni per i metodi di analisi specificate nell'allegato IV del presente regolamento.

Articolo 5

Il regolamento (UE) n. 252/2012 è abrogato.

I riferimenti al regolamento abrogato si intendono fatti al presente regolamento.

Articolo 6

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

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

Fatto a Bruxelles, il 2 giugno 2014

Per la Commissione

Il presidente

José Manuel BARROSO

ALLEGATO I

DEFINIZIONI E ABBREVIAZIONI

I. DEFINIZIONI

Ai fini del presente regolamento si applicano le definizioni figuranti nell'allegato I della decisione 2002/657/CE della Commissione ([1]).

Ai fini del presente regolamento si applicano inoltre le seguenti definizioni:

1.1. *Livello di azione*: livello di una data sostanza, definito nell'allegato della raccomandazione 2013/711/UE, che, nel caso in cui ne sia rilevato il superamento, determina l'avvio di indagini per individuare la fonte di tale sostanza.

1.2. *Metodi di screening*: i metodi impiegati per la selezione di campioni con livelli di PCDD/F e di PCB diossina-simili superiori ai livelli massimi o di azione, in grado di consentire un alto throughput di campioni a costi commisurati all'efficacia, in modo da accrescere la possibilità di scoprire nuovi incidenti con alta esposizione e rischi per la salute dei consumatori. I metodi di screening si basano su metodi bioanalitici o GC-MS. I risultati derivanti da campioni che superano il valore di cut-off relativamente al controllo di conformità con il livello massimo vanno verificati mediante una nuova analisi completa del campione originale avvalendosi di un metodo di conferma.

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

1.4. *Metodi bioanalitici*: metodi basati sull'applicazione di principi biologici, come dosaggi cellulari, dosaggi dei recettori o immunodosaggi. Questi metodi non danno risultati al livello del congenere, ma solo un'indicazione ([2]) del livello di TEQ, espresso in equivalenti bioanalitici (BEQ) in considerazione del fatto che non tutti i composti presenti in un estratto di campione che produce una risposta nel test possono soddisfare i requisiti del principio di TEQ.

1.5. *Recupero apparente del biodosaggio:* il livello di BEQ calcolato a partire dalla curva di calibrazione della TCDD o del PCB 126 corretto del bianco e poi diviso per il livello TEQ determinato mediante il metodo di conferma. Mira a correggere fattori quali la perdita di PCDD/PCDF e composti diossina-simili durante le fasi di estrazione e clean-up, composti coestratti che aumentano o diminuiscono la risposta (effetti agonistici e antagonistici), la qualità del fit della curva o le differenze tra i valori TEF e REP. Il recupero apparente del biodosaggio è calcolato a partire da idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello massimo o di azione.

1.6. *Metodi semiquantitativi:* metodi che danno un'indicazione approssimativa della concentrazione dell'analita presunto, quando il risultato numerico non risponde ai requisiti dei metodi quantitativi.

1.7. *Limite di quantificazione specifico accettato di un singolo congenere in un campione:*il tenore più basso dell'analita che può essere misurato con ragionevole certezza statistica nel rispetto dei criteri di identificazione definiti in norme internazionalmente riconosciute quali, ad esempio, la norma EN 16215:2012 (Alimenti per animali — Determinazione di diossine e PCB diossina-simili mediante GC/HRMS e di PCB indicatori mediante GC/HRMS) e/o nei metodi EPA 1613 e 1688 riveduti.

Il limite di quantificazione di un congenere individuale può essere identificato come:

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

oppure, se per motivi tecnici il calcolo del rapporto segnale/rumore non fornisce risultati affidabili,

b) il punto di concentrazione più basso su una curva di calibrazione che produce una deviazione accettabile (≤30 %) e coerente (misurata almeno all'inizio e alla fine della serie analitica di campioni) rispetto al fattore di risposta relativo medio calcolato per tutti i punti sulla curva di calibrazione per ciascuna serie di campioni ([3]).

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

([2]) I metodi bioanalitici non sono specifici ai congeneri inclusi nel sistema TEF. Nell'estratto del campione possono essere presenti altri composti strutturalmente affini AhR-attivi che contribuiscono alla risposta globale. Pertanto, i risultati bioanalitici non sono una stima, ma piuttosto un'indicazione del livello di TEQ nel campione.

([3]) Il limite di quantificazione è calcolato a partire dal punto di concentrazione più basso, tenendo conto del recupero degli standard interni e delle grandezze dei campioni.

1.8. *Upperbound*: valore calcolato considerando pari al limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato.

1.9. *Lowerbound*: valore calcolato considerando pari a zero il contributo di ogni congenere non quantificato.

1.10. *Mediumbound*: valore calcolato considerando pari alla metà del limite di quantificazione il contributo di ogni congenere non quantificato.

1.11. *Partita*: quantità identificabile di un alimento contenuta in un'unica consegna e avente caratteristiche comuni ufficialmente riconosciute quali l'origine, la varietà, il tipo di imballaggio, l'imballatore, lo speditore e la marcatura. Nel caso del pesce e dei prodotti della pesca, deve essere comparabile anche la dimensione dei pesci. La partita può essere considerata tale anche se la dimensione e/o il peso dei pesci non sono comparabili, ma in tal caso deve essere applicata una procedura di campionamento specifica.

1.12. *Sottopartita*: porzione di una partita di grandi dimensioni cui è applicato il metodo di campionamento; ogni sottopartita deve essere fisicamente separata e identificabile.

1.13. *Campione elementare*: quantità di materiale prelevato in un solo punto della partita o della sottopartita.

1.14. *Campione globale*: campione ottenuto riunendo tutti i campioni elementari prelevati dalla partita o dalla sottopartita.

1.15. *Campione di laboratorio:* parte o quantità rappresentativa del campione globale destinata al laboratorio.

II. ABBREVIAZIONI

BEQ	Equivalenti bioanalitici
GC	Gascromatografia
HRMS	Spettrometria di massa ad alta risoluzione
LRMS	Spettrometria di massa a bassa risoluzione
MS/MS	Spettrometria di massa tandem
PCB	Policlorobifenili
PCDD	Policlorodibenzo-p-diossine
PCDF	Policlorodibenzofurani
QC	Controllo di qualità
REP	Potenziale relativo
TEF	Fattore di equivalenza tossica
TEQ	Equivalenti tossici
TCDD	Tetraclorodibenzodiossina
U	Incertezza di misura estesa

ALLEGATO II

METODI DI CAMPIONAMENTO PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF), PCB DIOSSINA-SIMILI E PCB NON DIOSSINA-SIMILI IN ALCUNI PRODOTTI ALIMENTARI

I. CAMPO DI APPLICAZIONE

I campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di diossine (PCDD/PCDF), PCB diossina-simili e PCB non diossina-simili (nel seguito «diossine e PCB») nei prodotti alimentari sono prelevati secondo i metodi indicati nel presente allegato. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi delle partite o sottopartite da cui sono prelevati. Il rispetto dei tenori massimi stabiliti nel regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, è stabilito in base ai tenori determinati nei campioni di laboratorio.

II. DISPOSIZIONI GENERALI

1. **Personale**

Il prelievo dei campioni è effettuato da personale autorizzato designato dallo Stato membro.

2. **Prodotto da campionare**

Ciascuna partita o sottopartita da analizzare è campionata separatamente.

3. **Precauzioni**

Nel corso del prelievo e della preparazione dei campioni sono prese precauzioni per evitare qualsiasi alterazione che possa modificare il tenore di diossine e di PCB, incidere negativamente sulla determinazione analitica e compromettere la rappresentatività dei campioni globali.

4. **Campioni elementari**

I campioni elementari sono prelevati per quanto possibile in vari punti distribuiti nell'insieme della partita o della sottopartita. Ogni deroga a tale procedura è segnalata nel verbale di cui al punto II.8 del presente allegato.

5. **Preparazione del campione globale**

Il campione globale è ottenuto unendo i campioni elementari. Il suo peso è di almeno 1 kg, a meno che questo non sia possibile per ragioni pratiche, ad esempio nel caso in cui il campione sia costituito da una sola confezione o il prodotto abbia un valore commerciale molto elevato.

6. **Campioni replicati**

I campioni replicati nel quadro di procedure di ricorso e di arbitrato sono prelevati dal campione globale omogeneizzato, a condizione che tale procedura sia conforme alla legislazione vigente nello Stato membro in materia di diritti degli operatori del settore alimentare. La dimensione dei campioni di laboratorio destinati a controlli deve essere tale da consentire almeno un'analisi in doppio.

7. **Confezionamento e invio dei campioni**

Ciascun campione è collocato in un recipiente pulito di materiale inerte che lo protegga adeguatamente da qualsiasi contaminazione, dalla perdita di analiti per adsorbimento nella parete interna del recipiente e dai danni che possono essere causati dal trasporto. Sono prese tutte le precauzioni necessarie per evitare alterazioni della composizione del campione durante il trasporto o la conservazione.

8. **Sigillatura ed etichettatura dei campioni**

Ogni campione prelevato per uso ufficiale è sigillato sul luogo del prelievo e identificato secondo le prescrizioni vigenti nello Stato membro.

Per ciascun prelievo di campione è redatto un verbale di campionamento che consenta di identificare con certezza la partita e che indichi la data e il luogo del campionamento, nonché ogni altra informazione utile all'analista.

III. PIANO DI CAMPIONAMENTO

Il metodo di campionamento applicato deve garantire che il campione globale sia rappresentativo della partita o della sottopartita che deve essere controllata.

1. **Divisione delle partite in sottopartite**

Le partite di grandi dimensioni sono suddivise in sottopartite, purché sia possibile separarle fisicamente. La tabella 1 si applica alle grandi partite di prodotti commercializzati sfusi (ad esempio, oli vegetali). Per gli altri prodotti si applica la tabella 2. Tenuto conto del fatto che il peso delle partite non è sempre un multiplo esatto di quello delle sottopartite, il peso delle sottopartite può superare il peso indicato al massimo del 20 %.

Tabella 1:

Suddivisione delle partite in sottopartite per i prodotti commercializzati sfusi

Peso della partita (in tonnellate)	Peso o numero delle sottopartite
≥ 1 500	500 tonnellate
> 300 e < 1 500	3 sottopartite
≥ 50 e £ 300	100 tonnellate
< 50	—

Tabella 2:

Suddivisione delle partite in sottopartite per gli altri prodotti

Peso della partita (in tonnellate)	Peso o numero delle sottopartite
≥ 15	15-30 tonnellate
< 15	—

2. **Numero dei campioni elementari**

Il peso del campione globale che raggruppa tutti i campioni elementari è di almeno 1 kg (cfr. punto II.5 del presente allegato).

Il numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita o da una sottopartita è indicato nelle tabelle 3 e 4.

Nel caso di prodotti liquidi sfusi la partita (o la sottopartita) viene accuratamente mescolata, per quanto possibile, e nella misura in cui la qualità del prodotto non viene alterata, manualmente o con mezzi meccanici immediatamente prima del prelievo. In tal caso i contaminanti si considerano distribuiti in modo omogeneo all'interno della partita o della sottopartita. È quindi sufficiente prelevare tre campioni elementari da una partita o sottopartita per formare il campione globale.

I campioni elementari sono di peso simile. Ciascun campione elementare deve pesare almeno 100 grammi.

Ogni deroga a questa procedura deve essere segnalata nel verbale di cui al punto II.8. del presente allegato. Secondo quanto disposto dalla decisione 97/747/CE 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, il campione globale di uova di gallina è costituito da almeno 12 uova (per le partite sfuse e per le partite costituite da confezioni singole si applicano le tabelle 3 e 4).

Tabella 3:

Numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita o da una sottopartita

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

Per le partite o sottopartite costituite da confezioni o unità singole, il numero di confezioni o di unità che va prelevato per formare un campione globale è indicato nella tabella 4.

Tabella 4:

Numero di confezioni o unità (campioni elementari) da prelevare per formare il campione globale se la partita o sottopartita è costituita da singole confezioni o unità

Numero di confezioni o unità nella partita/sottopartita	Numero di confezioni o unità da prelevare
da 1 a 25	almeno 1 confezione o unità
da 26 a 100	5 % circa, almeno 2 confezioni o unità
> 100	5 % circa, massimo 10 confezioni o unità

3. **Disposizioni specifiche per il prelievo dei campioni in partite contenenti pesci interi di dimensione e peso comparabili**

I pesci sono considerati di dimensione e peso comparabili se le differenze di dimensione e peso non sono superiori al 50 % circa.

Il numero di campioni elementari da prelevare dalla partita è indicato nella tabella 3. Il peso del campione globale che raggruppa tutti i campioni elementari è di almeno 1 kg (cfr. punto II.5).

— Se la partita da cui è prelevato il campione è costituita da pesci di piccole dimensioni (di peso inferiore a 1 kg circa), il pesce intero è prelevato come campione elementare per formare il campione globale. Se il campione globale che ne risulta pesa più di 3 kg, i campioni elementari possono essere costituiti dalla parte centrale, del peso di almeno 100 grammi, dei pesci che formano il campione globale. La parte intera cui si applica il livello massimo è utilizzata per l'omogeneizzazione del campione.

  La parte centrale del pesce è quella in cui si trova il centro di gravità, che nella maggior parte dei casi si situa in corrispondenza della pinna dorsale (se il pesce ne è provvisto) o a uguale distanza dall'apertura branchiale e dall'ano.

— Se la partita da cui è prelevato il campione è costituita da pesci di maggiori dimensioni (di peso superiore a 1 kg circa), il campione elementare è costituito dalla parte centrale del pesce. Il peso di un campione elementare è di almeno 100 grammi.

  Nel caso di pesci di dimensioni intermedie (da 1 a 6 kg circa) il campione elementare è costituito da una trancia prelevata nella parte centrale del pesce dalla colonna vertebrale al ventre.

  Nel caso di pesci di dimensioni molto grandi (di peso superiore a 6 kg circa), il campione elementare è prelevato dal muscolo dorsolaterale destro (vista frontale) nella parte centrale del pesce. Qualora il prelievo di questa porzione dalla parte centrale del pesce comporti un considerevole danno economico, può essere considerato sufficiente il prelievo di tre campioni elementari di almeno 350 grammi ciascuno, indipendentemente dalle dimensioni della partita; in alternativa, per formare il campione elementare rappresentativo del livello di diossine nell'intero pesce possono essere prelevate parti uguali dal muscolo vicino alla coda e dal muscolo vicino alla testa.

4. **Campionamento di partite contenenti pesci interi di dimensione e/o peso differenti**

— Si applicano le disposizioni del punto III.3 per quanto riguarda la costituzione del campione.

— Nel caso in cui predomini una classe/categoria di dimensione o peso (80 % circa o più della partita) il campione è prelevato dai pesci appartenenti alla classe/categoria predominante. Tale campione è considerato rappresentativo dell'intera partita.

— Nel caso in cui non predomini una particolare classe/categoria di dimensione o peso, occorre assicurarsi che i pesci selezionati per costituire il campione siano rappresentativi della partita. Il «Guidance document on sampling of whole fishes of different size and/or weight» [1] fornisce orientamenti specifici per questo tipo di situazioni.

5. **Campionamento nella fase della distribuzione al dettaglio**

Il prelievo di campioni di prodotti alimentari nella fase della distribuzione al dettaglio è effettuato, nella misura del possibile, conformemente alle disposizioni del punto III.2 del presente allegato.

[1] http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm.

Se questo non è possibile, può essere impiegato un altro metodo di campionamento, purché garantisca una sufficiente rappresentatività della partita o sottopartita campionata.

IV. CONFORMITÀ DELLA PARTITA O SOTTOPARTITA ALLE SPECIFICHE

1. **PCB non diossina-simili**

La partita è accettata se il risultato analitico non supera il livello massimo di PCB non diossina-simili fissato dal regolamento (CE) n. 1881/2006, tenendo conto dell'incertezza di misura.

La partita non è conforme al livello massimo stabilito dal regolamento (CE) n. 1881/2006 se il risultato analitico upperbound, confermato da un'analisi in doppio (*), supera il livello massimo oltre ogni ragionevole dubbio, tenendo conto dell'incertezza di misura. La media delle due determinazioni, tenendo conto dell'incertezza di misura, è utilizzata per il controllo di conformità.

Può tenersi conto dell'incertezza di misura in uno dei seguenti modi:

— calcolando l'incertezza estesa, utilizzando un fattore di copertura pari a 2 corrispondente a un livello di affidabilità del 95 % circa. Una partita o sottopartita non è conforme se il valore misurato meno U supera il livello consentito stabilito;

— stabilendo il limite di decisione (CCα) secondo le disposizioni della decisione 2002/657/CE della Commissione (punto 3.1.2.5 dell'allegato I di tale decisione; caso di sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito). Una partita o sottopartita non è conforme se il valore misurato è pari o superiore al CCα.

Le norme di cui sopra si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione utilizzato per il controllo ufficiale. Per le analisi effettuate nel quadro di procedure di ricorso o di arbitrato valgono le norme nazionali.

2. **Diossine (PCDD/PCDF) e PCB diossina-simili**

La partita è accettata se il risultato di una singola analisi:

— eseguita con un metodo di screening con un tasso di falsi conformi inferiore al 5 % indica che il livello non supera i livelli massimi fissati dal regolamento (CE) n. 1881/2006 rispettivamente per PCDD/F e per la somma di PCDD/F e PCB diossina-simili;

— eseguita con un metodo di conferma non supera i livelli massimi fissati dal regolamento (CE) n. 1881/2006 rispettivamente per PCDD/F e per la somma di PCDD/F e PCB diossina-simili tenendo conto dell'incertezza di misura.

Per i dosaggi di screening è stabilito un valore di cut-off per la decisione sulla conformità ai livelli di interesse stabiliti rispettivamente per PCDD/F o per la somma di PCDD/F e PCB diossina-simili.

La partita non è conforme al livello massimo stabilito dal regolamento (CE) n. 1881/2006 se il risultato analitico upperbound ottenuto con un metodo di conferma e confermato da un'analisi in doppio (**) supera il livello massimo oltre ogni ragionevole dubbio tenendo conto dell'incertezza di misura. La media delle due determinazioni, tenendo conto dell'incertezza di misura, è utilizzata per il controllo di conformità.

Può tenersi conto dell'incertezza di misura in uno dei seguenti modi:

— calcolando l'incertezza estesa, utilizzando un fattore di copertura pari a 2 corrispondente a un livello di affidabilità del 95 % circa. Una partita o sottopartita non è conforme se il valore misurato meno U supera il livello consentito stabilito. Nel caso di una determinazione separata di PCDD/F e PCB diossina-simili, la somma dell'incertezza estesa stimata dei risultati analitici separati di PCDD/F e PCB diossina-simili deve essere utilizzata per la somma di PCDD/F e PCB diossina-simili;

— stabilendo il limite di decisione (CCα) secondo le disposizioni della decisione 2002/657/CE (punto 3.1.2.5 dell'allegato I di tale decisione; caso di sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito). Una partita o sottopartita non è conforme se il valore misurato è pari o superiore al CCα.

Le norme di cui sopra si applicano al risultato analitico ottenuto sul campione utilizzato per il controllo ufficiale. Per le analisi effettuate nel quadro di procedure di ricorso o di arbitrato valgono le norme nazionali.

(*) L'analisi in doppio è necessaria in caso di non conformità del risultato della prima determinazione in cui sono stati impiegati metodi di conferma con standard interni marcati con ^{13}C per il rispettivo analita. L'analisi in doppio è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione incrociata interna o di una mescolanza accidentale dei campioni. Se l'analisi è effettuata nell'ambito di un incidente di contaminazione, la conferma mediante analisi in doppio può essere omessa nel caso in cui la tracciabilità permetta di stabilire il legame tra i campioni selezionati per l'analisi e l'incidente e il livello riscontrato sia notevolmente superiore al livello massimo.

(**) Le precisazioni e le prescrizioni relative all'analisi in doppio per il controllo dei livelli di azione sono identiche a quelle indicate alla nota (*) per i livelli massimi.

V. Superamento dei livelli di azione

I livelli di azione fungono da strumento per la selezione dei campioni nei casi in cui è opportuno identificare una fonte di contaminazione e prendere provvedimenti per la sua riduzione o eliminazione. I metodi di screening permettono di stabilire appropriati valori di cut-off per la selezione di tali campioni. Qualora siano necessarie azioni significative per identificare una fonte e ridurre o eliminare la contaminazione può essere opportuno confermare il superamento del livello di azione mediante un'analisi in doppio eseguita con un metodo di conferma e tenendo conto dell'incertezza di misura (**).

ALLEGATO III

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E PRESCRIZIONI PER I METODI DI ANALISI IMPIEGATI NEL CONTROLLO UFFICIALE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E DI PCB DIOSSINA-SIMILI IN ALCUNI PRODOTTI ALIMENTARI

1. CAMPO DI APPLICAZIONE

Le prescrizioni di cui al presente allegato si applicano alle analisi dei prodotti alimentari effettuate ai fini del controllo ufficiale dei livelli di policlorodibenzo-p-diossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF) 2,3,7,8-sostituiti e di policlorobifenili diossina-simili (PCB diossina-simili) nonché per altre finalità di legge.

Il monitoraggio della presenza di PCDD/F e di PCB diossina-simili nei prodotti alimentari può essere effettuato con due differenti tipologie di metodi analitici:

a) **Metodi di screening**

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

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

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

b) **Metodi di conferma**

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

2. PREMESSA

Per il calcolo delle concentrazioni di equivalenti tossici (TEQ), le concentrazioni delle singole sostanze in un dato campione sono moltiplicate per il rispettivo fattore di equivalenza tossica (TEF) stabiliti dall'Organizzazione mondiale della sanità ed elencati nell'appendice del presente allegato, quindi sommate per ottenere la concentrazione totale di composti diossina-simili espressa in TEQ.

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

3. PRESCRIZIONI DI GARANZIA DELLA QUALITÀ

— Devono essere adottate misure per evitare contaminazioni incrociate durante ogni fase del campionamento e dell'analisi.

— I campioni devono essere conservati e trasportati in contenitori di vetro, alluminio, polipropilene o polietilene, che ne permettano la conservazione senza influenzare i livelli di PCDD/F e di PCB diossina-simili. Le tracce di polvere di carta devono essere rimosse dal contenitore.

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

— Se necessario, macinare finemente e mescolare bene ogni campione di laboratorio ricorrendo a un metodo che garantisca una completa omogeneizzazione (ad esempio, macinazione che consenta al materiale di passare attraverso un setaccio a maglie di 1 mm); prima della macinazione, i campioni devono essere asciugati, qualora il tenore di umidità sia troppo elevato.

— È di importanza generale il controllo dei reagenti, della vetreria e delle apparecchiature per evitare che influenzino i risultati espressi in TEQ o BEQ.

— È effettuata un'analisi in bianco, eseguendo l'intera procedura analitica senza il campione.

— Per i metodi bioanalitici è di grande importanza verificare che la vetreria e i solventi utilizzati nell'analisi siano esenti da composti che interferiscono con la rilevazione dei composti bersaglio nel working range (campo di applicazione). La vetreria deve essere risciacquata con solventi e/o riscaldata a temperature che consentano di eliminare dalla superficie le tracce di PCDD/F, composti diossina-simili e composti interferenti.

— La quantità del campione utilizzato per l'estrazione deve essere sufficiente a permettere la conformità ai requisiti in relazione a un working range sufficientemente basso comprendente le concentrazioni di livelli massimi o di azione.

— Le procedure specifiche di preparazione dei campioni utilizzate per i prodotti considerati sono conformi a linee guida internazionalmente accettate.

— Nel caso dei pesci, è necessario eliminare la pelle, dato che il livello massimo si applica al muscolo privo di pelle. Occorre però rimuovere accuratamente e completamente tutti i resti di muscolo e di grasso che aderiscono alla parte interna della pelle e aggiungerli al campione da analizzare.

4. PRESCRIZIONI PER I LABORATORI

— Come prescritto dal regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio ([1]), i laboratori devono essere accreditati da un organismo riconosciuto operante in conformità alla Guida ISO 58, per garantire che alle loro analisi sia applicata l'assicurazione qualità. I laboratori devono essere accreditati in base alla norma EN ISO/IEC 17025.

— La competenza del laboratorio è dimostrata dalla partecipazione regolare ed efficace a studi condotti in collaborazione con altri laboratori per la determinazione di PCDD/F e di PCB diossina-simili nelle matrici di alimenti e nei range di concentrazioni corrispondenti.

— I laboratori che applicano metodi di screening per il controllo di routine dei campioni instaurano una stretta cooperazione con i laboratori che applicano il metodo di conferma per il controllo di qualità e per la conferma del risultato analitico dei campioni sospetti.

5. PRESCRIZIONI DI BASE PER LA PROCEDURA DI ANALISI PER LE DIOSSINE (PCDD/F) E I PCB DIOSSINA-SIMILI

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

— Per i PCDD/F le quantità rilevabili devono situarsi nel range superiore del femtogrammo (10^{-15}g), data l'estrema tossicità di alcuni di questi composti. Per la maggior parte dei congeneri dei PCB è già sufficiente il limite di quantificazione dell'ordine del nanogrammo (10^{-9}g). Tuttavia, per la misura dei congeneri più tossici dei PCB diossina-simili (in particolare i congeneri non orto-sostituiti) il limite inferiore del working range deve raggiungere i livelli bassi del picogrammo (10^{-12}g).

5.2. **Alta selettività (specificità)**

— Occorre distinguere tra PCDD/F e PCB diossina-simili e una moltitudine di altri composti coestratti che possono generare un'interferenza, presenti anche in concentrazioni superiori di vari ordini di grandezza a quelle degli analiti di interesse. Per i metodi di gascromatografia/spettrometria di massa (GC-MS), è necessaria una differenziazione tra i vari congeneri, in particolare tra quelli tossici (ad esempio, i diciassette PCDD/F 2,3,7,8-sostituiti e i dodici PCB diossina-simili) e gli altri congeneri.

— I metodi bioanalitici permettono di rilevare i composti bersaglio come somma di PCDD/F e/o PCB diossina-simili. Il clean-up del campione ha lo scopo di eliminare i composti che causano risultati falsi non conformi o che possono diminuire la risposta, causando risultati falsi conformi.

([1]) Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (GU L 165 del 30.4.2004, pag. 1).

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

— Per i metodi GC-MS la determinazione fornisce una stima valida della vera concentrazione in un campione. È necessaria un'alta accuratezza (accuratezza della misura: grado di concordanza tra il risultato di una misura e il valore vero o assegnato del misurando) per evitare che il risultato dell'analisi di un campione sia respinto a causa della scarsa affidabilità del livello di TEQ determinato. L'accuratezza è espressa come *esattezza* (differenza tra il valore medio misurato per un analita in un materiale certificato e il suo valore certificato, espressa in percentuale di tale valore) e *precisione* (deviazione standard relativa RSD_R calcolata in base a risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità).

— Per i metodi bioanalitici è determinato il recupero apparente del biodosaggio.

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

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

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

5.5. **Limite di quantificazione**

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

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

5.6. **Criteri analitici**

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

	Screening con metodi bioanalitici o fisico-chimici	Metodi di conferma
Tasso di falsi conformi (*)	< 5 %	
Esattezza		da – 20 % a + 20 %
Ripetibilità (RSD_r)	< 20 %	
Riproducibilità in laboratorio (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

(*) Rispetto ai livelli massimi.

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

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

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

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

— Controllo dell'eventuale soppressione della risposta cellulare e della citotossicità

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

— Controllo di qualità sui campioni conformi

Sono confermati dal 2 al 10 % circa dei campioni conformi, secondo la matrice del campione e l'esperienza del laboratorio.

— Determinazione dei tassi di falsi conformi a partire dai dati QC.

È determinato il tasso dei risultati falsi conformi dello screening di campioni al di sotto e al di sopra del livello massimo o del livello di azione. I tassi reali di falsi conformi sono inferiori al 5 %.

Se si dispone di un minimo di 20 risultati confermati per matrice/gruppo di matrici dal controllo di qualità dei campioni conformi, da questa base di dati sono tratte conclusioni sul tasso di falsi conformi. I risultati dei campioni analizzati in ring trial o durante incidenti di contaminazione che coprono un range di concentrazione fino a per esempio 2 volte il livello massimo (LM) possono essere inclusi nel minimo di 20 risultati per la valutazione del tasso di falsi conformi. I campioni coprono i pattern di congeneri più frequenti, rappresentanti varie fonti.

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

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

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

— Anche per i metodi bioanalitici applicati in condizioni di ripetibilità, la RSD_r intralaboratorio è di norma inferiore alla riproducibilità RSD_r.

6. PRESCRIZIONI SPECIFICHE RELATIVE AI METODI DI ANALISI GC-MS CON FINALITÀ DI SCREENING O DI CONFERMA

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

— La differenza tra il livello upperbound e il livello lowerbound non deve essere superiore al 20 % per la conferma del superamento dei livelli massimi o, ove opportuno, di azione.

6.2. **Controllo dei recuperi**

— Per convalidare la procedura di analisi, occorre aggiungere all'inizio dell'analisi, ad esempio prima dell'estrazione, 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. Deve essere aggiunto almeno un congenere per ciascuno dei gruppi omologhi da tetra a octaclorati di PCDD/F e almeno un congenere per ciascuno dei gruppi omologhi di PCB diossina-simile (in alternativa, almeno un congenere per ciascuna funzione di registrazione di ioni selezionati tramite spettrometria di massa utilizzata per il monitoraggio di PCDD/F e PCB diossina-simili). Nel caso dei metodi di conferma, sono utilizzati tutti i 17 standard interni di PCDD/F 2,3,7,8-sostituiti marcati con ^{13}C e tutti i 12 standard interni di PCB diossina-simile marcati con ^{13}C.

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

— Per i prodotti alimentari di origine vegetale e per i prodotti alimentari di origine animale con un contenuto di grassi inferiore al 10 %, l'aggiunta di standard interni prima dell'estrazione è obbligatoria. Per i prodotti alimentari di origine animale con tenore di grassi superiore al 10 %, gli standard interni possono essere aggiunti prima o dopo l'estrazione dei grassi. È effettuata un'appropriata validazione dell'efficienza dell'estrazione, a seconda della fase in cui sono introdotti gli standard interni e del modo in cui i risultati sono espressi (sulla base del prodotto o dei grassi).

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

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

6.3. **Rimozione delle sostanze interferenti**

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

— È sufficiente la separazione gascromatografica degli isomeri (< 25 % da picco a picco tra 1,2,3,4,7,8-HxCDF e 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. **Calibrazione con curva standard**

— Il range della curva di calibrazione copre il corrispondente range dei livelli massimi o di azione.

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

— Per la GC-HRMS:

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

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

— Per la GC-MS/MS:

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

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

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

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

7. PRESCRIZIONI SPECIFICHE PER I METODI BIOANALITICI

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

Un metodo di screening in via di principio classifica un campione come conforme o sospetto non conforme. Per questo, il livello di BEQ calcolato è comparato al valore di cut-off (cfr. 7.3.). I campioni al di sotto del valore di cut-off sono dichiarati conformi, i campioni uguali o superiori al valore di cut-off sono dichiarati sospetti non conformi e devono essere analizzati con un metodo di conferma. In pratica, un livello di BEQ corrispondente a 2/3 del livello massimo può servire come il valore di cut-off a condizione di garantire un tasso di falsi conformi inferiore al 5 % e un tasso accettabile di risultati falsi non conformi. Con livelli massimi distinti per PCDD/F e per la somma di PCDD/F e PCB diossina-simili, il controllo della conformità dei campioni senza frazionamento richiede appropriati valori di cut-off dei biodosaggi per i PCDD/F. Per il controllo dei campioni che superano i livelli di azione, il valore di cut-off può essere costituito da una percentuale appropriata del rispettivo livello di azione.

Inoltre, nel caso di alcuni metodi bioanalitici, un livello indicativo espresso in BEQ può essere dato per i campioni compresi nel working range e che superano il limite di reporting (cfr. 7.1.1. e 7.1.6.).

7.1. **Valutazione della risposta al test**

7.1.1. *Prescrizioni generali*

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

— Le soluzioni standard e gli estratti dei campioni sono testati almeno in doppio. Nel caso di uso di doppi, una soluzione standard o un estratto di controllo testati in 4-6 pozzetti distribuiti sulla piastra producono una risposta o una concentrazione (possibile solo nel working range) in base a un CV<15 %.

7.1.2. *Calibrazione*

7.1.2.1. Calibrazione con curva standard

— I livelli nei campioni possono essere stimati comparando la risposta al test a una curva di calibrazione della TCDD (o del PCB 126 o di una miscela standard PCDD/F/PCB diossina-simili) per calcolare il livello BEQ nell'estratto e poi nel campione.

— Le curve di calibrazione contengono da 8 a 12 concentrazioni (almeno in doppio) con concentrazioni sufficienti nella parte inferiore della curva (working range). Particolare attenzione è prestata alla qualità del fit della curva nel working range. Il valore R^2, come tale, è di scarsa o nessuna utilità nella stima della bontà del fit in regressione non lineare. Un migliore fit è ottenuto minimizzando la differenza tra i livelli calcolati e osservati nel working range (ad esempio minimizzando la somma dei quadrati residui).

— Il livello stimato nell'estratto del campione è quindi corretto del livello BEQ calcolato per un campione bianco di matrice/solvente (per tener conto delle impurità provenienti dai solventi e dalle sostanze chimiche utilizzate) e del recupero apparente (calcolato a partire dal livello BEQ di idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello massimo o di azione). Quando si effettua una correzione del recupero, il recupero apparente deve essere sempre entro il range richiesto (cfr. punto 7.1.4.). I campioni di riferimento utilizzati per la correzione del recupero devono rispondere alle prescrizioni di cui al punto 7.2.

7.1.2.2. Calibrazione con campioni di riferimento

In alternativa, può essere utilizzata una curva di calibrazione preparata a partire da almeno 4 campioni di riferimento (cfr. punto 7.2): un bianco matrice, più tre campioni di riferimento a 0,5x, 1,0x e 2,0x il livello massimo o di azione, il che rende superflua la correzione del bianco e del recupero. In tal caso, la risposta al test corrispondente a 2/3 del livello massimo (cfr. 7.3) può essere calcolata direttamente a partire da questi campioni e utilizzata come valore di cut-off. Per il controllo dei campioni che superano i livelli di azione, il valore di cut-off può essere costituito da una percentuale appropriata di tali livelli.

7.1.3. *Determinazione separata di PCDD/F e PCB diossina-simili*

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

7.1.4. *Recuperi apparenti del biodosaggio*

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

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

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

7.1.6. *Limite di reporting*

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

7.2. **Uso di campioni di riferimento**

— I campioni di riferimento rappresentano la matrice campione, i pattern di congeneri e i range di concentrazione per PCDD/F e PCB diossina-simili attorno al livello massimo o di azione.

— Una bianco di procedura o di preferenza un bianco matrice e un campione di riferimento al livello massimo o di azione devono essere inclusi in ciascuna serie di test. Questi campioni devono essere estratti e testati nello stesso momento in condizioni identiche. Il campione di riferimento deve presentare una risposta notevolmente più elevata del campione bianco, in modo da garantire l'idoneità del test. Questi campioni possono essere utilizzati per le correzioni del bianco e del recupero.

— I campioni di riferimento scelti per effettuare una correzione del recupero sono rappresentativi dei campioni del test, il che significa che i pattern di congeneri non portano a una sottostima dei livelli.

— Campioni di riferimento supplementari, per esempio a 0,5 × e 2 × il livello di massimo o di azione possono essere inclusi per dimostrare la performance adeguata del test nel range di interesse per il controllo del livello massimo o di azione. Combinati, questi campioni possono essere utilizzati per calcolare i livelli BEQ nei campioni del test (7.1.2.2).

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

È stabilito il rapporto tra i risultati bioanalitici in BEQ e i risultati da metodi di conferma in TEQ [ad esempio mediante esperimenti di calibrazione matrix-matched, con campioni di riferimento spiked a 0, 0,5 ×, 1 × e 2 × il livello massimo (LM), con 6 ripetizioni ad ogni livello (n = 24)]. I fattori di correzione (bianco e recupero) possono essere stimati in base a questo rapporto, ma sono controllati in ogni serie di test includendo bianchi di procedura/matrice e campioni di recupero (7.2).

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

([1]) Le attuali prescrizioni si basano sui TEF pubblicati in: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

In pratica, il valore di cut-off (in BEQ) può essere calcolato nei modi seguenti (cfr. figura 1).

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

$$\text{Valoredicut-off} = BEQ_{DL} - s_{y,x} * t_{\alpha,f=m-2}\sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \overline{x})^2/Q_{xx}}$$

dove:

BEQ_{DL} BEQ corrispondente al limite di decisione del metodo di conferma, ossia al livello massimo compresa l'incertezza di misura

$s_{y,x}$ deviazione standard residua

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

m numero totale dei punti di calibrazione (indice j)

n numero di ripetizioni ad ogni livello

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

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

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^{m}(x_i - \overline{x})^2$ parametro somma dei quadrati,

i = indice per il punto di calibrazione i

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

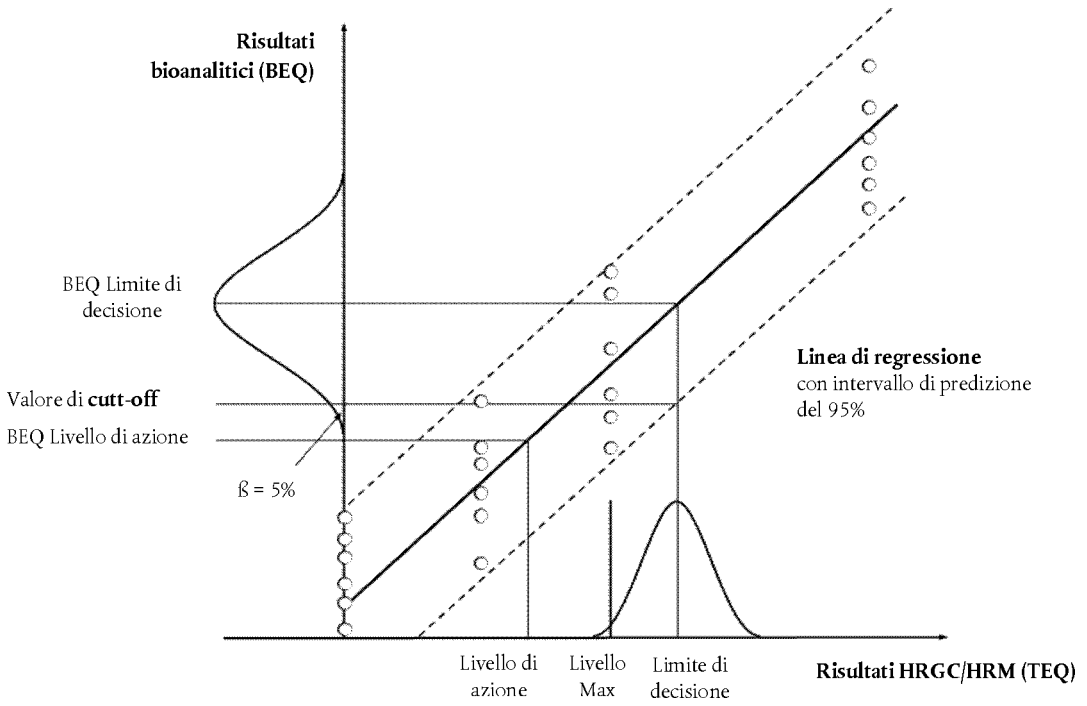
$$\text{Valoredicut-off} = BEQ_{DL} - 1{,}64 \times SD_R$$

con

SD_R deviazione standard dei risultati del biodosaggio a BEQ_{DL}, misurata in condizioni di riproducibilità in laboratorio

7.3.3. Calcolo come valore medio dei risultati bioanalitici (in BEQ, corretto del bianco e del recupero) a partire dall'analisi multipla di campioni (n≥6) contaminati a 2/3 del livello massimo o di azione, sulla base dell'osservazione che questo livello sarà prossimo al valore di cut-off determinato come indicato ai punti 7.3.1 o 7.3.2.

Figura 1.



Calcolo dei valori di cut-off in base a un livello di fiducia del 95 % implicante un tasso di falsi conformi < 5 % e un RSD_R < 25 %:

1. dalla banda *inferiore* dell'intervallo di predizione del 95 % al limite di decisione del metodo di conferma;

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

7.3.4. Restrizioni dei valori di cut-off

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

7.4. **Caratteristiche di performance**

— Poiché nei metodi bioanalitici non possono essere utilizzati standard interni, sono eseguiti test di ripetibilità per ottenere informazioni sulla deviazione standard nelle e tra le serie di test. La ripetibilità è inferiore al 20 %, la riproducibilità in laboratorio inferiore al 25 % in base ai livelli calcolati in BEQ dopo correzione del bianco e del recupero.

— Nel processo di validazione il test deve permettere di distinguere tra un campione bianco e un livello al valore di cut-off, consentendo l'identificazione dei campioni al di sopra del corrispondente valore di cut-off (cfr. 7.1.2).

— Sono definiti i composti bersaglio, le possibili interferenze e i livelli massimi tollerabili di bianco.

— La deviazione standard percentuale nella risposta o nella concentrazione calcolata a partire dalla risposta (possibile solo nel working range) di una determinazione triplice di un estratto del campione non è superiore al 15 %.

— I risultati non corretti dei campioni di riferimento espressi in BEQ (bianco e livello massimo o di azione) sono utilizzati per valutare la performance del metodo bioanalitico su un periodo di tempo costante.

— Le carte di controllo qualità (QC) per i bianchi di procedura e ciascun tipo di campione di riferimento sono registrate e controllate per assicurare che la performance analitica sia conforme ai requisiti, in particolare per i bianchi di procedura per quanto riguarda la differenza minima richiesta rispetto all'estremo inferiore del working range e per i campioni di riferimento per quanto riguarda la riproducibilità in laboratorio. I bianchi di procedura devono essere ben controllati per evitare risultati falsi conformi quando sono sottratti.

— I risultati dei metodi di conferma dei campioni sospetti e del 2-10 % dei campioni conformi (minimo di 20 campioni per matrice) sono raccolti e utilizzati per valutare la performance del metodo di screening e il rapporto tra BEQ e TEQ. Questa base di dati può essere utilizzata per la ri-valutazione dei valori di cut-off applicabili ai campioni di routine per le matrici validate.

— La buona performance del metodo può essere dimostrata anche con la partecipazione a ring trial. Anche i risultati dei campioni analizzati in ring trial, che coprano un range di concentrazione fino a per esempio due volte il limite massimo, possono essere inclusi nella valutazione del tasso di falsi conformi, se il laboratorio è in grado di dimostrare la sua buona performance. I campioni coprono i pattern di congeneri più frequenti, rappresentanti varie fonti.

— Durante gli incidenti, i valori di cut-off possono essere ri-valutati, tenendo conto della matrice e dei pattern di congeneri specifici del singolo incidente.

8. REPORTING DEL RISULTATO

Metodi di conferma

— Se la procedura analitica impiegata lo consente, i risultati dell'analisi contengono i livelli dei singoli congeneri di PCDD/F e di PCB diossina-simili che sono espressi come lowerbound, upperbound e mediumbound, per includere un massimo di informazione nel reporting dei risultati e permettere così l'interpretazione dei risultati secondo prescrizioni specifiche.

— Il rapporto indica anche il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/F, PCB diossina-simili e lipidi. Il tenore lipidico del campione è determinato e indicato per i campioni di alimenti con livelli massimi espressi su base grassa e una concentrazione di materia grassa attesa compresa tra lo 0 e il 2 % (in corrispondenza alla legislazione vigente); per gli altri campioni la determinazione del tenore lipidico è facoltativa.

— I recuperi dei singoli standard interni devono essere indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 6.2, se il livello massimo è superato (nel qual caso occorre indicare i recuperi per una delle due analisi in doppio) e in altri casi su richiesta.

— Poiché nel decidere della conformità di un campione occorre tener conto dell'incertezza di misura, deve essere indicato anche questo parametro. I risultati analitici sono pertanto espressi come x +/- U, dove x è il risultato analitico e U l'incertezza di misura estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 che dà un livello di fiducia del 95 % circa. Nel caso di una determinazione separata di PCDD/F e PCB diossina-simili, la somma dell'incertezza estesa stimata dei risultati analitici separati di PCDD/F e PCB diossina-simili deve essere utilizzata per la somma di PCDD/F e PCB diossina-simili.

— Se si tiene conto dell'incertezza di misura applicando il CCα (come descritto nell'allegato II, punto IV. 2), questo parametro è indicato.

— I risultati devono essere espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei tenori massimi stabiliti dal regolamento (CE) n. 1881/2006.

Metodi di screening bioanalitici

— Il risultato dello screening è espresso come conforme o sospetto non conforme («sospetto»).

— Inoltre, per PCDD/F e/o PCB diossina-simili può essere dato un risultato espresso in equivalenti bioanalitici (BEQ) (non TEQ) (cfr. allegato III, punto 1). I campioni con una risposta al di sotto del limite di reporting sono espressi come inferiori al limite di reporting.

— Per ciascun tipo di matrice del campione il rapporto menziona il livello massimo o di azione su cui si basa la valutazione.

— Il rapporto menziona il tipo di test applicato, il principio base del test e il tipo di calibrazione.

— Il rapporto indica anche il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/F, PCB diossina-simili e lipidi. Il tenore lipidico del campione è determinato e indicato per i campioni di alimenti con livelli massimi o di azione espressi su base grassa e una concentrazione di materia grassa attesa compresa tra 0 e 2 % (in corrispondenza alla legislazione vigente); per gli altri campioni la determinazione del tenore lipidico è facoltativa.

— In caso di campioni sospetti non conformi il rapporto deve includere una nota sulle azioni da intraprendere. La concentrazione di PCDD/F e la somma di PCDD/F e PCB diossina-simili nei campioni con livelli elevati deve essere determinata/confermata mediante un metodo di conferma.

Appendice dell'ALLEGATO III

OMS-TEF per la valutazione dei rischi nell'uomo in base alle conclusioni della riunione di esperti dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) — Programma internazionale sulla sicurezza delle sostanze chimiche (International Programme on Chemical Safety — IPCS) tenutasi a Ginevra nel giugno 2005 [Martin Van den Berg et al. 2005, «The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds». Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)]

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

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

ALLEGATO IV

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E PRESCRIZIONI PER I METODI DI ANALISI IMPIEGATI NEL CONTROLLO UFFICIALE DEI LIVELLI DI PCB NON DIOSSINA-SIMILI (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180) IN ALCUNI PRODOTTI ALIMENTARI

Le prescrizioni di cui al presente allegato si applicano alle analisi dei prodotti alimentari effettuate ai fini del controllo ufficiale dei livelli di policlorobifenili non diossina-simili (PCB non diossina-simili) e per altre finalità di legge.

1. **Metodi di rilevazione applicabili:**

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

2. **Identificazione e conferma degli analiti di interesse:**

— Tempo di ritenzione relativo rispetto agli standard interni o agli standard di riferimento (deviazione accettabile di +/– 0,25 %).

— Separazione gascromatografica dei sei PCB indicatori (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 e PCB 180) dalle sostanze interferenti, specie PCB coeluenti, in particolare se i livelli dei campioni si situano entro i limiti legali e la non conformità deve essere confermata.

[I congeneri che spesso coeluiscono sono per esempio PCB 28/31, PCB 52/69 e PCB 138/163/164. Per la GC-MS devono essere considerate anche le possibili interferenze di frammenti di congeneri più altamente clorurati.]

— Per le tecniche GC-MS:

— Monitoraggio di almeno:

— due ioni specifici per HRMS;

— due ioni specifici di m/z > 200 o tre ioni specifici di m/z > 100 per LRMS;

— 1 precursore e 2 ioni prodotti per MS-MS.

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

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

Intensità relativa degli ioni qualificatori rispetto allo ione bersaglio	GC-EI-MS (deviazione relativa)	GC-CI-MS, GC-MS^n (deviazione relativa)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % — 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % — 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % (*)	± 50 % (*)

(*) Essendo disponibile un numero sufficiente di frammenti di massa con intensità relativa > 10 %, non è raccomandato l'uso di ioni qualificatori con intensità relativa inferiore al 10 % rispetto allo ione bersaglio.

— Per GC-ECD:

Conferma dei risultati che oltrepassano la tolleranza con due colonne GC con fasi stazionarie di diversa polarità.

3. **Dimostrazione della performance del metodo**

Validazione nel range del livello massimo (da 0,5 a 2 volte il livello massimo) con un coefficiente di variazione accettabile per le analisi ripetute (cfr. prescrizioni per la precisione intermedia al punto 8).

4. **Limite di quantificazione:**

I valori del bianco non sono superiori al 30 % del livello di contaminazione corrispondente al livello massimo ([1]).

5. **Controllo della qualità:**

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

6. **Controllo dei recuperi:**

— Uso di idonei standard interni con proprietà fisico-chimiche comparabili agli analiti di interesse.

— Aggiunta di standard interni:

  — aggiunta ai prodotti (prima dell'estrazione e del processo di clean-up);

  — aggiunta possibile anche alla materia grassa estratta (prima del processo di clean-up), se il livello massimo è espresso su base grassa.

— Prescrizioni per i metodi che utilizzano tutti i sei congeneri di PCB indicatori marcati con isotopi:

  — correzione dei risultati in funzione dei recuperi degli standard interni;

  — i recuperi generalmente accettabili degli standard interni marcati con isotopi sono compresi tra 50 e 120 %;

  — recuperi inferiori o superiori per i singoli congeneri con un contributo alla somma dei sei PCB indicatori inferiore al 10 % sono accettabili.

— Prescrizioni per i metodi che non utilizzano tutti i sei standard interni marcati con isotopi o utilizzano altri standard interni:

  — controllo del recupero degli standard interni per ogni campione;

  — recuperi accettabili degli standard interni tra 60 e 120 %;

  — correzione dei risultati in funzione dei recuperi degli standard interni.

— I recuperi dei congeneri non marcati sono controllati per mezzo di campioni spiked o campioni di controllo qualità con concentrazioni nel range del livello massimo. I recuperi accettabili per questi congeneri sono compresi tra 70 e 120 %.

7. **Prescrizioni per i laboratori:**

Come prescritto dal regolamento (CE) n. 882/2004, i laboratori devono essere accreditati da un organismo riconosciuto operante in conformità alla Guida ISO 58, per garantire che alle loro analisi sia applicata l'assicurazione qualità. I laboratori devono essere accreditati in base alla norma EN ISO/IEC 17025.

8. **Caratteristiche di performance: criteri per la somma dei sei PCB indicatori al livello massimo:**

Esattezza	da – 30 a + 30 %
Precisione intermedia (RSD%)	≤ 20 %
Differenza tra calcolo upperbound e lowerbound	≤ 20 %

9. **Reporting dei risultati**

— Se la procedura analitica impiegata lo consente, i risultati dell'analisi contengono i livelli dei singoli congeneri di PCB e sono espressi come lowerbound, upperbound e mediumbound, per includere un massimo di informazione nel reporting dei risultati e permettere così l'interpretazione dei risultati secondo prescrizioni specifiche.

— Il rapporto indica anche il metodo utilizzato per l'estrazione di PCB e lipidi. Il tenore lipidico del campione è determinato e indicato per i campioni di alimenti con livelli massimi espressi su base grassa e una concentrazione di materia grassa attesa compresa tra lo 0 e il 2 % (in corrispondenza alla legislazione vigente); per gli altri campioni la determinazione del tenore lipidico è facoltativa.

([1]) È altamente raccomandato un contributo inferiore del livello del bianco reagente al livello di un contaminante in un campione. È compito del laboratorio controllare la variazione dei livelli del bianco, in particolare se sono sottratti.

— I recuperi dei singoli standard interni devono essere indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 6, se il livello massimo è superato e in altri casi su richiesta.

— Poiché nel decidere della conformità di un campione occorre tener conto dell'incertezza di misura, deve essere indicato anche questo parametro. I risultati analitici sono pertanto espressi come x +/– U, dove x è il risultato analitico e U l'incertezza di misura estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 che dà un livello di fiducia del 95 % circa.

— Se si tiene conto dell'incertezza di misura applicando il CCα (come descritto nell'allegato II, punto IV.1), questo parametro è indicato.

— I risultati devono essere espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei tenori massimi stabiliti dal regolamento (CE) n. 1881/2006.