

REGOLAMENTO (UE) N. 519/2014 DELLA COMMISSIONE**del 16 maggio 2014****che modifica il regolamento (CE) n. 401/2006 per quanto riguarda i metodi di campionamento per le grandi partite, per le spezie e gli integratori alimentari, i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 e per la citrinina, nonché i metodi di analisi di screening****(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 quanto segue:

- (1) Il regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione ⁽²⁾ indica i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.
- (2) Il campionamento contribuisce in maniera cruciale alla precisione della determinazione dei tenori di micotossine, distribuite in modo eterogeneo in una partita. Occorre quindi fissare i criteri che i metodi di campionamento devono soddisfare.
- (3) Il regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione ⁽³⁾ stabilisce i criteri applicabili al campionamento per il controllo dei tenori di micotossine.
- (4) È necessario modificare le norme concernenti il campionamento delle spezie al fine di tenere conto delle dimensioni differenti delle particelle, responsabili della distribuzione eterogenea della contaminazione da micotossine nelle spezie. È inoltre il caso di stabilire norme per il campionamento di grandi partite al fine di garantire un approccio di attuazione uniforme in tutta l'Unione. È opportuno inoltre chiarire quale metodo di campionamento debba essere applicato per il campionamento del succo di mele.
- (5) È necessario aggiornare i criteri di rendimento per le tossine T-2 e HT-2 per tenere conto del progresso scientifico e tecnologico. Occorre stabilire i criteri di rendimento per la citrinina sulla base del tenore massimo stabilito per la citrinina negli integratori alimentari a base di riso fermentato con il lievito rosso *Monascus purpureus*.
- (6) Nell'analisi delle micotossine sono sempre più impiegate metodologie di screening. È opportuno stabilire i criteri che i metodi di screening sono tenuti a soddisfare per utilizzi a fini normativi.
- (7) Le misure previste dal 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

Il regolamento (CE) n.401/2006 è così modificato:

1) L'allegato I è così modificato:

a) nella parte B, la nota (1) è sostituita dalla seguente:

«(1) Il campionamento di dette partite è eseguito conformemente alle norme di cui alla parte L. Gli orientamenti in materia di campionamento di grandi partite sono riportati in un documento di orientamento disponibile sul seguente sito web: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>⁽¹⁾ GUL 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 (GUL 364 del 20.12.2006, pag. 5).⁽³⁾ Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione, del 23 febbraio 2006, relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari (GUL 70 del 9.3.2006, pag. 12).

L'applicazione di norme di campionamento in conformità alla norma EN ISO 24333:2009 o alle norme di campionamento del GAFTA n. 124 da parte degli operatori del settore alimentare al fine di garantire il rispetto delle disposizioni di legge è equivalente alle norme di campionamento di cui alla parte L.

Per quanto concerne il campionamento delle partite per quanto concerne le tossine di *Fusarium*, l'applicazione delle norme di campionamento in conformità alla norma EN ISO 24333:2009 o alle norme di campionamento del GAFTA n. 124 da parte degli operatori del settore alimentare al fine di garantire il rispetto delle disposizioni di legge è equivalente alle norme di campionamento di cui alla parte B.»;

- b) nella parte B.2, la tabella 1 è sostituita dalla seguente:

«Tabella 1

Suddivisione delle partite in sottopartite in funzione del prodotto e del peso della partita

Prodotto	Peso della partita (t)	Peso o numero delle sottopartite	Numero di campioni elementari	Peso del campione globale (kg)
Cereali e prodotti derivati	> 300 e < 1 500	3 sottopartite	100	10
	≥ 50 e ≤ 300	100 t	100	10
	< 50	—	3-100 (*)	1-10

(*) In funzione del peso della partita — cfr. tabella 2.»;

- c) nella parte B.3, alla fine del primo trattino è aggiunta la seguente frase:

«Per le partite > 500 tonnellate il numero di campioni elementari è indicato nella parte L.2 dell'allegato I.»;

- d) nella parte D.2, dopo la prima frase è inserita la frase seguente:

«Questo metodo di campionamento va applicato anche per il controllo ufficiale dei tenori massimi di ocratossina A, aflatossina B1 e aflatossine totali fissati per le spezie che presentano particelle di dimensioni relativamente grandi (comparabili alle arachidi o maggiori, come ad esempio le noci moscate).»;

- e) nella parte E, la prima frase è sostituita dalla seguente:

«Questo metodo di campionamento va applicato per il controllo ufficiale dei tenori massimi di ocratossina A, aflatossina B1 e aflatossine totali fissati per le spezie ad eccezione dei casi in cui le spezie presentano particelle di dimensioni relativamente grandi (distribuzione eterogenea della contaminazione da micotossine).»;

- f) nella parte I, il titolo e la prima frase sono sostituiti dai seguenti:

I. METODO DI CAMPIONAMENTO PER I PRODOTTI SOLIDI A BASE DI MELA

Questo metodo di campionamento si applica per il controllo ufficiale dei tenori massimi stabiliti per la patulina nei prodotti solidi a base di mela, compresi quelli destinati ai lattanti e alla prima infanzia.»;

- g) nella parte I.1, secondo paragrafo, sono soppresse le seguenti frasi:

«Nel caso di prodotti liquidi la partita deve essere accuratamente mescolata, per quanto ciò risulti possibile, con mezzi manuali o meccanici, immediatamente prima del prelievo. In tal caso si può presumere che la patulina sia distribuita omogeneamente in una partita. Pertanto è sufficiente prelevare tre campioni elementari da una partita per formare il campione globale.»;

- h) sono aggiunte le nuove parti L. e M. di cui all'allegato I del presente regolamento.

- 2) Nell'allegato II, i punti 4.2 «Prescrizioni generali», 4.3 «Prescrizioni specifiche» e 4.4 «Stima dell'incertezza della misura, calcolo del tasso di recupero ed espressione dei risultati» sono sostituiti dal testo di cui all'allegato II 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 da 1° luglio 2014.

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

Fatto a Bruxelles, il 16 maggio 2014

Per la Commissione

Il presidente

José Manuel BARROSO

ALLEGATO I

«L. METODO DI CAMPIONAMENTO PER PARTITE MOLTO GRANDI IMMAGAZZINATE O TRASPORTATE CON MODALITÀ CHE NON PERMETTONO IL PRELIEVO DI CAMPIONI DA TUTTA LA PARTITA

L.1. **Principi generali**

Se le modalità di trasporto o di stoccaggio di una partita non consentono il prelievo di campioni elementari dall'intera partita, è preferibile eseguire il prelievo di campioni quando la partita è in movimento (campionamento dinamico).

Nel caso di grandi depositi destinati allo stoccaggio di prodotti alimentari, gli operatori vanno incoraggiati ad installare nel deposito attrezzature che consentano di eseguire il prelievo (automatico) di campioni da tutta la partita immagazzinata.

In caso di applicazione delle procedure di campionamento di cui alla presente parte L, l'operatore del settore alimentare o il suo rappresentante vanno informati della procedura di campionamento. Qualora l'operatore o il suo rappresentante contestino la procedura di campionamento, essi consentono all'autorità competente di eseguire prelievi di campioni da tutta la partita a proprie spese.

Il campionamento di una parte della partita è autorizzato a condizione che la quantità della porzione campionata equivalga almeno al 10 % della partita oggetto di campionamento. Se una parte di una partita di prodotti alimentari appartenente alla medesima classe o descrizione è stata sottoposta a campionamento e giudicata non conforme alle prescrizioni dell'Unione, si presume che nemmeno l'intera partita lo sia, salvo che un'ulteriore valutazione dettagliata dimostri l'assenza di prove indicanti la non conformità del resto della partita.

Le disposizioni pertinenti, quali il peso del campione elementare, di cui alle altre parti del presente allegato sono applicabili per il campionamento di partite molto grandi o di partite immagazzinate o trasportate con modalità che non permettono il prelievo di campioni da tutta la partita.

L.2. **Numero di campioni elementari da prelevare nel caso di grandi partite**

Nel caso di grandi porzioni campionate (> 500 tonnellate), il numero di campioni elementari da prelevare è dato dalla somma di 100 campioni elementari + $\sqrt{\text{delle tonnellate}}$. Nel caso tuttavia in cui la partita sia inferiore a 1500 tonnellate e possa essere suddivisa in sottopartite conformemente alla tabella 1 della parte B e a condizione che le sottopartite siano fisicamente separabili, va prelevato il numero di campioni elementari indicato nella parte B.

L.3. **Grandi partite trasportate per nave**

L.3.1. *Campionamento dinamico di grandi partite trasportate per nave*

È preferibile eseguire il campionamento di grandi partite su navi quando il prodotto è in movimento (campionamento dinamico).

Il campionamento va eseguito stiva per stiva (intendendo come stiva uno spazio separabile fisicamente). Le stive vengono comunque parzialmente svuotate l'una dopo l'altra cosicché l'iniziale separazione fisica non sussiste più dopo il trasferimento nelle strutture di stoccaggio. Il campionamento può pertanto essere eseguito in base alla separazione fisica iniziale o alla separazione dopo il trasferimento nelle strutture di stoccaggio.

Le operazioni di scarico di una nave possono durare diversi giorni. Di norma, il campionamento deve essere eseguito ad intervalli regolari durante l'intera fase di scarico. La presenza di un ispettore ufficiale addetto al campionamento durante l'intera operazione di scarico non è tuttavia sempre possibile o giustificata. È pertanto consentito eseguire il campionamento di parte della partita (porzione campionata). Il numero di campioni elementari è determinato tenendo conto delle dimensioni della porzione campionata.

La presenza di un ispettore è necessaria anche quando il campione ufficiale è prelevato automaticamente. Qualora il campionamento sia eseguito in modo automatico con parametri prefissati non modificabili nel corso dello stesso e i campioni elementari siano posti in un recipiente sigillato, così da prevenire possibili frodi, la presenza di un ispettore è tuttavia prescritta solo all'inizio del campionamento, ogni qualvolta sia necessario sostituire il recipiente dei campioni e alla fine del campionamento.

L.3.2. *Campionamento statico di partite trasportate per nave*

Se il campionamento è eseguito in modo statico si applica la stessa procedura prevista per le strutture di stoccaggio (sili) accessibili dall'alto (cfr. punto L.5.1).

Il prelievo del campione va eseguito dalla parte accessibile (dall'alto) della partita/stiva. Il numero di campioni elementari è determinato tenendo conto delle dimensioni della porzione campionata.

L.4. Campionamento di grandi partite immagazzinate in depositi

Il prelievo del campione va eseguito dalla parte accessibile della partita. Il numero di campioni elementari è determinato tenendo conto delle dimensioni della porzione campionata.

L.5. Campionamento di strutture di stoccaggio (sili)**L.5.1. Campionamento di sili (facilmente) accessibili dall'alto**

Il prelievo del campione va eseguito dalla parte accessibile della partita. Il numero di campioni elementari è determinato tenendo conto delle dimensioni della porzione campionata.

L.5.2. Campionamento di sili non accessibili dall'alto (sili chiusi)**L.5.2.1. Sili non accessibili dall'alto (sili chiusi) di dimensioni > 100 tonnellate ciascuno**

Non è possibile eseguire un campionamento statico di prodotti alimentari immagazzinati in tali sili. Qualora si debba eseguire il campionamento di prodotti alimentari situati all'interno del silo e non vi sia possibilità di spostare la partita, occorre pertanto accordarsi con l'operatore affinché questi informi l'ispettore su quando sarà svuotato il silo, del tutto o in parte, di modo che il campionamento possa essere eseguito quando i prodotti alimentari sono in movimento.

L.5.2.2. Sili non accessibili dall'alto (sili chiusi) di dimensioni > 100 tonnellate ciascuno

Contrariamente a quanto disposto al punto L.1 (porzione campionata pari almeno al 10 %), la procedura di campionamento implica l'immissione in un recipiente contenente dai 50 ai 100 kg da cui si preleva il campione. Le dimensioni del campione globale corrispondono all'intera partita, mentre il numero di campioni elementari corrisponde alla quantità di prodotti alimentari prelevata dal silo e immessa nel recipiente per il campionamento.

L.6. Campionamento di prodotti alimentari sfusi in grandi contenitori chiusi

Spesso tali partite possono essere campionate solo a scarico avvenuto. In alcuni casi non è possibile scaricare presso il punto di importazione o di controllo, pertanto il campionamento va eseguito al momento dello scarico dei contenitori. L'operatore deve informare l'ispettore circa il luogo e l'ora di scarico dei contenitori.

M. METODO DI CAMPIONAMENTO PER INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI RISO FERMENTATO CON IL LIEVITO ROSSO MONASCUS PURPUREUS

Questo metodo di campionamento è applicabile ai fini del controllo ufficiale del tenore massimo di citrulina stabilito per gli integratori alimentari a base di riso fermentato con il lievito rosso *Monascus purpureus*.

Procedura di campionamento e dimensione dei campioni

La procedura di campionamento tiene conto del presupposto che gli integratori alimentari a base di riso rosso fermentato con il lievito rosso *Monascus purpureus* siano commercializzati in confezioni al dettaglio contenenti di solito dalle 30 alle 120 capsule.

Dimensioni della partita (numero di confezioni al dettaglio)	Numero di confezioni al dettaglio da campionare	Dimensione del campione
1-50	1	Tutte le capsule
51-250	2	Tutte le capsule
251-1 000	4	Metà delle capsule di ogni confezione al dettaglio selezionata per il campionamento
> 1 000	4 + 1 confezioni per ogni 1000 confezioni al dettaglio, fino ad un massimo di 25 confe- zioni al dettaglio	≤ 10 confezioni al dettaglio: metà delle capsule di ogni confezione al dettaglio > 10 confezioni al dettaglio: un numero uguale di capsule per ogni confezione fino a costituire un campione equivalente al contenuto di 5 confezioni al dettaglio.»

ALLEGATO II

«4.2. **Prescrizioni generali**

I metodi di conferma utilizzati per il controllo alimentare sono conformi alle disposizioni dell'allegato III, punti 1 e 2 del regolamento (CE) n. 882/2004.

4.3. **Prescrizioni specifiche**4.3.1. *Prescrizioni specifiche per i metodi di conferma*

4.3.1.1. Criteri di rendimento

Si raccomanda di utilizzare metodi di conferma pienamente validati (vale a dire metodi validati mediante studi collaborativi relativi a matrici pertinenti), se del caso e ove disponibili. È altresì possibile utilizzare altri idonei metodi di conferma validati (ad esempio metodi validati a livello interno relativi a matrici pertinenti che appartengono al gruppo di prodotti interessati) a condizione che essi soddisfino i criteri di rendimento di cui alle tabelle seguenti.

La validazione dei metodi validati a livello interno deve includere, ove possibile, materiale di riferimento certificato.

a) Criteri di rendimento per le aflatossine

Criterio	Intervallo di concentrazione	Valore raccomandato	Valore massimo consentito
Bianchi	Tutti	Trascurabile	-
Recupero — Aflatossina M1	0,01-0,05 µg/kg	60-120 %	
	> 0,05 µg/kg	70-110 %	
Recupero — Aflatossine B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 µg/kg	50-120 %	
	1-10 µg/kg	70-110 %	
	> 10 µg/kg	80-110 %	
Riproducibilità RSD _R	Tutti	Derivato dall'equazione di Horwitz (*), (**)	2 volte il valore derivato dall'equazione di Horwitz (*), (**)

La ripetibilità RSD_r può essere calcolata moltiplicando per 0,66 la riproducibilità RSD_R alla concentrazione di interesse.

Nota:

- Valori da applicare tanto a B₁ quanto alla somma di B₁ + B₂ + G₁ + G₂.
- Se è necessario comunicare le somme delle aflatossine singole B₁ + B₂ + G₁ + G₂, la risposta di ciascuna di esse al metodo d'analisi deve essere nota o equivalente.

b) Criteri di rendimento per l'ocratossina A

Tenore µg/kg	Ocratossina A		
	% RSD _r	% RSD _R	% Recupero
< 1	≤ 40	≤ 60	50-120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	70-120

c) Criteri di rendimento per la patulina

Tenore µg/kg	Patulina		
	% RSD _T	% RSD _R	% Recupero
< 20	≤ 30	≤ 40	50-120
20-50	≤ 20	≤ 30	70-105
> 50	≤ 15	≤ 25	75-105

d) Criteri di rendimento per il desossinivalenolo

Tenore µg/kg	Desossinivalenolo		
	% RSD _T	% RSD _R	% Recupero
> 100-≤ 500	≤ 20	≤ 40	60-110
> 500	≤ 20	≤ 40	70-120

e) Criteri di rendimento per lo zearalenone

Tenore µg/kg	Zearalenone		
	% RSD _T	% RSD _R	% Recupero
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60-120
> 50	≤ 25	≤ 40	70-120

f) Criteri di rendimento per le fumonisine singole B₁ e B₂

Tenore µg/kg	Fumonisine singole B ₁ e B ₂		
	% RSD _T	% RSD _R	% Recupero
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60-120
> 500	≤ 20	≤ 30	70-110

g) Criteri di rendimento per le tossine singole T-2 e HT-2

Tenore µg/kg	Tossine singole T-2 e HT-2		
	% RSD _T	% RSD _R	% Recupero
15-250	≤ 30	≤ 50	60-130
> 250	≤ 25	≤ 40	60-130

h) Criteri di rendimento per la citrinina

Tenore µg/kg	Citrinina			% Recupero
	% RSD _T	% RSD _R raccomandata	% RSD _R massima consentita	
Tutti	0,66 × RSD _R	Derivato dall'equazione di Horwitz (*), (**)	2 volte il valore derivato dall'equazione di Horwitz (*), (**)	70-120

i) Note relative ai criteri di rendimento per le micotossine:

- I limiti di rilevazione dei metodi impiegati non sono indicati poiché i valori di precisione sono forniti alle concentrazioni di interesse.
- I valori di precisione sono calcolati mediante l'equazione di Horwitz, in particolare l'equazione di Horwitz originale (per le concentrazioni $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$) (*) e l'equazione di Horwitz modificata (per le concentrazioni $C < 1,2 \times 10^{-7}$) (**), vale a dire:

(*) equazione di Horwitz per le concentrazioni $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

(rif: W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, *J.Assoc.Off.Analy.Chem.*, 1980, 63, 1344);(**) equazione di Horwitz (*) modificata per le concentrazioni $C < 1,2 \times 10^{-7}$:

$$RSD_R = 22 \%$$

(rif: M. Thompson, *Analyst*, 2000, 125, pagg. 385-386),

dove:

- RSD_R è la deviazione standard relativa, calcolata in base a risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità [(sR) × 100];
- C è il tasso di concentrazione (vale a dire 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

Si tratta di un'equazione generale relativa alla precisione che per la maggior parte dei metodi di analisi consueti risulta dipendere unicamente dalla concentrazione a prescindere dall'analita e dalla matrice.

4.3.1.2. Criterio della "idoneità allo scopo"

Per quanto concerne i metodi validati a livello interno è possibile utilizzare, in alternativa, un criterio di "idoneità allo scopo" (***) per valutare la loro idoneità all'impiego nei controlli ufficiali. I metodi idonei all'impiego nei controlli ufficiali devono fornire risultati con un'incertezza di misura standard (u) inferiore alla massima incertezza di misura standard calcolata mediante la seguente formula:

$$Uf = \sqrt{(LOD/2)^2 + (\alpha \times C)^2}$$

dove:

- Uf è la massima incertezza di misura standard (µg/kg);
- LOD è il limite di rilevazione del metodo (µg/kg);
- α è una costante, un fattore numerico da utilizzare in funzione del valore di C. I valori da utilizzare sono riportati nella tabella che segue;
- C è la concentrazione di interesse (µg/kg).

Se un metodo di analisi fornisce risultati d'incertezza di misura inferiori alla massima incertezza standard, esso è da ritenersi tanto valido quanto un altro metodo che soddisfi i criteri di rendimento di cui al punto 4.3.1.1.

Tabella

Valori numerici corrispondenti alla costante α nella formula di cui sopra, in funzione della concentrazione di interesse

C (µg/kg)	α
≤ 50	0,2
51-500	0,18
501-1 000	0,15
1001-10 000	0,12
> 10 000	0,1

(***) Rif: M. Thompson e R. Wood, *Accred. Qual. Assur.*, 2006, 10, pagg. 471-478.

4.3.2. Prescrizioni specifiche per i metodi di screening semiquantitativi

4.3.2.1. Ambito di applicazione

L'ambito di applicazione riguarda i metodi bioanalitici basati sul riconoscimento immunologico o sul legame ai recettori (quali ELISA, sistemi dip-stick, dispositivi a flusso laterale, immunosensori) e i metodi fisico-chimici basati sulla cromatografia o sulla rilevazione diretta mediante spettrometria di massa (ad esempio la spettrometria di massa a pressione atmosferica). Non si esclude l'impiego di altri metodi (ad esempio la cromatografia su strato sottile) a condizione che i segnali generati siano direttamente connessi alle micotossine di interesse e permettano l'applicazione del principio di seguito descritto.

Le prescrizioni specifiche si applicano ai metodi aventi come risultato della misurazione un valore numerico come ad esempio una risposta (relativa) da un lettore dip-stick, un segnale proveniente dal sistema LC-MS ecc., a cui si applicano le statistiche normali.

Le prescrizioni non si applicano ai metodi che non forniscono valori numerici (come ad esempio l'assenza o presenza di un'unica linea), che richiedono strategie di validazione differenti. Prescrizioni specifiche per detti metodi sono indicate al punto 4.3.3.

Il presente documento descrive le procedure per la validazione dei metodi di screening mediante una validazione interlaboratorio, la verifica del rendimento di un metodo validato mediante una prova interlaboratorio e la validazione di un metodo di screening eseguita da un singolo laboratorio.

4.3.2.2. Terminologia

Concentrazione bersaglio per lo screening (Screening target concentration, STC): la concentrazione di interesse ai fini della rilevazione della micotossina in un campione. Se lo screening è finalizzato a testare la conformità ai limiti normativi, la STC corrisponde al tenore massimo applicabile. Per altre finalità o nel caso in cui non sia stato stabilito alcun tenore massimo, la STC è predefinita dal laboratorio.

Metodo di screening: il metodo impiegato per la selezione dei campioni aventi un tenore di micotossine superiore alla STC, con una determinata certezza. Ai fini dello screening di micotossine si considera idonea allo scopo una certezza pari al 95 %. L'analisi di screening può fornire un risultato "negativo" o "sospetto". I metodi di screening consentono di eseguire un'analisi high-throughput di campioni a costi commisurati all'efficacia, aumentando in tal modo la possibilità di rilevare nuovi casi caratterizzati da elevata esposizione e rischi per la salute dei consumatori. Questi metodi si basano su metodi bioanalitici, LC-MS o HPLC. I risultati derivanti da campioni che superano il valore soglia vanno verificati mediante una nuova analisi completa del campione originale avvalendosi di un metodo di conferma.

Il "campione negativo" si verifica quando il tenore di micotossine nel campione è inferiore alla STC, con una certezza del 95 % (cioè vi è il 5 % di probabilità che i campioni siano classificati erroneamente come negativi).

Il "campione falso negativo" si verifica quando il tenore di micotossine nel campione è superiore alla STC ma il campione è stato classificato come negativo.

Il "campione sospetto" (positivo) si verifica quando il campione supera il valore soglia (descritto sotto) e può contenere un tenore di micotossine superiore a quello della STC. In caso di risultato sospetto è avviata un'analisi di conferma per identificare in modo univoco e quantificare le micotossine.

Il "campione falso sospetto" si verifica quando un campione negativo è classificato come sospetto.

Per "metodi di conferma" s'intendono i metodi che forniscono informazioni complete o complementari atte ad identificare e quantificare in modo univoco le micotossine al tenore di interesse.

Valore soglia: la risposta, il segnale o la concentrazione risultante dal metodo di screening al di sopra di cui il campione è classificato come "sospetto". Il valore soglia è determinato in fase di validazione e tiene conto della variabilità della misurazione.

Campione di controllo (matrice bianca) negativo: un campione di cui è nota l'assenza ⁽¹⁾ della micotossina oggetto dello screening, ad esempio perché precedentemente accertata tramite un metodo di conferma dotato di sufficiente sensibilità. Qualora non sia possibile ottenere bianchi campione, il materiale avente il tenore più basso ottenibile può essere eventualmente utilizzato purché il tenore mantenga valida la conclusione secondo cui il metodo di screening è idoneo allo scopo.

Campione di controllo positivo: un campione in cui la concentrazione di micotossine è pari alla STC, come ad esempio un materiale di riferimento certificato o un materiale dal contenuto noto (ad esempio, impiegato in prove valutative), oppure sufficientemente caratterizzato da un metodo di conferma. In assenza di uno dei suddetti campioni si ricorre all'impiego di una miscela di campioni che presentano diversi livelli di contaminazione o di un campione addizionato preparato in laboratorio e sufficientemente caratterizzato, a condizione che si possa dimostrare l'avvenuta verifica del livello di contaminazione.

4.3.2.3. Procedura di validazione

La validazione è finalizzata a dimostrare l'idoneità allo scopo del metodo di screening. Ciò avviene mediante la determinazione del valore soglia, nonché del tasso di falsi negativi e falsi sospetti. Nei due parametri di cui sopra sono integrate caratteristiche di rendimento quali la sensibilità, la selettività e la precisione.

I metodi di screening possono essere validati mediante una validazione interlaboratorio o eseguita da un singolo laboratorio. Se si dispone già di dati di validazione interlaboratorio per una certa combinazione di micotossina/matrice/STC, è sufficiente la verifica del rendimento del metodo da parte di un laboratorio che lo applica.

4.3.2.3.1. Validazione iniziale eseguita da un singolo laboratorio

Micotossine:

La validazione è eseguita per ogni singola micotossina rientrante nell'ambito di applicazione. Nel caso di metodi bioanalitici che forniscono una risposta combinata per un certo gruppo di micotossine (ad esempio le aflatoxine B₁, B₂, G₁ e G₂, o le fumonisine B₁ e B₂), si deve dimostrare l'applicabilità nonché indicare i limiti del test nell'ambito di applicazione del metodo. La cross-reattività indesiderata (ad esempio con il DON-3-glucoside o il 3-acetil-DON oppure il 15-acetil-DON per i metodi immunologici per il DON) non è ritenuta responsabile dell'aumento del tasso di falsi negativi per quanto riguarda le micotossine bersaglio ma può far aumentare il tasso di falsi sospetti. Tale aumento indesiderato sarà ridotto mediante un'analisi di conferma per identificare in modo univoco e quantificare le micotossine.

Matrici:

Occorre eseguire una validazione iniziale per ciascun prodotto o per ciascun gruppo di prodotti qualora il metodo sia notoriamente applicabile a più prodotti. In quest'ultimo caso si procede alla selezione all'interno del gruppo di un prodotto rappresentativo e pertinente (cfr. tabella A).

Insieme di campioni:

Il numero minimo di campioni differenti necessari per la validazione è costituito da 20 campioni di controllo negativi omogenei e da 20 campioni di controllo positivi omogenei contenenti micotossine alla STC e analizzati in condizioni di precisione intermedia (RSD_R) in 5 giorni diversi. Al fine di determinare in quale misura il metodo è in grado di distinguere le diverse concentrazioni di micotossine è facoltativamente possibile aggiungere ulteriori insiemi di 20 campioni contenenti tenori diversi di micotossine.

Concentrazione

Si deve eseguire una validazione per ogni STC destinata all'impiego nell'applicazione ordinaria.

4.3.2.3.2. Validazione iniziale mediante studi collaborativi

La validazione mediante studi collaborativi va eseguita in conformità ad un protocollo riconosciuto a livello internazionale per quanto riguarda gli studi collaborativi [ad esempio l'ISO 5725 1994 o il protocollo armonizzato internazionale dell'Unione internazionale di chimica pura e applicata (IUPAC)] che prescrive l'inserimento di dati validi provenienti da almeno otto laboratori distinti. A parte ciò, l'unica differenza rispetto alle validazioni eseguite da un singolo laboratorio consiste nella possibilità di suddividere 20 o più campioni per prodotti/tenore in modo equo tra i laboratori partecipanti, a ciascuno dei quali è assegnato un minimo di due campioni.

⁽¹⁾ Sono considerati privi di analita i campioni nei quali la quantità è inferiore a 1/5 della STC. Laddove è possibile una quantificazione per mezzo di un metodo di conferma, si deve tener conto del tenore ai fini della valutazione di validazione.

4.3.2.4. Determinazione del valore soglia e del tasso di risultati falsi sospetti in campioni bianchi

Le risposte (relative) concernenti i campioni di controllo negativi e positivi sono impiegate come base per il calcolo dei parametri richiesti.

Metodi di screening la cui risposta è proporzionale alla concentrazione di micotossine

Per i metodi di screening con risposta proporzionale alla concentrazione di micotossine si applica la seguente formula:

$$\text{Soglia} = R_{STC} - \text{valore } t_{-0,05} * SD_{STC}$$

R_{STC} = risposta media dei campioni di controllo positivi (alla STC)

valore-t: valore t a una coda per un tasso di risultati falsi negativi del 5 % (cfr. tabella B)

SD_{STC} = deviazione standard Metodi di screening la cui risposta è inversamente proporzionale alla concentrazione di micotossine

Analogamente, per quanto concerne i metodi di screening la cui risposta è inversamente proporzionale alla concentrazione di micotossine, la soglia è calcolata con la seguente formula:

$$\text{Soglia} = R_{STC} + \text{valore } t_{0,05} * SD_{STC}$$

L'utilizzo di questo specifico valore t per il calcolo del valore soglia fa sì che il tasso di risultati falsi negativi sia automaticamente fissato al 5 %.

Valutazione dell'idoneità allo scopo

I risultati ottenuti dai campioni di controllo negativi sono impiegati nella stima del corrispondente tasso di risultati falsi sospetti. Il valore t è calcolato in base alla situazione in cui un campione di controllo negativo risulti al di sopra della soglia e pertanto venga erroneamente classificato come sospetto.

valore t = $(\text{soglia} - \text{media}_{\text{bianco}}) / SD_{\text{bianco}}$ per i metodi di screening con una risposta proporzionale alla concentrazione di micotossine,

oppure:

valore t = $(\text{media}_{\text{bianco}} - \text{soglia}) / SD_{\text{bianco}}$ per i metodi di screening con risposta inversamente proporzionale alla concentrazione di micotossine.

Dato il valore t ottenuto, basato sui gradi di libertà calcolati in base al numero di esperimenti, è possibile procedere al calcolo della probabilità di campioni falsi sospetti per una distribuzione a una coda (ad. esempio mediante la funzione "TDIST" nel foglio di calcolo) o alla sua estrazione da una tabella di distribuzione di t.

Il corrispondente valore di distribuzione di t a una coda indica il tasso di risultati falsi sospetti.

Questo concetto è descritto dettagliatamente in un esempio contenuto in Analytical and Bioanalytical Chemistry, DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

4.3.2.5. Estensione dell'ambito di applicazione del metodo

4.3.2.5.1. Estensione dell'ambito di applicazione ad altre micotossine

Quando nuove micotossine sono inserite nel campo di applicazione di un metodo di screening esistente, occorre eseguire una validazione completa finalizzata a dimostrare l'idoneità del metodo.

4.3.2.5.2. Estensione ad altri prodotti

Se il metodo di screening è notoriamente o presumibilmente applicabile ad altri prodotti, la validità per detti prodotti è soggetta a verifica. Se il nuovo prodotto appartiene ad un gruppo di prodotti (cfr. tabella A) per i quali è già stata eseguita una validazione iniziale, è sufficiente eseguire un'ulteriore validazione limitata, nella quale vengono analizzati in condizioni di precisione intermedia un minimo di 10 campioni di controllo negativi omogenei e di 10 campioni di controllo positivi omogenei (alla STC). Tutti i campioni di controllo positivi devono essere superiori al valore soglia. Qualora questo criterio non sia soddisfatto è necessaria una validazione completa.

4.3.2.6. Verifica dei metodi già validati mediante studi collaborativi

Nel caso di metodi di screening già validati con successo mediante una prova collaborativa interlaboratorio, si esegue la verifica del rendimento del metodo, nella quale vengono analizzati almeno 6 campioni di controllo negativi e 6 campioni di controllo positivi (alla STC). Tutti i campioni di controllo positivi devono essere superiori al valore soglia. Qualora questo criterio non sia soddisfatto, il laboratorio deve eseguire un'analisi delle cause d'origine al fine di individuare i motivi della non conformità alle specifiche, a differenza di quanto rilevato nell'ambito dello studio collaborativo. Solo dopo aver adottato azioni correttive, il laboratorio può eseguire una nuova verifica in ambito interno del rendimento del metodo. Qualora il laboratorio non sia in grado di verificare i risultati della prova interlaboratorio, esso dovrà stabilire una propria soglia mediante una validazione completa eseguita da un singolo laboratorio.

4.3.2.7. Metodo di verifica continua/metodo di validazione in corso

Dopo la validazione iniziale si procede all'acquisizione di ulteriori dati di validazione includendo almeno due campioni di controllo positivi in ciascuna partita di campioni esaminati. Un campione di controllo positivo è un campione noto (ad esempio un campione utilizzato nella validazione iniziale) mentre l'altro è un prodotto diverso appartenente allo stesso gruppo di prodotti (in caso di analisi di un solo prodotto è invece utilizzato un campione diverso dello stesso prodotto). L'impiego di un campione di controllo negativo è facoltativo. I risultati ottenuti dall'analisi dei due campioni di controllo positivi sono aggiunti all'insieme di validazione esistente.

Almeno una volta all'anno viene eseguita la ridefinizione del valore soglia e una nuova valutazione del metodo. Il metodo di verifica continua ha diverse finalità:

- controllare la qualità del gruppo di campioni esaminati;
- fornire informazioni sulla robustezza del metodo alle condizioni presenti nel laboratorio dove questo è applicato;
- giustificare l'applicabilità del metodo a diversi prodotti;
- consentire l'adeguamento dei valori di soglia in caso di deviazioni graduali nel corso del tempo.

4.3.2.8. Rapporto di validazione

Il rapporto di validazione contiene:

- una dichiarazione relativa alla STC;
- una dichiarazione relativa al valore soglia ottenuto;

Nota: Il valore soglia deve possedere un numero di cifre significative pari a quello della STC. I valori numerici impiegati nel calcolo del valore soglia devono possedere almeno una cifra significativa in più rispetto alla STC.

- una dichiarazione sul tasso di falsi sospetti calcolato;
- una dichiarazione sulle modalità di determinazione del tasso di falsi sospetti.

Nota: La dichiarazione sul tasso di falsi sospetti calcolato indica se il metodo è idoneo allo scopo poiché specifica il numero di campioni bianchi (o a basso livello di contaminazione) che saranno sottoposti a verifica.

Tabella A

Gruppi di prodotti da impiegare per la validazione dei metodi di screening

Gruppi di prodotti	Categorie di prodotti	Prodotti tipicamente rappresentativi inclusi nella categoria
Ad elevato contenuto d'acqua	Succhi di frutta	Succo di mela, succo d'uva
	Bevande alcoliche	Vino, birra, sidro
	Radici e tuberi	Zenzero fresco
	Purea a base di frutta o cereali	Purè destinati a lattanti e prima infanzia

Gruppi di prodotti	Categorie di prodotti	Prodotti tipicamente rappresentativi inclusi nella categoria
Ad elevato contenuto di olii	Frutta a guscio	Noci, nocciole, castagne
	Semi oleosi e prodotti derivati	Colza, girasole, semi di cotone, semi di soia, arachidi, sesamo ecc.
	Frutti oleosi e prodotti derivati	Oli e paste (per esempio burro di arachidi, tahina)
Ad elevato contenuto di amido e/o proteine e a scarso contenuto di acqua e lipidi	Chicchi di cereale e prodotti derivati	Frumento, segale, orzo, grano-turco, riso, avena. Pane integrale, pane bianco, crackers, cereali per la colazione, pasta
	Prodotti dietetici	Polveri essiccate per la preparazione degli alimenti per lattanti e prima infanzia
Ad elevato contenuto acido e idrico (*)	Agrumi	
“Prodotti difficili o unici” (**)		Semi di cacao e prodotti derivati, copra e prodotti derivati, caffè, tè, Spezie, liquirizia
Ad elevato contenuto di zuccheri e a scarso contenuto d'acqua	Frutta essiccata	Fichi, uva passa, uva di Corinto, uva sultanina
Latte e prodotti lattiero-caseari	Latte	Latte di vacca, capra e bufala
	Formaggio	Formaggio bovino e caprino
	Latticini (ad esempio, latte in polvere)	Yogurt, panna

(*) In caso di impiego di un tampone per la stabilizzazione delle variazioni del pH in fase di estrazione, questo gruppo di prodotti può essere assimilato in un unico gruppo di prodotti denominato “Ad elevato contenuto d'acqua”.

(**) I “prodotti difficili o unici” vanno unicamente sottoposti a validazione completa nel caso in cui siano frequentemente analizzati. Se sono unicamente analizzati occasionalmente, la validazione può essere limitata al solo controllo dei valori di notifica mediante l'impiego di estratti di bianchi addizionati.

Tabella B

Valore t a una coda per un tasso di falsi negativi del 5 %

Gradi di libertà	Numero delle repliche	Valore t (5 %)
10	11	1,812
11	12	1,796
12	13	1,782
13	14	1,771
14	15	1,761
15	16	1,753
16	17	1,746
17	18	1,74
18	19	1,734

Gradi di libertà	Numero delle repliche	Valore t (5 %)
19	20	1,729
20	21	1,725
21	22	1,721
22	23	1,717
23	24	1,714
24	25	1,711
25	26	1,708
26	27	1,706
27	28	1,703
28	29	1,701
29	30	1,699
30	31	1,697
40	41	1,684
60	61	1,671
120	121	1,658
∞	∞	1,645

4.3.3. Prescrizioni relative ai metodi di screening qualitativi (metodi che non forniscono valori numerici)

L'elaborazione di orientamenti per la validazione di metodi di test binari è attualmente all'esame di vari organismi di normalizzazione (ad esempio, AOAC e ISO). L'AOAC ha di recente redatto un documento di orientamento in materia. Tale documento può essere considerato come l'attuale "stato dell'arte" in questo campo. I metodi che forniscono risultati binari (ad esempio l'esame visivo dei test dip-stick) devono essere validati conformemente a detto orientamento.

http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/ISPAM/Qual_Chem_Guideline_Final_Approved_031412.pdf

4.4. Stima dell'incertezza di misura, calcolo del tasso di recupero e comunicazione dei risultati ⁽¹⁾

4.4.1. Metodi di conferma

Il risultato analitico deve essere indicato come segue:

- con correzione per il recupero, il cui livello va indicato. La correzione per il recupero non è necessaria se il tasso di recupero è compreso tra il 90 e il 110 %;
- nella forma "x +/- U", dove x è il risultato analitico e U è l'incertezza di misura estesa, calcolata per mezzo di un fattore di copertura 2 il cui livello di confidenza è pari al 95 % circa.

Per gli alimenti di origine animale è possibile tenere conto dell'incertezza di misura anche stabilendo il limite di decisione (CC_a) conformemente della decisione 2002/657/CE della Commissione ⁽²⁾ (punto 3.1.2.5 dell'allegato I — il caso di sostanze per le quali è stabilito un limite consentito).

Qualora il risultato fornito dall'analisi sia molto inferiore (> 50 %) al tenore massimo o molto superiore al tenore massimo (ossia 5 volte superiore il tenore massimo) e a condizione che si rispettino le opportune procedure in materia di qualità e che l'analisi serva unicamente a verificare la conformità alle norme giuridiche pertinenti, il risultato analitico può tuttavia essere riportato senza correzioni per il recupero e, in questi casi, è possibile omettere il tasso di recupero e l'incertezza di misura.

⁽¹⁾ Per maggiori dettagli sulle procedure relative alla stima dell'incertezza di misura e alla valutazione del tasso di recupero si rinvia alla relazione "Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation" — http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf.

⁽²⁾ 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).

Le presenti norme di interpretazione del risultato analitico ai fini dell'accettazione o del rifiuto della partita si applicano al risultato analitico ottenuto dal campione destinato al controllo ufficiale. Nel caso di analisi a fini di ricorso o arbitraggio si applica la normativa nazionale.

4.4.2. *Metodi di screening*

Il risultato dello screening va espresso come conforme o sospetto non conforme.

“Sospetto non conforme”: il campione supera il valore di soglia e può contenere una micotossina a un tenore più alto rispetto alla STC. In caso di risultato sospetto è avviata un'analisi di conferma per identificare in modo univoco e quantificare le micotossine.

“Conforme”: il contenuto di micotossine nel campione è inferiore alla STC a un grado di certezza del 95 % (cioè, vi è il 5 % di probabilità che i campioni siano erroneamente classificati come negativi). Il risultato analitico è espresso come “inferiore al valore della STC” con riferimento al valore di STC specificato.»
