REGOLAMENTO (UE) N. 278/2012 DELLA COMMISSIONE

del 28 marzo 2012

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

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

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

considerando quando segue:

(1) La direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 7 maggio 2002, relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali ([2]) fissa i livelli massimi per le diossine, i furani e policlorobifenili (PCB) negli alimenti per animali e le soglie d'intervento che richiedono indagini da parte degli Stati membri per identificare le fonti di tali sostanze.

(2) Il regolamento (CE) n. 152/2009 della Commissione, del 27 gennaio 2009, che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali ([3]) definisce i metodi per la determinazione dei livelli di policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF) e policlorobifenili (PCB) diossina-simili negli alimenti per animali.

(3) Per identificare i campioni con livelli significativi di PCDD/F e di PCB diossina-simili può essere utilizzato un metodo di screening di validità ampiamente riconosciuta e ad alto «throughput» (preferibilmente che selezioni campioni che superano le soglie di intervento 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 requisiti appropriati, che assicurino un tasso di falsi conformi in rapporto ai livelli massimi inferiore al 5 %, e requisiti rigorosi per i metodi di conferma. Inoltre, i metodi di conferma permettono la determinazione dei livelli anche nel range di background basso. Questo è importante per il monitoraggio delle tendenze nel tempo, la valutazione dell'esposizione e la ri-valutazione dei livelli massimi e delle soglie di intervento.

(4) La modifica dei livelli massimi per le diossine e i PCB diossina-simili e la fissazione dei livelli massimi per i PCB non diossina-simili nella direttiva 2002/32/CE nonché l'esigenza di aggiornare i criteri per i metodi di screening rendono necessaria una modifica delle norme relative alla determinazione delle diossine e dei PCB negli alimenti per animali contenute nella parte B dell'allegato V del regolamento (CE) n. 152/2009. Per motivi di chiarezza e di comprensibilità, è opportuno sostituire la parte B dell'allegato V.

(5) È essenziale che i risultati analitici siano comunicati e interpretati in modo uniforme, affinché possano essere armonizzate le misure esecutive adottate nell'Unione.

(6) L'allegato V del regolamento (CE) n. 152/2009 deve pertanto essere modificato di conseguenza.

(7) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del Comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali e ad esse non si sono opposti né il Parlamento europeo né il Consiglio,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

La parte B dell'allegato V del regolamento (CE) n. 152/2009 è modificata come indicato nell'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

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

Esso si applica a decorrere dalla data di entrata in vigore.

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

Fatto a Bruxelles, il 28 marzo 2012

Per la Commissione

Il presidente

José Manuel BARROSO

([1]) GU L 165 del 30.4.2004, pag. 1.
([2]) GU L 140 del 30.5.2002, pag. 10.
([3]) GU L 54 del 26.2.2009, pag. 1.

ALLEGATO

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

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

CAPO I

Metodi di campionamento e interpretazione dei risultati analitici

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

I campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF), policlorobifenili (PCB) diossina-simili (*) e PCB non diossina-simili negli alimenti per animali sono prelevati secondo le disposizioni dell'allegato I. Si applicano le prescrizioni quantitative relative al controllo delle sostanze o dei prodotti ripartiti in modo uniforme negli alimenti per animali di cui al punto 5.A dell'allegato I. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi delle partite o sottopartite da cui sono prelevati. Il rispetto dei livelli massimi fissati nella direttiva 2002/32/CE è accertato in base ai livelli determinati nei campioni di laboratorio.

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

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

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

Ai fini di questa parte dell'allegato V, si applicano le definizioni figuranti nell'allegato I della 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. **Conformità della partita o sottopartita alle specifiche**

2.1. *PCB non diossina-simili*

La partita è conforme alle specifiche se il risultato analitico non supera il livello massimo di PCB non diossina-simili fissato dalla direttiva 2002/32/CE, tenendo conto dell'incertezza di misura.

La partita non è conforme alle specifiche se il risultato analitico upperbound (***), confermato da una doppia analisi (****), supera il livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE, tenendo conto dell'incertezza di misura.

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

— calcolando l'incertezza estesa per mezzo di un fattore di copertura 2 corrispondente ad un livello di fiducia del 95 % circa. Una partita o sottopartita non è conforme se il valore misurato meno U supera il livello massimo,

— stabilendo il limite di decisione (CCα) come indicato al punto 3.1.2.5 dell'allegato I della decisione 2002/657/CE. Una partita o sottopartita non è conforme se il valore misurato è pari o superiore al CCα.

Le norme di interpretazione 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.

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

(****) La doppia analisi è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione interna o di una mescolanza accidentale dei campioni. La prima analisi, tenendo conto dell'incertezza di misura, è utilizzata per verificare la conformità. Se l'analisi è effettuata nell'ambito di un incidente di contaminazione, la conferma mediante doppia analisi può essere omessa nel caso in cui la tracciabilità permetta di stabilire il legame tra i campioni selezionati per l'analisi e l'incidente.

2.2. *PCDD/F e PCB diossina-simili*

La partita è conforme alle specifiche 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 dalla direttiva 2002/32/CE rispettivamente per PCDD/PCDF e per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili,

— eseguita con un metodo di conferma non supera i livelli massimi fissati dalla direttiva 2002/32/CE rispettivamente per PCDD/PCDF e per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili tenendo conto dell'incertezza di misura.

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

La partita non è conforme alle specifiche se il risultato analitico upperbound (*****) ottenuto con un metodo di conferma e confermato da una doppia analisi supera il livello massimo fissato dalla direttiva 2002/32/CE, tenendo conto dell'incertezza di misura (******).

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

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

— stabilendo il limite di decisione (CCα) come indicato al punto 3.1.2.5 dell'allegato I della decisione 2002/657/CE. Una partita o sottopartita non è conforme se il valore misurato è pari o superiore al CCα.

Le norme di interpretazione 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.

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

(******) La doppia analisi è necessaria per escludere la possibilità di una contaminazione interna o di una mescolanza accidentale dei campioni. La prima analisi, tenendo conto dell'incertezza di misura, è utilizzata per verificare la conformità. Se l'analisi è effettuata nell'ambito di un incidente di contaminazione, la conferma mediante doppia analisi può essere omessa nel caso in cui la tracciabilità permetta di stabilire il legame tra i campioni selezionati per l'analisi e l'incidente.

3. **Risultati eccedenti le soglie d'intervento di cui all'Allegato II della Direttiva 2002/32/CE**

Le soglie di intervento fungono da strumento per la selezione dei campioni nei casi in cui è necessario identificare una fonte di contaminazione e prendere provvedimenti per la sua riduzione o eliminazione. I metodi di screening permettono di stabilire appropriati valori di cut-off per la selezione di tali campioni. Le azioni necessarie per identificare una fonte e ridurre o eliminare la contaminazione sono intraprese solo se il superamento delle soglie di intervento è confermato da una doppia analisi eseguita con un metodo di conferma e tenendo conto dell'incertezza di misura (*******).

(*******) Le precisazioni e le prescrizioni relative alla doppia analisi per il controllo delle soglie di intervento sono identiche a quelle indicate alla nota (*****) per i livelli massimi.

CAPO II

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

1. **Campo d'applicazione**

Le prescrizioni di cui al presente allegato si applicano alle analisi dei prodotti destinati all'alimentazione degli animali 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) e per finalità di legge.

Il monitoraggio della presenza di PCDD/F e di PCB diossina-simili negli alimenti per animali può essere effettuato per due diversi scopi:

a) la selezione di campioni con livelli di PCDD/F e di PCB diossina-simili superiori ai livelli massimi o alle soglie d'intervento, eventualmente ricorrendo a un metodo di screening che permetta 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 possono comprendere metodi bioanalitici e metodi GC/MS. La loro applicazione ha lo scopo di evitare i risultati falsi conformi. La concentrazione di PCDD/F e la somma di PCDD/F e PCB diossina-simili nei campioni con livelli significativi deve essere determinata/confermata mediante un metodo di conferma;

b) la determinazione dei livelli di PCDD/F e di PCB diossina-simili nei campioni di alimenti per animali nel range dei livelli di background bassi. Ciò è importante per seguire le tendenze nel tempo, valutare l'esposizione della popolazione e creare una base di dati per l'eventuale ri-valutazione dei livelli di azione e dei livelli massimi. Questo obiettivo è raggiunto mediante metodi di conferma che permettono di identificare e quantificare in modo inequivoco i PCDD/F e i PCB diossina-simili al livello di interesse. Questi metodi possono essere utilizzati per la conferma dei risultati ottenuti con i metodi di screening e per la determinazione dei livelli di background bassi nel monitoraggio degli alimenti per animali; sono importanti anche per stabilire pattern di congeneri per identificare la fonte di una possibile contaminazione. Attualmente questi metodi utilizzano la gascromatografia ad alta risoluzione/spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS).

2. **Classificazione dei metodi per grado di quantificazione** (********)

(********) Adattato ai PCDD/F e ai composti diossina-simili da *Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines,* Laboratori di riferimento UE per i residui di medicinali veterinari e contaminanti negli alimenti di origine animale di Fougères, Berlino e Bilthoven, 20/1/2010, http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm

2.1. I *metodi qualitativi* danno una risposta sì/no sulla presenza di analiti di interesse, senza dare un'indicazione quantificata della concentrazione dell'analita presunto. Questi metodi possono dare risultati semiquantitativi ma sono utilizzati esclusivamente per indicare in termini di decisione sì/no livelli superiori o inferiori a determinati range, ad esempio il limite di rilevabilità, il limite di quantificazione o i valori di cut-off.

Per il controllo dei livelli massimi e delle soglie d'intervento per i PCDD/PCDF e i PCB diossina-simili negli alimenti per animali possono essere utilizzati metodi di screening che sono basati sul confronto del risultato analitico con un valore di cut-off e danno una decisione sì/no indicativa del possibile superamento del livello di interesse.

2.2. I *metodi semiquantitativi* danno un'indicazione approssimativa della concentrazione dell'analita presunto quando il risultato numerico non risponde ai requisiti dei metodi quantitativi. Possono essere utilizzati per fornire informazioni sul range di concentrazione dell'analita e permettere all'analista di decidere sul range di calibrazione per il test di conferma da eseguire successivamente e per scopi di controllo della qualità. Ad esempio, i seguenti metodi sono considerati semiquantitativi:

a) metodi basati su principi biologici, come i dosaggi cellulari, i dosaggi di recettori e gli immunodosaggi (metodi bioanalitici), che sono in grado di rilevare gli analiti d'interesse, includono una curva di calibrazione, danno una decisione sì/no indicante il possibile superamento del livello di interesse e permettono di esprimere il risultato in equivalenti bioanalitici (BEQ), che sono un'indicazione del valore TEQ nel campione;

b) test fisico-chimico, ad esempio gascromatografia-spettrometria di massa/spettrometria di massa (GC-MS/MS) o gascromatografia/spettrometria di massa a bassa risoluzione (GC/LRMS), per il quale le caratteristiche misurate della precisione del metodo non soddisfano i requisiti per i test quantitativi.

2.3. I *metodi quantitativi* soddisfano gli stessi requisiti di accuratezza, range dinamico e precisione dei test di conferma. Se è richiesta la quantificazione, questi metodi sono convalidati come metodi di conferma.

3. **Background**

Per il calcolo delle concentrazioni di equivalenti tossici (TEQ), le concentrazioni delle singole sostanze in un dato campione sono moltiplicate per i rispettivi fattori di tossicità equivalente (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.

Ai fini della presente parte B dell'allegato V, il limite di quantificazione specifico accettato di un singolo congenere è 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 e il rispetto dei criteri di identificazione descritti, ad esempio, nella norma prEN 16215 (Alimenti per animali — Determinazione di diossine e PCB diossina-simili mediante GC/HRMS e di PCB indicatori mediante GC/HRMS) e/o nel metodo EPA 1613 revisione B.

I metodi di screening bioanalitici non danno risultati al livello del congenere, ma solo un'indicazione (*********) 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.

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 al livello di interesse (soglia d'intervento o livello massimo).

(*********) 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.

4. **Prescrizioni di garanzia della qualità**

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

4.2. 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/PCDF e di PCB diossina-simili. Le tracce di polvere di carta devono essere rimosse dal contenitore.

4.3. La conservazione e il trasporto devono avvenire in modo da preservare l'integrità del campione di alimento per animali.

4.4. Se del caso, macinare finemente e mescolare accuratamente ogni campione di laboratorio utilizzando un metodo che garantisca una completa omogeneizzazione (ad esempio, macinazione che consenta il passaggio attraverso un setaccio a maglie di 1 mm); prima della macinazione, i campioni devono essere asciugati, qualora il tenore di umidità sia troppo elevato.

4.5. I reagenti, la vetreria e le apparecchiature sono sottoposti a controlli per evitare che inflenzino i risultati espressi in TEQ o BEQ.

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

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

4.8. La quantità del campione utilizzato per l'estrazione deve permettere la conformità ai requisiti in relazione a un working range sufficientemente basso comprendente le concentrazioni di interesse.

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

5. **Prescrizioni per i laboratori**

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

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

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

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

6.1. *Working range e limiti di quantificazione bassi*

Per i PCDD/PCDF 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). 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). Per tutti gli altri congeneri dei PCB è sufficiente un limite di quantificazione dell'ordine del nanogrammo (10^{-9} g).

6.2. *Alta selettività (specificità)*

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

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

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

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

6.3.2. Per i metodi bioanalitici è determinato il recupero apparente del biodosaggio. Il recupero apparente del biodosaggio è il livello di BEQ calcolato a partire dalla curva di calibrazione della TCDD o del PCB 126 corretto del bianco e poi diviso per il livello TEQ determinato mediante GC/HRMS. 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 (fattore di equivalenza tossica) e REP (potenzialità relativa). Il recupero apparente del biodosaggio è calcolato a partire da idonei campioni di riferimento con pattern di congeneri rappresentativi attorno al livello di interesse.

6.4. *Validazione nel range del livello di interesse e misure generali di controllo della qualità*

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

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

6.5. *Limite di quantificazione*

6.5.1. Per un metodo di screening bioanalitico non è indispensabile fissare il limite di quantificazione, ma il metodo deve dimostrare di poter differenziare tra il valore bianco e il valore 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 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.

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

6.6. *Criteri analitici*

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

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

(*) rispetto ai livelli massimi.

6.7. *Prescrizioni specifiche per i metodi di screening*

6.7.1. Per lo screening possono essere utilizzati metodi GC/MS e metodi bioanalitici. Per i metodi GC/MS valgono le prescrizioni indicate al punto 7. Per i metodi bioanalitici cellulari valgono le prescrizioni specifiche indicate al punto 8.

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

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

6.7.4. Controllo dell'eventuale soppressione della risposta cellulare e della citotossicità

Il 20 % degli estratti del campione è misurato in screening di routine senza e con aggiunta di 2,3,7,8-TCDD corrispondente al livello di interesse, 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 GC/HRMS. I risultati sono monitorati in carte di controllo qualità.

6.7.5. Controllo di qualità sui campioni conformi

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

6.7.6. 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 della soglia di intervento. I tassi reali di falsi conformi sono inferiori al 5 %. Se si dispone di un minimo di 20 risultati confermati per matrice/gruppo di matrici dal controllo di qualità dei campioni conformi, da questa base di dati sono tratte conclusioni sul tasso di falsi conformi. I risultati dei campioni analizzati in «ring trial» o durante incidenti di contaminazione che coprono un range di concentrazione fino a per esempio 2 × 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 la soglia d'intervento, il criterio per la determinazione dei tassi di falsi conformi è il livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura del metodo di conferma.

6.7.7. I campioni sospetti non conformi dello screening sono sempre verificati con un metodo analitico di conferma (GC/HRMS). Questi campioni possono anche essere utilizzati per valutare il tasso di risultati falsi conformi. Per i metodi di screening, il tasso di risultati falsi non conformi è la frazione dei risultati confermati conformi dall'analisi di conferma GC/HRMS, quando nello screening precedente il campione è stato dichiarato sospetto non conforme. 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.

6.7.8. 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.

7. **Prescrizioni specifiche per i metodi gc/ms da rispettare a fini di screening o di conferma**

7.1. *Prescrizioni generali*

La differenza tra il livello upperbound e il livello lowerbound non deve essere superiore al 20 % per gli alimenti per animali con una contaminazione di circa 1 ng OMS-TEQ/kg di prodotto con tenore di umidità del 12 % (in base alla somma di PCDD/F e PCB diossina-simili). Per livelli di contaminazione inferiori, ad esempio 0,5 ng OMS-TEQ/kg di prodotto, la differenza tra il livello upperbound e il livello lowerbound può essere compresa tra il 25 e il 40 %.

7.2. *Controllo dei recuperi*

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

7.2.2. 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.

7.2.3. Per gli alimenti per animali di origine vegetale e per gli alimenti per animali di origine animale con tenore di grassi inferiore al 10 %, l'aggiunta di standard interni prima dell'estrazione è obbligatoria. Per gli alimenti per animali di origine animale con tenore di grassi superiore al 10 %, gli standard interni possono essere aggiunti prima o dopo l'estrazione dei grassi. È effettuata un'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).

7.2.4. Prima dell'analisi GC/MS, sono aggiunti 1 o 2 standard di recupero (surrogato).

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

7.3. *Rimozione delle sostanze interferenti*

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

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

7.4. *Calibrazione con curva standard*

Il range della curva di calibrazione copre il corrispondente range dei livelli di interesse.

8. **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 8 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. 8.3). 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 più idoneo a 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 le soglie di intervento, una percentuale appropriata del rispettivo livello di interesse può fungere da valore di cut-off.

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. 8.1.1 e 8.1.6).

8.1. *Valutazione della risposta al test*

8.1.1. 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 al di sopra dei bianchi di procedura almeno di un fattore tre. L'estremo superiore del working range è di norma rappresentato dal valore EC_{70} (70 % della concentrazione effettiva massima), ma è più basso se il CV è superiore al 15 % in questo range. Il working range è stabilito durante la validazione. I valori di cut-off (8.3) 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 %.

8.1.2. Calibrazione

8.1.2.1. *Calibrazione con curva standard*

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

— Le curve di calibrazione contengono da 8 a 12 concentrazioni (almeno in doppio) con concentrazioni sufficienti nella parte inferiore della curva (working range). Particolare attenzione è prestata alla qualità del fit della curva nel working range. Il valore R^2, come tale, è di scarsa o nessuna utilità nella stima della bontà del fit in regressione non lineare. Un migliore fit è ottenuto minimizzando la differenza tra i livelli calcolati e osservati nel working range, 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 di interesse). Per effettuare una correzione del recupero, il recupero apparente deve situarsi entro il range richiesto (cfr. punto 8.1.4). I campioni di riferimento utilizzati per la correzione del recupero devono rispondere ai requisiti indicati al punto 8.2.

8.1.2.2. *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 8.2.4: un bianco matrice, più tre campioni di riferimento a 0,5 ×, 1,0 ×, 2,0 × il livello di interesse) attorno al livello di interesse, 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. punto 8.3) può essere calcolata direttamente a partire da questi campioni e utilizzata come valore di cut-off. Per il controllo dei campioni che superano le soglie d'intervento, il valore di cut-off può essere costituito da una percentuale appropriata di queste soglie d'intervento.

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

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

8.1.4. 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 di interesse ed espresso in percentuale del livello BEQ rispetto al livello TEQ. A seconda del tipo di dosaggio e di TEF (**********) utilizzati, le differenze tra fattori TEF e REP per i PCB diossina-simili possono causare per i PCB diossina-simili recuperi apparenti bassi rispetto ai PCDD/PCDF. Pertanto, se è eseguita una determinazione separata di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili, i recuperi apparenti del biodosaggio sono: per i PCB diossina-simili dal 25 % al 60 %, per i PCDD/PCDF dal 50 % al 130 % (i range valgono per la curva di calibrazione della TCDD). Poiché il contributo dei PCB diossina-simili alla somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili può variare secondo le matrici e i campioni, i recuperi apparenti del biodosaggio per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili riflettono questi range e sono compresi tra il 30 % e il 130 %. Ogni modifica sostanziale dei valori TEF per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili nella legislazione dell'Unione richiede la revisione di questi range.

(**********) Gli attuali requisiti si basano sui TEF pubblicati in: M. Van den Berg et al., *Toxicol Sci* 93 (2), 223-241 (2006).

8.1.5. Controllo dei recuperi per il clean-up

La perdita di composti durante il clean-up è verificata durante la validazione. Un campione bianco addizionato con una miscela dei diversi congeneri è sottoposto a clean-up (almeno n = 3) e il recupero e la variabilità sono verificati mediante analisi GC/HRMS. 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.

8.1.6. Limite di reporting

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

8.2. *Uso di campioni di riferimento*

8.2.1. I campioni di riferimento rappresentano la matrice campione, i pattern di congeneri e i range di concentrazione per PCDD/PCDF e PCB diossina-simili attorno al livello di interesse.

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

8.2.3. 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 possono portare a una sottostima dei livelli.

8.2.4. Campioni di riferimento supplementari, per esempio a 0,5 × e 2 × il livello di interesse possono essere inclusi per dimostrare la performance adeguata del test nel range di interesse per il controllo del livello di interesse. Combinati, questi campioni possono essere utilizzati per calcolare i livelli BEQ nei campioni del test (cfr. punto 8.1.2.2).

8.3. *Determinazione dei valori di cut-off*

È stabilito il rapporto tra i risultati bioanalitici in BEQ e i risultati GC/HRMS 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, con 6 ripetizioni ad ogni livello (n = 24). I fattori di correzione (bianco e recupero) possono essere stimati in base a questo rapporto, ma sono controllati come indicato al punto 8.2.2.

Sono stabiliti valori di cut-off per la decisione sulla conformità del campione ai livelli massimi o per il controllo delle soglie d'intervento, se pertinente, con i rispettivi livelli di interesse fissati singolarmente per PCDD/PCDF 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 GC/HRMS 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 GC/HRMS è il livello massimo, tenendo conto dell'incertezza di misura.

Il valore di cut-off value (in BEQ) può essere calcolato in uno dei modi indicati ai punti 8.3.1, 8.3.2 e 8.3.3 (cfr. figura 1):

8.3.1. Uso della banda *inferiore* dell'intervallo di predizione del 95 % al limite di decisione GC/HRM

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

dove:

BEQ_{DL} BEQ corrispondente al limite di decisione GC/HRMS, 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 GC/HRMS (in TEQ) del punto di calibrazione i

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

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

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

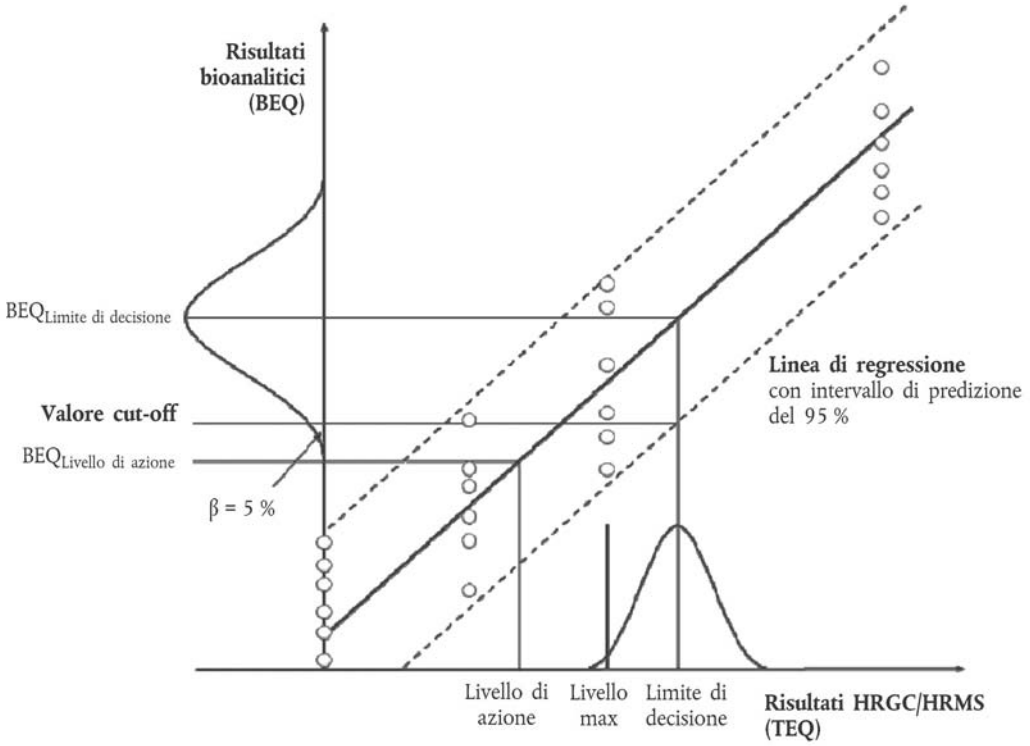
$$\text{Valore di cut-off} = BEQ_{DL} - 1{,}64 \times SD_R$$

dove

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

8.3.3. 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 di interesse, sulla base dell'osservazione che questo livello sarà prossimo al valore di cut-off determinato come indicato ai punti 8.3.1 o 8.3.2.

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. a partire dalla banda *inferiore* dell'intervallo di predizione del 95 % al limite di decisione HRGC/HRMS, 2. a partire dall'analisi multipla di campioni (n ≥ 6) contaminati al limite di decisione HRGC/HRMS come endpoint *inferiore* della distribuzione dei dati (rappresentata nella figura da una curva a campana) al corrispondente valore BEQ medio.

8.3.4. 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 di interesse 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 di interesse.

8.4. *Caratteristiche di performance*

8.4.1. Sono eseguiti test di ripetibilità dei metodi bioanalitici per ottenere informazioni sulla deviazione standard nelle e tra le serie di test. La ripetibilità è inferiore al 20 %, la riproducibilità in laboratorio inferiore al 25 % in base ai livelli calcolati in BEQ dopo correzione del bianco e del recupero.

8.4.2. Nel processo di validazione il test deve permettere di distinguere tra un campione in bianco e un livello al valore di cut-off, consentendo l'identificazione dei campioni al di sopra del corrispondente valore di cut-off (cfr. punto 8.1.2).

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

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

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

8.4.6. Le carte di controllo qualità 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 sono controllati in modo da evitare risultati falsi conformi quando sono sottratti.

8.4.7. I risultati delle analisi GC/HRMS 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.

8.4.8. La buona performance del metodo può essere dimostrata anche con la partecipazione a ring trial. Anche i risultati dei campioni analizzati in ring trial, che 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.

8.4.9. 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.

9. **Reporting dei risultati**

9.1. *Metodi di conferma*

9.1.1. Se la procedura analitica impiegata lo consente, i risultati dell'analisi contengono i livelli dei singoli congeneri di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili 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 requisiti specifici.

9.1.2. Il rapporto comprende anche il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/PCDF, PCB diossina-simili e lipidi.

9.1.3. I recuperi dei singoli standard interni sono indicati se si situano al di fuori del range menzionato al punto 7.2.5, se il livello massimo è superato e in altri casi su richiesta.

9.1.4. 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/PCDF e PCB diossina-simili, la somma dell'incertezza estesa stimata dei risultati analitici separati di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili è utilizzata per la somma di PCDD/PCDF e PCB diossina-simili.

9.1.5. Se si tiene conto dell'incertezza di misura applicando il CCα (come descritto al punto 2.2), questo parametro è indicato.

9.1.6. I risultati sono espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei livelli massimi stabiliti dalla direttiva 2002/32/CE.

9.2. *Metodi di screening bioanalitici*

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

9.2.2. Inoltre, per PCDD/PCDF e/o PCB diossina-simili può essere dato un risultato espresso in BEQ e non in TEQ.

9.2.3. Se è data l'incertezza di misura sul livello BEQ calcolato, ad esempio come deviazione standard, essa è basata almeno su una analisi in triplo del campione (comprendente estrazione, clean-up e determinazione della risposta al test).

9.2.4. I campioni con una risposta al di sotto del limite di reporting sono espressi come «inferiori al limite di reporting».

9.2.5. Per ciascun tipo di matrice del campione il rapporto menziona il livello di interesse su cui si basa la valutazione.

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

9.2.7. Il rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione di PCDD/PCDF, PCB diossina-simili e lipidi.

CAPO III

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)

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**

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

2.2. 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].

2.3. *Requisiti per le tecniche GC/MS*

Monitoraggio di almeno:

a) due ioni specifici per HRMS;

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

c) 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 %
da > 20 % a 50 %	± 15 %	± 25 %
da > 10 % a 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.

2.4. *Requisiti per le tecniche 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**

La performance del metodo è validata nel range del livello di interesse (da 0,5 a 2 volte il livello di interesse) con un coefficiente di variazione accettabile per le analisi ripetute (cfr. requisiti 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 (**********).

(**********) 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.

5. **Controllo di 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**

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

6.2. Aggiunta di standard interni:

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

6.3. Requisiti per i metodi che utilizzano tutti i sei congeneri di PCB indicatori marcati con isotopi:

a) correzione dei risultati in funzione dei recuperi degli standard interni;

b) recuperi degli standard interni marcati con isotopi compresi tra 50 e 120 %;

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

6.4. Requisiti per i metodi che non utilizzano tutti i sei standard interni marcati con isotopi o utilizzano altri standard interni:

a) controllo del recupero degli standard interni per ogni campione;

b) recuperi degli standard interni compresi tra 60 % e 120 %;

c) correzione dei risultati in funzione dei recuperi degli standard interni.

6.5. I recuperi dei congeneri non marcati sono controllati per mezzo di campioni spiked o campioni di controllo qualità con concentrazioni nel range del livello di interesse. I recuperi per questi congeneri sono considerati accettabili se 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 di interesse**

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

9. **Reporting dei risultati**

9.1. 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 requisiti specifici.

9.2. l rapporto indica il metodo utilizzato per l'estrazione di PCB e lipidi.

9.3. I recuperi dei singoli standard interni sono 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.

9.4. 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.

9.5. Se si tiene conto dell'incertezza di misura applicando il CCα (come descritto al punto 2.1 del capo I), questo parametro è indicato.

9.6. I risultati sono espressi nelle stesse unità e con almeno lo stesso numero di cifre significative dei livelli massimi stabiliti dalla direttiva 2002/32/CE.»