

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (UE) 2017/771 DE LA COMISIÓN

de 3 de mayo de 2017

por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 152/2009 en lo que respecta a la determinación de los contenidos de dioxinas y de bifenilos policlorados

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales ⁽¹⁾, y en particular su artículo 11, apartado 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) n.º 152/2009 de la Comisión ⁽²⁾ establece los métodos de determinación de los contenidos de policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDD), policlorodibenzofuranos (PCDF), policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas en los piensos.
- (2) El laboratorio de referencia de la UE para dioxinas y PCB en piensos y alimentos ha demostrado que los resultados de los análisis de dioxinas y PCB no son fiables en algunos casos, cuando los laboratorios que analizan las muestras tomadas por los explotadores de empresas de piensos con arreglo al Reglamento (CE) n.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽³⁾ no aplican los criterios de funcionamiento previstos en la parte B del anexo V del Reglamento (CE) n.º 152/2009. Por tanto, conviene hacer obligatoria la aplicación de los criterios de funcionamiento para el análisis de muestras.
- (3) Habida cuenta de que el método de utilizar un límite de decisión para garantizar con una determinada probabilidad que un resultado analítico está por encima del nivel máximo, conforme a lo dispuesto en la Decisión 2002/657/CE de la Comisión ⁽⁴⁾, ya no se aplica al análisis de dioxinas, furanos y PCB en los piensos, conviene suprimir dicho método y mantener solo el método de la incertidumbre ampliada con un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza aproximado del 95 %.
- (4) Se han redactado documentos de orientación sobre la incertidumbre de medición y el cálculo del límite de detección (LOD) y del límite de cuantificación (LOQ), y procede hacer referencia a ellos.
- (5) En consonancia con los requisitos de información en relación con los métodos bioanalíticos de cribado establecidos en la parte B del anexo V del Reglamento (CE) n.º 152/2009, procede asimismo prever el uso de métodos fisicoquímicos en relación con los requisitos de información específicos del cribado previstos en el capítulo II de dicha parte.
- (6) Dado que los análisis de dioxinas, PCB similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas suelen hacerse juntos, procede armonizar los criterios de funcionamiento para los PCB no similares a las dioxinas establecidos en el punto 3.3 del capítulo III de la parte B del anexo V del Reglamento (CE) n.º 152/2009 con los correspondientes a las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas. Se trata de una simplificación sin cambios sustanciales en la práctica, ya que, en el caso de los PCB no similares a las dioxinas, la intensidad relativa de los iones calificadores en comparación con los iones objetivo es > 50 %.

⁽¹⁾ DO L 165 de 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ Reglamento (CE) n.º 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos (DO L 54 de 26.2.2009, p. 1).

⁽³⁾ Reglamento (CE) n.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de enero de 2005, por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos (DO L 35 de 8.2.2005, p. 1).

⁽⁴⁾ Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 14 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (DO L 221 de 17.8.2002, p. 8).

- (7) A raíz de la experiencia adquirida, conviene adaptar algunas especificaciones técnicas tales como las recuperaciones de patrones marcados con isótopos establecidas en los puntos 7.3 y 7.5 del capítulo III de la parte B del anexo V del Reglamento (CE) n.º 152/2009.
- (8) Por otro lado, se proponen otras modificaciones de menor importancia de las actuales disposiciones para una mayor coherencia terminológica y mantener la legibilidad del texto, que hacen necesario sustituir toda la parte B del anexo V del Reglamento (CE) n.º 152/2009.
- (9) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CE) n.º 152/2009 en consecuencia.
- (10) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

La parte B del anexo V del Reglamento (CE) n.º 152/2009 queda modificada con arreglo a lo dispuesto en el anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 3 de mayo de 2017.

Por la Comisión
El Presidente
Jean-Claude JUNCKER

ANEXO

En el anexo V del Reglamento (CE) n.º 152/2009, la parte B, «DETERMINACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) Y PCB», se sustituye por el siguiente texto:

«B. DETERMINACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE DIOXINAS (PCDD/PCDF) Y PCB

CAPÍTULO I

Métodos de muestreo e interpretación de los resultados analíticos**1. Ámbito de aplicación y definiciones**

Las muestras destinadas al control oficial de los contenidos de policlorodibenzodioxinas (PCDD), de policlorodibenzofuranos (PCDF), de policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas ⁽¹⁾ y de PCB no similares a las dioxinas en los piensos se tomarán conforme a las disposiciones del anexo I. Serán de aplicación los requisitos cuantitativos relacionados con el control de las sustancias o los productos distribuidos uniformemente por el pienso que se establecen en el punto 5.1 del anexo I. Las muestras globales así obtenidas se considerarán representativas de los lotes o sublotos de los que se obtengan. El respeto de los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE se determinará en función de los contenidos hallados en las muestras de laboratorio.

A efectos de la presente parte B, se aplicarán las definiciones establecidas en el anexo I de la Decisión 2002/657/CE de la Comisión ⁽²⁾.

⁽¹⁾ Tabla de FET (= factores de equivalencia tóxica) correspondientes a PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas: Los FET-OMS de evaluación del riesgo para la salud humana se basan en las conclusiones de la reunión de expertos del Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), celebrada en Ginebra en junio de 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).

Congéneres	Valor FET	Congéneres	Valor FET
Policlorodibenzodioxinas ("PCDD") y policlorodibenzofuranos ("PCDF")		PCB "similares a las dioxinas" PCB no-orto + PCB mono-orto	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB no-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		

Abreviaturas utilizadas: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = octa; CDD = clorodibenzodioxina; CDF = clorodibenzofurano; CB = clorobifenilo.

⁽²⁾ Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 14 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (DO L 221 de 17.8.2002, p. 8).

Además de dichas definiciones, a efectos de la presente parte B se entenderá por:

“Métodos de cribado”: los utilizados para seleccionar las muestras con contenidos de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas que superan los contenidos máximos o los umbrales de intervención. Deberán permitir procesar un elevado número de muestras en poco tiempo con una buena relación coste-eficacia, aumentando así la oportunidad de descubrir nuevos incidentes con una alta exposición y riesgos para la salud de los consumidores. Los métodos de cribado serán bioanalíticos o por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM). Los resultados de las muestras que superen el valor de corte utilizado para comprobar el cumplimiento del contenido máximo serán verificados por un nuevo análisis completo de la muestra original utilizando un método de confirmación.

“Métodos de confirmación”: los que proporcionan una información completa o complementaria que permite la identificación y cuantificación inequívocas de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas al nivel del contenido máximo o, en caso de necesidad, del umbral de intervención. Estos métodos utilizan la cromatografía de gases/espectrometría de masas de alta resolución (CG-EMAR) o la cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (CG-EM/EM).

2. Conformidad del lote o sublote con el contenido máximo

2.1. Respecto de los PCB no similares a las dioxinas

El lote o sublote es conforme al contenido máximo si el resultado del análisis de la suma de PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 y PCB 180 (en lo sucesivo, PCB no similares a las dioxinas) no supera el contenido máximo de PCB fijado en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre ampliada de medición ⁽¹⁾. El lote o sublote no es conforme al contenido máximo fijado en la Directiva 2002/32/CE si la media de dos resultados analíticos del límite superior ⁽²⁾ obtenidos mediante un análisis por duplicado ⁽³⁾, teniendo en cuenta la incertidumbre ampliada de medición, supera el contenido máximo fuera de toda duda razonable, es decir, si la concentración analizada tras deducirse la incertidumbre ampliada de medición se emplea para evaluar el cumplimiento.

La incertidumbre ampliada de medición se calcula aplicando un factor de cobertura de 2 que da un nivel de confianza de aproximadamente un 95 %. Un lote o sublote no es conforme si la media de los valores medidos menos la incertidumbre ampliada de la media está por encima del contenido máximo.

Las normas mencionadas en los precedentes apartados de este punto se aplicarán al resultado analítico obtenido con la muestra para control oficial. En caso de análisis con fines de defensa o referencia serán de aplicación las normas nacionales.

2.2. Por lo que respecta a las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas

El lote o sublote es conforme al contenido máximo si el resultado analítico de un análisis único:

- realizado por un método de cribado que arroje menos del 5 % de falsos negativos, indica que no se supera el contenido máximo respectivo de PCDD y de PCDF ni la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas establecidos en la Directiva 2002/32/CE,
- realizado por un método de confirmación, indica que no se supera el contenido máximo de PCDD y de PCDF ni la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas establecidos en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre ampliada de medición.

⁽¹⁾ Deberán aplicarse, cuando proceda, los principios que se describen en el “Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽²⁾ El concepto de “límite superior” exige considerar el límite de cuantificación como contribución de cada congénere no cuantificado. El concepto de “límite inferior” exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado es igual a cero. El concepto de “límite intermedio” exige considerar la mitad del límite de cuantificación como contribución de cada congénere no cuantificado.

⁽³⁾ Análisis por duplicado: un análisis por separado de los análisis considerados utilizando una segunda parte alícuota de la misma muestra homogeneizada. En general, son de aplicación los requisitos para el análisis por duplicado, con arreglo a lo previsto en el anexo II, capítulo C, punto 3. No obstante, en métodos que utilizan el patrón interno marcado con C¹³ para los análisis considerados, el análisis por duplicado solo es necesario si el resultado de la primera determinación no es conforme. El análisis por duplicado es necesario para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. Si el análisis se realiza en el curso de un incidente de contaminación, la confirmación mediante análisis por duplicado puede omitirse si las muestras seleccionadas para el análisis se pueden relacionar, merced a la trazabilidad, con dicho incidente y si el nivel encontrado es significativamente superior al máximo.

Para los ensayos de cribado se establecerá un valor de corte para decidir si la muestra respeta los contenidos máximos respectivos que se hayan establecido para las PCDD, los PCDF o para la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas.

El lote o sublote no es conforme al contenido máximo fijado en la Directiva 2002/32/CE si la media de dos resultados analíticos del límite superior ⁽¹⁾ obtenidos mediante un análisis por duplicado ⁽²⁾ mediante un método de confirmación, teniendo en cuenta la incertidumbre ampliada de medición, supera el contenido máximo fuera de toda duda razonable, es decir, si la concentración analizada tras deducirse la incertidumbre ampliada de medición se emplea para evaluar el cumplimiento.

La incertidumbre ampliada de medición se calcula aplicando un factor de cobertura de 2 que da un nivel de confianza de aproximadamente un 95 %. Un lote o sublote no es conforme si la media de los valores medidos menos la incertidumbre ampliada de la media está por encima del contenido máximo.

Para la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas se usará la suma de las incertidumbres ampliadas calculadas, correspondiente a los resultados analíticos obtenidos por separado para PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas.

Las normas mencionadas en los precedentes apartados de este punto se aplicarán al resultado analítico obtenido con la muestra para control oficial. En caso de análisis con fines de defensa o referencia serán de aplicación las normas nacionales.

3. **Resultados que superan los umbrales de intervención establecidos en el anexo II de la Directiva 2002/32/CE**

Los umbrales de intervención sirven como instrumento para seleccionar las muestras en los casos en los que es necesario determinar la fuente de contaminación y tomar medidas para su reducción o eliminación. Los métodos de cribado deberán establecer los valores de corte adecuados para seleccionar dichas muestras. Cuando sean necesarios esfuerzos significativos para identificar la fuente y reducir o eliminar la contaminación, es apropiado confirmar que se han superado los umbrales de intervención mediante un análisis por duplicado, con un método de confirmación y teniendo en cuenta la incertidumbre ampliada de medición ⁽³⁾.

CAPÍTULO II

Preparación de las muestras y requisitos aplicables a los métodos de análisis utilizados en el control oficial de los contenidos de dioxinas (PCDD/PCDF) y PCB similares a las dioxinas en los piensos

1. **Campo de aplicación**

Los requisitos establecidos en el presente capítulo se aplicarán al análisis de piensos realizado para el control oficial de los contenidos de los PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y en lo que respecta a la preparación de las muestras y los requisitos analíticos con otros fines reglamentarios, incluidos los controles llevados a cabo por el explotador de la empresa de piensos para garantizar el cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ El concepto de "límite superior" exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al equivalente tóxico (EQT) es igual al límite de cuantificación. El concepto de "límite inferior" exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT es igual a cero. El concepto de "límite intermedio" exige suponer que la contribución de cada congénere no cuantificado al EQT es igual a la mitad del límite de cuantificación.

⁽²⁾ En general, son de aplicación los requisitos para el análisis por duplicado, con arreglo a lo previsto en el anexo II, capítulo C, punto 2. No obstante, en métodos de confirmación que utilizan el patrón interno marcado con C¹³ para los análisis considerados, el análisis por duplicado solo es necesario si el resultado de la primera determinación no es conforme. El análisis por duplicado es necesario para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. Si el análisis se realiza en el curso de un incidente de contaminación, la confirmación mediante análisis por duplicado puede omitirse si las muestras seleccionadas para el análisis se pueden relacionar, merced a la trazabilidad, con dicho incidente y si el nivel encontrado es significativamente superior al máximo.

⁽³⁾ La misma explicación e idénticos requisitos para el análisis por duplicado para controlar los umbrales de intervención que en la anterior nota 2 para los contenidos máximos.

⁽⁴⁾ Reglamento (CE) n.º 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de enero de 2005, por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos (DO L 35 de 8.2.2005, p. 1).

El control de la presencia de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas en los piensos puede realizarse mediante dos tipos de métodos de análisis:

a) *Métodos de cribado*

El objetivo de los métodos de cribado es seleccionar las muestras con contenidos de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas que superan los contenidos máximos o los umbrales de intervención. Permitirán procesar un elevado número de muestras en poco tiempo con una buena relación coste-eficacia, aumentando así la oportunidad de descubrir nuevos incidentes con una alta exposición y riesgos para la salud de los consumidores. Su aplicación perseguirá que no se produzcan falsos negativos. Los métodos de cribado podrán ser bioanalíticos o de cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM).

Los métodos de cribado comparan el resultado analítico con un valor de corte, lo que permite establecer si se ha superado o no el contenido máximo o el umbral de intervención. La concentración de PCDD o PCDF y la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas en las muestras que no cumplen el contenido máximo se determinará o confirmará mediante un método de confirmación.

Además, los métodos de cribado pueden dar una indicación de los niveles de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas presentes en la muestra. Si se aplican métodos bioanalíticos de cribado, el resultado se expresa en equivalentes bioanalíticos (EQB), mientras que, si se aplican métodos fisico-químicos de CG/EM, se expresa en equivalentes tóxicos (EQT). Los resultados de los métodos de cribado, indicados de forma numérica, son adecuados para demostrar el cumplimiento o la sospecha de incumplimiento, o bien la superación de los umbrales de intervención, y ofrecen una indicación de la serie de niveles en caso de seguimiento mediante métodos de confirmación. No son adecuados para fines como la evaluación de los niveles de fondo, la estimación de la dosis, el seguimiento de las tendencias temporales de los contenidos o la nueva evaluación de los umbrales de intervención y los contenidos máximos.

b) *Métodos de confirmación*

Los métodos de confirmación permiten la identificación y cuantificación inequívocas de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas presentes en una muestra y proporcionan información completa a nivel de los congéneres. Por lo tanto, esos métodos permiten el control de los contenidos máximos y los umbrales de intervención, incluida la confirmación de los resultados obtenidos por métodos de cribado. Además, los resultados pueden utilizarse para otros fines, como la determinación de niveles bajos en el seguimiento de los piensos, para el seguimiento de sus tendencias temporales, la evaluación de la exposición y la creación de una base de datos para poder evaluar de nuevo los umbrales de intervención y los contenidos máximos. Son importantes también para elaborar patrones de congéneres con objeto de identificar la fuente de una posible contaminación. Estos métodos utilizan la CG-EMAR. Para confirmar la conformidad con el contenido máximo, también puede recurrirse a la CG-EM/EM.

2. **Antecedentes**

Para calcular las concentraciones de EQT se multiplicará la concentración de cada sustancia de una muestra dada por su respectivo factor de equivalencia tóxica (FET) (véase la nota a pie de página 1 del capítulo I) y se suman luego los resultados para obtener la concentración total de compuestos similares a dioxinas expresados en EQT.

A efectos de la presente parte B, el límite de cuantificación específico aceptado de un congéner individual será el contenido más bajo de análisis que puede medirse con una certeza estadística razonable y que cumple requisitos de identificación como los descritos en normas reconocidas internacionalmente, por ejemplo, en la norma EN 16215:2012 (Alimentos para animales. Determinación de dioxinas, de PCB como dioxinas y de PCB indicadores mediante GC/HRMS) o en los métodos EPA 1613 y 1668 modificados.

El límite de cuantificación de cada congéner puede identificarse como:

- a) la concentración de un análisis en el extracto de una muestra que produce una respuesta instrumental a dos iones diferentes que debe controlarse con una relación señal/ruido (S/R) de 3/1 para la señal de datos brutos menos intensiva; o

- b) si, por razones técnicas, el cálculo de señal a ruido no ofrece resultados fiables, el punto de concentración más bajo en una curva de calibración que presenta una desviación aceptable ($\leq 30\%$) y coherente (medida, al menos, al principio y al final de una serie analítica de muestras) con respecto al factor de respuesta relativo medio calculado para todos los puntos en la curva de calibración en cada serie de muestras; el límite de cuantificación se calcula a partir del punto de concentración más bajo teniendo en cuenta la recuperación de los patrones internos y la dosis de muestra.

Los métodos bioanalíticos de cribado no darán resultados a nivel de congénere, sino una simple indicación ⁽¹⁾ del nivel de EQT, expresado en EQB, como signo de que no todos los compuestos presentes en un extracto de muestra que producen una respuesta en la prueba pueden cumplir o cumplen todos los requisitos del principio EQT.

Los métodos de cribado y los de confirmación solo pueden aplicarse para el control de una matriz determinada si son suficientemente sensibles para detectar de forma fiable los contenidos al nivel de umbral de intervención o de contenido máximo.

3. Requisitos de aseguramiento de la calidad

- 3.1. Deberán tomarse las medidas pertinentes para evitar la contaminación cruzada en cada fase del procedimiento de toma de muestras y de análisis.
- 3.2. Las muestras deberán almacenarse y transportarse en recipientes adecuados de vidrio, aluminio, polipropileno o polietileno, que no influyan en los contenidos de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas de las muestras. Deberán eliminarse los restos de polvo de papel del recipiente que contiene la muestra.
- 3.3. El almacenamiento y el transporte de las muestras de piensos deberán realizarse de modo que se preserve la integridad de las mismas.
- 3.4. En su caso, cada muestra de laboratorio deberá triturarse finamente y mezclarse a conciencia mediante un procedimiento con el que esté demostrado que se obtiene una homogeneización completa (por ejemplo, triturar hasta que pase por un tamiz de 1 mm). Las muestras deberán secarse antes de triturarse si su contenido de humedad es muy elevado.
- 3.5. Deberán controlarse los reactivos, los recipientes de vidrio y el resto del equipo para comprobar que no influyen en los resultados de EQT o EQB.
- 3.6. Deberá efectuarse un análisis en blanco realizando todo el procedimiento analítico, únicamente sin la muestra.
- 3.7. Para los métodos bioanalíticos, deberá comprobarse que todo el material de vidrio y los disolventes utilizados en el análisis están libres de compuestos que interfieran con la detección de los compuestos objeto de estudio en el intervalo de trabajo. El material de vidrio deberá enjuagarse con disolventes o calentarse a temperaturas adecuadas para eliminar de su superficie los restos de PCDD, PCDF, compuestos similares a dioxinas y demás compuestos que puedan interferir.
- 3.8. La cantidad de la muestra utilizada para la extracción deberá ser la suficiente para que se cumplan los requisitos relativos a un intervalo de trabajo lo suficientemente bajo, incluidas las concentraciones máximas o los umbrales de intervención.
- 3.9. Los procedimientos concretos de preparación de muestras que se empleen para los productos en cuestión deberán cumplir directrices aceptadas a nivel internacional.

4. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

- 4.1. De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 882/2004, los laboratorios deberán estar acreditados por un organismo reconocido que opere de conformidad con la Guía ISO 58, de modo que esté garantizado que aplican un aseguramiento de la calidad analítica. Dicha acreditación deberá efectuarse conforme a la norma EN ISO/IEC 17025. Deberán aplicarse, cuando proceda, los principios que se describen en las "Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis" ⁽²⁾,

⁽¹⁾ Los métodos bioanalíticos no son específicos de los congéneres incluidos en el esquema de FET. En la muestra pueden existir otros compuestos de estructura similar que activan los ligandos de los receptores de hidrocarburos aromáticos y contribuyen a la respuesta global. Por lo tanto, los resultados bioanalíticos no pueden constituir una estimación, sino más bien una indicación del nivel de EQT de la muestra.

⁽²⁾ En el "Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry" (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en) y en el "Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food" (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

- 4.2. La aptitud del laboratorio se demostrará mediante su participación continua y exitosa en estudios interlaboratorios para la determinación de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas en las matrices de piensos y los intervalos de concentración pertinentes.
- 4.3. Los laboratorios que apliquen métodos de cribado para los controles sistemáticos de muestras colaborarán estrechamente con los que aplican el método de confirmación, tanto para el control de calidad como para la confirmación del resultado analítico de muestras sospechosas.
5. **Requisitos básicos que deben cumplir los procedimientos analíticos aplicables a las dioxinas (PCDD/PCDF) y a los PCB similares a las dioxinas**
- 5.1. *Intervalo de trabajo y límites de cuantificación bajos*
- En el caso de las PCDD o los PCDF, las cantidades detectables deberán encontrarse en el intervalo superior de los femtogramos (10^{-15} g), dada la extrema toxicidad de algunos de estos compuestos. Para la mayoría de los congéneres del grupo de los PCB, es suficiente un límite de cuantificación en el intervalo de nanogramos (10^{-9} g). Para medir los congéneres más tóxicos de los PCB similares a las dioxinas (en particular, los congéneres no ortosustituídos), el extremo inferior del intervalo de trabajo deberá bajar hasta el nivel de picogramos (10^{-12} g). Para todos los demás congéneres de PCB, es suficiente una sensibilidad en el intervalo de los nanogramos (10^{-9} g).
- 5.2. *Selectividad elevada (especificidad)*
- 5.2.1. Es necesario establecer una distinción entre PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas y una multitud de otros compuestos extraídos simultáneamente de la muestra, capaces de interferir, y que están presentes en concentraciones de hasta varios órdenes de magnitud superiores a las de los análisis considerados. Por lo que respecta a los métodos de CG/EM, es necesario distinguir entre varios congéneres, en particular entre los tóxicos (por ejemplo, los diecisiete PCDD y PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y los doce PCB similares a las dioxinas) y los demás.
- 5.2.2. Los métodos bioanalíticos estarán en condiciones de detectar los compuestos objeto de estudio como la suma de PCDD/PCDF y/o PCB similares a las dioxinas. La limpieza de las muestras irá destinada a eliminar compuestos que provoquen falsos positivos o compuestos que puedan disminuir la respuesta, dando lugar a falsos negativos.
- 5.3. *Alto grado de exactitud (veracidad y precisión, recuperación aparente del bioensayo)*
- 5.3.1. Para los métodos de CG/EM, la determinación deberá proporcionar una estimación válida de la concentración real en una muestra. Es necesario alcanzar una exactitud elevada a fin de evitar que el resultado del análisis de una muestra sea rechazado debido a la escasa fiabilidad de la estimación de EQT. La exactitud se expresa como *veracidad* (diferencia entre el valor medio medido de un análisis en un material certificado y su valor certificado, expresado como porcentaje de este valor) y *precisión* (desviación estándar relativa RSD_R , calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad).
- 5.3.2. Para los métodos bioanalíticos, deberá determinarse la recuperación aparente del bioensayo. La recuperación aparente del bioensayo es el valor EQB calculado a partir de la curva de calibración de la TCDD o del PCB 126 corregida en función del resultado de ensayo en blanco y dividida después por el valor EQT determinado por el método de confirmación. Con ello se pretende corregir factores como la pérdida de PCDD, PCDF y compuestos similares a las dioxinas durante la extracción y la limpieza, los compuestos que se extraen simultáneamente y aumentan o reducen la respuesta (efectos agonista y antagonista), la calidad del ajuste de la curva, o las diferencias entre los valores del FET y de la potencia relativa (REP). La recuperación aparente del bioensayo se calcula a partir de muestras de referencia adecuadas que tengan pautas de congéneres representativas en torno al nivel considerado.
- 5.4. *Validación en el intervalo del nivel considerado y medidas generales de control de calidad*
- 5.4.1. Los laboratorios deberán demostrar el funcionamiento de un método en el intervalo del contenido máximo, por ejemplo 0,5, 1 y 2 veces el contenido máximo, con un coeficiente de variación aceptable para análisis repetidos durante el procedimiento de validación y durante análisis sistemáticos.

5.4.2. Como medidas internas de aseguramiento de la calidad, deberán realizarse regularmente controles en blanco y experimentos con muestras enriquecidas o análisis de muestras de control (de preferencia, si existe, material de referencia certificado). Estos controles en blanco y experimentos con muestras enriquecidas o análisis de muestras de control se registrarán en fichas de control y se comprobarán para verificar que el análisis cumple los requisitos de funcionamiento.

5.5. *Límite de cuantificación*

5.5.1. No es indispensable establecer un límite de cuantificación para los métodos bioanalíticos de cribado, pero deberá demostrarse que el método discrimina entre el blanco y el valor de corte. Cuando se ofrezca un nivel de EQB, se establecerá un nivel de referencia para tratar las muestras que presenten una respuesta por debajo de este nivel. Debe demostrarse que el nivel de notificación es diferente, al menos, por un factor de tres, de las muestras en blanco con una respuesta inferior al intervalo de trabajo. Por lo tanto, debe calcularse a partir de muestras que contengan los compuestos objeto de estudio en torno al nivel mínimo exigido, y no de una relación señal/ruido (S/R) ni de un ensayo en blanco.

5.5.2. En un método de confirmación, el límite de cuantificación debe ser aproximadamente de un quinto del contenido máximo.

5.6. *Criterios de análisis*

Para obtener resultados fiables con los métodos de confirmación o de cribado, en el intervalo del contenido máximo deberán cumplirse los siguientes criterios para el valor EQT o EQB, respectivamente, ya se determinen como EQT total o EQB total (suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas) o por separado para PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas:

	Cribado por métodos bioanalíticos o fisicoquímicos	Métodos de confirmación
Porcentaje de falsos negativos (*)	< 5 %	
Veracidad		- 20 % a + 20 %
Repetibilidad (RSD _r)	< 20 %	
Precisión intermedia (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) Con respecto a los contenidos máximos.

5.7. *Requisitos específicos para métodos de cribado*

5.7.1. El cribado podrá realizarse tanto utilizando métodos de CG/EM como métodos bioanalíticos. En el caso de los métodos de CG/EM deben cumplirse los requisitos establecidos en el punto 6. Para los métodos bioanalíticos en células se establecen requisitos específicos en el punto 7.

5.7.2. Los laboratorios que aplican métodos de cribado para los controles sistemáticos de muestras cooperarán estrechamente con los que aplican el método de confirmación.

5.7.3. Durante los análisis sistemáticos es necesario verificar el rendimiento del método de cribado, mediante un control de la calidad analítica y la validación del método en curso. Existirá un programa continuo para controlar la conformidad de los resultados.

- 5.7.4. Comprobación de la posible supresión de la respuesta celular y la citotoxicidad.

Un 20 % de los extractos de muestra se medirán a través de un cribado sistemático con y sin adición de TCDD en las posiciones 2, 3, 7 y 8, correspondientes al contenido máximo o al umbral de intervención, para comprobar si se ha podido suprimir la respuesta a causa de sustancias interfirientes presentes en el extracto de muestra. La concentración medida de la muestra enriquecida se compara a la suma de la concentración del extracto no enriquecido más la concentración de enriquecimiento. Si esta concentración medida es inferior en más de un 25 % a la concentración (sumatoria) calculada, constituye una indicación de posible supresión de la señal, y la muestra en cuestión ha de someterse a análisis de confirmación mediante GC/HRMS. Los resultados se controlarán por medio de gráficos de control de calidad.

- 5.7.5. Control de calidad de las muestras conformes.

Aproximadamente entre un 2 % y un 10 % de las muestras conformes, en función de la matriz de la muestra y de la experiencia de laboratorio, deberán confirmarse por CGAR o EMAR.

- 5.7.6. Determinación de los porcentajes de falsos negativos a partir de los datos de control de calidad.

Deberá determinarse el porcentaje de resultados falsos negativos en el cribado de muestras por debajo y por encima del contenido máximo o del umbral de intervención. Los porcentajes reales de falsos negativos deberán ser inferiores al 5 %. Cuando se disponga de un mínimo de veinte resultados confirmados por matriz o grupo de matrices a partir del control de calidad de las muestras conformes, de esta base de datos se extraerán conclusiones sobre el porcentaje de falsos negativos. Los resultados de las muestras analizadas en ensayos interlaboratorios o durante incidentes de contaminación, que cubran un intervalo de concentración de, por ejemplo, hasta el doble del contenido máximo, pueden también incluirse en el mínimo de veinte resultados para la evaluación del porcentaje de falsos negativos. Las muestras cubrirán los patrones de congéneres más frecuentes, que representen diversas fuentes.

Aunque el cribado se destina sobre todo a detectar muestras que superan el umbral de intervención, el criterio para determinar el porcentaje de falsos negativos es el contenido máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre ampliada de medición del método de confirmación.

- 5.7.7. Tras un cribado, las posibles muestras no conformes se verificarán siempre mediante un nuevo análisis completo de la muestra original por un método analítico de confirmación. Esas muestras se pueden usar asimismo para evaluar el porcentaje de falsos positivos. Para los métodos de cribado, el porcentaje de falsos positivos será la fracción de resultados confirmados conformes mediante análisis de confirmación, cuando en el cribado previo la muestra había sido declarada presuntamente no conforme. La evaluación de las ventajas del método de cribado se basará en la comparación de las muestras falsas positivas con el número total de muestras comprobadas. Ese índice deberá ser lo suficientemente bajo para que la herramienta de cribado resulte ventajosa.

- 5.7.8. En condiciones de validación, los métodos bioanalíticos deberán proporcionar una indicación válida del nivel de EQT, calculado y expresado como EQB.

También en el caso de métodos bioanalíticos empleados en condiciones repetidas, la RSD_i intralaboratorio suele ser inferior que en condiciones de reproducibilidad (RSD_R).

6. **Requisitos específicos que deben cumplir los métodos CG/EM utilizados con fines de cribado o de confirmación**

- 6.1. *Diferencias aceptables entre los resultados de límite superior y límite inferior de EQT-OMS*

La diferencia entre el límite superior y el límite inferior no superará el 20 % para la confirmación de la superación del contenido máximo o, en caso de necesidad, de los umbrales de intervención.

6.2. Control de la recuperación

- 6.2.1. A fin de validar el procedimiento analítico, será preciso añadir, desde el mismo comienzo del método analítico —por ejemplo, antes de la extracción—, patrones internos de PCDD/PCDF marcados con C^{13} clorosustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con C^{13} . Se añadirá al menos un congénere por cada grupo homólogo tetra a octoclorado de PCDD/PCDF y al menos un congénere por cada grupo homólogo de PCB similares a las dioxinas (otra posibilidad es añadir al menos un congénere por cada función de registro de iones seleccionada por espectrometría de masas y utilizada para el control de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas). En los métodos de confirmación, se utilizarán los diecisiete patrones internos de PCDD/PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y marcados con C^{13} , así como los doce patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con C^{13} .
- 6.2.2. Habrán de determinarse asimismo los factores de respuesta relativos en el caso de los congéneres para los que no se añada ningún análogo marcado con C^{13} , por medio de soluciones de calibración apropiadas.
- 6.2.3. Para los piensos de origen vegetal y de origen animal con un contenido de grasa inferior al 10 %, será obligatorio añadir patrones internos antes de proceder a la extracción. En el caso de los piensos de origen animal con un contenido de grasa superior al 10 %, los patrones internos pueden añadirse antes o después de la extracción de grasas. Deberá validarse adecuadamente la eficacia de la extracción, en función de la fase en la que se introduzcan los patrones internos.
- 6.2.4. Con anterioridad al análisis mediante CG/EM, deberán añadirse uno o dos patrones de recuperación (sustitutos).
- 6.2.5. Es preciso realizar un control de la recuperación. Para los métodos de confirmación, los porcentajes de recuperación de cada patrón interno deberán situarse en un intervalo del 60 % al 120 %. En el caso de congéneres individuales, en particular en relación con algunas dibenzo-p-dioxinas y algunos dibenzofuranos hepta y octoclorados, podrán aceptarse porcentajes de recuperación inferiores o superiores, siempre y cuando su contribución al valor de EQT no supere el 10 % del valor total de EQT (suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas). Para los métodos de cribado por CG/EM, los porcentajes de recuperación deberán situarse en un intervalo del 30 % al 140 %.

6.3. Eliminación de sustancias interfirientes

- Los PCDD/PCDF se separarán de los compuestos clorados interfirientes, tales como los PCB no similares a las dioxinas y los éteres difenílicos clorados, mediante técnicas de cromatografía adecuadas (de preferencia con una columna de florisil, alúmina o carbono, o de varios de ellos).
- La separación de los isómeros por cromatografía de gases será < 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF y 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. Calibración con curva estándar

El intervalo de la curva de calibración cubrirá el intervalo pertinente del contenido máximo o de los umbrales de intervención.

6.5. Requisitos específicos para métodos de confirmación

- Para CG/EMAR:

En EMAR, la resolución será normalmente mayor o igual a 10 000 para todo el intervalo de masa a un valle del 10 %.

Cumplimiento de otros criterios de identificación y confirmación, tal como se describen en normas reconocidas internacionalmente, por ejemplo en la norma EN 16215:2012 (Alimentos para animales. Determinación de dioxinas, de PCB como dioxinas y de PCB indicadores mediante GC/HRMS) o en los métodos EPA 1613 y 1668 modificados.

— Para CG-EM/EM:

Control de al menos dos iones precursores específicos, cada uno con un ion de transición correspondiente específico producido para todos los análisis marcados y no marcados en el ámbito de aplicación de los análisis.

Tolerancia máxima permitida de las intensidades relativas del ion de $\pm 15\%$ para iones de transición seleccionados producidos en comparación con los valores calculados o medidos (media de los patrones de calibración), en condiciones idénticas de EM/EM, en particular energía de colisión y presión del gas de colisión, para cada transición de un análisis.

La resolución de cada cuadrupolo debe ser igual o superior a la resolución de masa unitaria (resolución de masa unitaria: resolución suficiente para separar dos picos de una unidad de masa) con el fin de minimizar las posibles interferencias con los análisis considerados.

Cumplimiento de los demás criterios de identificación y confirmación, tal como se describen en normas reconocidas internacionalmente, por ejemplo en la norma EN 16215:2012 (Alimentos para animales. Determinación de dioxinas, de PCB como dioxinas y de PCB indicadores mediante GC/HRMS) o en los métodos EPA 1613 y 1668 modificados, excepto la obligación de utilizar CG/EMAR.

7. Requisitos específicos para métodos bioanalíticos

Los métodos bioanalíticos son métodos basados en el uso de principios biológicos como los ensayos celulares, los ensayos sobre el receptor o los inmunoensayos. El presente punto 7 establece requisitos para los métodos bioanalíticos en general.

Un método de cribado en principio clasifica una muestra como conforme o presuntamente no conforme. Para ello, se compara el nivel de EQB calculado con el valor de corte (véase el punto 7.3). Las muestras por debajo del valor de corte se consideran conformes, y las muestras iguales o superiores al valor de corte, presuntamente no conformes, lo que exige un análisis mediante un método de confirmación. En la práctica, un EQB correspondiente a dos tercios del contenido máximo puede servir como valor de corte siempre que se garantice un porcentaje de falsos negativos inferior a 5 % y un porcentaje aceptable de falsos positivos. Con contenidos máximos separados de PCDD/PCDF y de la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas, comprobar la conformidad de las muestras sin fraccionamiento requiere unos valores de corte de bioensayo adecuados de PCDD/PCDF. Para el control de las muestras que superan los umbrales de intervención, podrá tomarse como valor de corte un porcentaje adecuado de los mismos.

Si un valor indicativo se expresa en EQB, los resultados de las muestras estarán en el intervalo de trabajo y superarán el límite de notificación (véanse los puntos 7.1.1 y 7.1.6).

7.1. Evaluación de la respuesta al ensayo

7.1.1. Condiciones generales

— Cuando se calculan las concentraciones a partir de una curva de calibración de TCDD, los valores del límite superior de la curva presentarán una gran variación (elevado coeficiente de variación, CV). El intervalo de trabajo es el área en que dicho CV es inferior a 15 %. El extremo inferior del intervalo de trabajo (límite de comunicación) deberá establecerse, como mínimo, en el triple del de los análisis en blanco. El límite superior del intervalo de trabajo se suele representar por el valor EC_{70} (70 % de concentración efectiva máxima), pero se sitúa en un nivel inferior si el CV es superior al 15 % en este intervalo. El intervalo de trabajo se establecerá durante el procedimiento de validación. Los valores de corte (véase el punto 7.3) estarán plenamente dentro del intervalo de trabajo.

— Las soluciones estándar y los extractos de muestras deberán someterse a ensayo por triplicado o, como mínimo, por duplicado. Cuando se usan duplicados, una solución estándar o un extracto testigo probado en cuatro a seis recipientes repartidos por la placa producirán una respuesta o una concentración (solo posible en el intervalo de trabajo) basada en un $CV < 15\%$.

7.1.2. Calibración

7.1.2.1. Calibración con curva estándar

- Los contenidos de las muestras se calcularán comparando la respuesta del ensayo con una curva de calibración de la TCDD (o PCB 126, o una mezcla estándar de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas) para calcular el EQB del extracto y, posteriormente, de la muestra.
- Las curvas de calibración contendrán de ocho a doce concentraciones (como mínimo por duplicado), con concentraciones suficientes en la parte inferior de la curva (intervalo de trabajo). Se prestará una atención especial a la calidad del ajuste de la curva en el intervalo de trabajo. Como tal, el valor R^2 tiene poco o ningún valor para estimar la adecuación del ajuste en regresión no lineal. Se logrará un mejor ajuste reduciendo la diferencia entre los contenidos calculados y los observados en el intervalo de trabajo de la curva, por ejemplo minimizando la suma de los cuadrados de la variación.
- Después se corregirá el nivel calculado para el extracto de la muestra en función del EQB calculado para una muestra en blanco de matriz o disolvente (para tener en cuenta las impurezas procedentes de los disolventes o productos químicos utilizados) y en función de la recuperación aparente (calculada a partir del EQB de las muestras de referencia pertinentes con pautas representativas de congéneres en torno al contenido máximo o al umbral de intervención). Para corregir la recuperación, la recuperación aparente habrá de encontrarse en el intervalo requerido (véase el punto 7.1.4). Las muestras de referencia utilizadas para la corrección de la recuperación deberán cumplir los requisitos establecidos en el punto 7.2.

7.1.2.2. Calibración con muestras de referencia

Como alternativa podrá utilizarse una curva de calibración preparada, como mínimo, a partir de cuatro muestras de referencia (véase el punto 7.2.4): una matriz en blanco y tres muestras de referencia de 0,5, 1 y 2 veces el contenido máximo o el umbral de intervención, lo que evita tener que corregir en función del blanco y de la recuperación, si las propiedades de la matriz de las muestras de referencia se corresponden con las de las muestras desconocidas. En este caso, la respuesta correspondiente a dos tercios del contenido máximo (véase el punto 7.3) puede calcularse directamente de estas muestras y utilizarse como valor de corte. Para el control de las muestras que superan los umbrales de intervención, podrá tomarse como valor de corte un porcentaje adecuado de los mismos.

7.1.3. Determinación por separado de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas

Los extractos pueden dividirse en fracciones que contengan PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas, permitiendo de esa forma una indicación separada de niveles de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas (en EQB). Se utilizará preferiblemente una curva de calibración estándar del PCB 126 para evaluar los resultados de la fracción que contenga PCB similares a las dioxinas.

7.1.4. Recuperaciones aparentes de los bioensayos

La “recuperación aparente de los bioensayos” se calculará a partir de muestras de referencia adecuadas con patrones de congéneres representativos próximos al contenido máximo o al umbral de intervención y expresados en porcentaje del valor EQB en comparación con el nivel de EQT. Según el tipo de ensayo y el esquema de FET utilizados ⁽¹⁾, las diferencias entre el FET y la REP para los PCB similares a las dioxinas pueden producir una baja recuperación aparente en PCB similares a las dioxinas, en comparación con las PCDD o los PCDF. Por tanto, si se determinan por separado las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas, las recuperaciones aparentes de bioensayo serán: para los PCB similares a las dioxinas, del 20 % al 60 %; para las PCDD y los PCDF, del 50 % al 130 % (si se emplea la curva de calibración TCDD). La contribución de los PCB similares a las dioxinas a la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas puede variar entre diferentes matrices y muestras, por lo que las recuperaciones aparentes de bioensayos para la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas reflejan estos intervalos y se situarán entre el 30 % y el 130 %. Cualquier modificación sustancial para la legislación de la Unión de los FET revisados de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas exige revisar estos intervalos.

⁽¹⁾ Los requisitos actuales se basan en los FET publicados en: M. Van den Berg et al., *Toxicol Sci* 93 (2), 223-241 (2006).

7.1.5. Control de la recuperación para la limpieza

La pérdida de compuestos durante la fase de limpieza deberá comprobarse durante el procedimiento de validación. Una muestra en blanco enriquecida con una mezcla de diferentes congéneres se someterá a limpieza ($n = 3$ por lo menos) y la recuperación y la variabilidad se comprobarán mediante un análisis por método de confirmación. La recuperación deberá hallarse entre el 60 % y el 120 %, especialmente en el caso de los congéneres que contribuyen con más del 10 % al EQT en varias mezclas.

7.1.6. Límite de comunicación

Al notificar los valores EQB, se determinará un límite de notificación a partir de muestras de matriz pertinentes que incluyan patrones de congéneres tipo, y no a partir de la curva de calibración de los patrones a causa de la falta de precisión del intervalo inferior de la curva. Se tendrán en cuenta los efectos de la extracción y la limpieza. El límite de comunicación se establecerá, como mínimo, en el triple del de los análisis en blanco.

7.2. Utilización de muestras de referencia

7.2.1. Las muestras de referencia deberán representar la matriz de la muestra, las pautas de congénere y los intervalos de concentración de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas en torno al contenido máximo o al umbral de intervención.

7.2.2. En cada serie de ensayos se incluirán una matriz en blanco (si no es posible, una prueba en blanco) y una muestra de referencia al contenido máximo o del umbral de intervención. Estas muestras deberán extraerse y analizarse al mismo tiempo y en condiciones idénticas. Como garantía de que el ensayo es adecuado, la muestra de referencia deberá presentar una respuesta claramente superior a la de la muestra en blanco. Esas muestras pueden usarse para la corrección del blanco y de la recuperación.

7.2.3. Las muestras de referencia elegidas para corregir la recuperación serán representativas de las muestras de ensayo, lo que significa que las pautas de congénere no pueden dar lugar a una subestimación de los contenidos.

7.2.4. Deberán incluirse otras muestras de referencia de, por ejemplo, 0,5 y 2 veces el contenido máximo o el umbral de intervención, a fin de demostrar el correcto funcionamiento del ensayo en el intervalo pertinente para el control del contenido máximo o del umbral de intervención. Combinadas, estas muestras pueden utilizarse para calcular los EQB en las muestras de ensayo (véase el punto 7.1.2.2).

7.3. Determinación de los valores de corte

Deberá establecerse la relación entre los resultados bioanalíticos en EQB y los resultados del método de confirmación en EQT, por ejemplo mediante experimentos de calibración ajustados por matrices, con muestras de referencia enriquecidas a 0, 0,5, 1 y 2 veces el contenido máximo, y con seis repeticiones de cada nivel ($n = 24$). Los factores de corrección (del blanco y de la recuperación) pueden calcularse a partir de esta relación, pero se verificarán con arreglo al punto 7.2.2.

Se establecerán valores de corte para decidir si una muestra es conforme a los contenidos máximos o para controlar los umbrales de intervención, si procede, con los respectivos contenidos máximos o umbrales de intervención fijados para las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas por separado, o para la suma de los tres. Estos valores de corte representan el criterio de valoración más bajo de la distribución de los resultados bioanalíticos (corregidos en función del blanco y de la recuperación) correspondientes al límite de decisión del método de confirmación con un nivel de confianza del 95 %, lo que implica un porcentaje de falsos negativos < 5 %, y con una $RSD_R < 25$ %. El límite de decisión del método de confirmación es el contenido máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre ampliada de medición.

El valor de corte (en EQB) puede calcularse con arreglo a uno de los métodos establecidos en los puntos 7.3.1, 7.3.2 y 7.3.3 (véase la figura 1).

- 7.3.1. Uso de la banda *inferior* del intervalo de predicción del 95 % en el límite de decisión del método de confirmación

$$\text{Valor de corte} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

Donde:

EQB_{LD} El EQB correspondiente al límite de decisión del método de confirmación es el contenido máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre ampliada de medición.

$s_{y,x}$ desviación estándar residual

$t_{\alpha, f=m-2}$ factor t de Student ($\alpha = 5\%$, $f =$ grados de libertad, por una cara)

m número total de puntos de calibración (índice j)

n número de repeticiones en cada nivel

x_i concentración de la muestra (en EQT) del punto de calibración i determinada por un método de confirmación

\bar{x} media de las concentraciones (en EQT) de todas las muestras de calibración

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \text{ parámetro suma de cuadrados; } i = \text{índice del punto de calibración } i$$

- 7.3.2. Cálculo a partir de resultados bioanalíticos (corregidos en función del blanco y de la recuperación) de múltiples análisis de muestras ($n \geq 6$) contaminadas en el límite de decisión del método de confirmación, como el criterio de valoración *más bajo* de la distribución de los datos en la correspondiente media de EQB:

$$\text{Valor de corte} = \text{EQB}_{\text{LD}} - 1,64 \times \text{SD}_{\text{R}}$$

Donde:

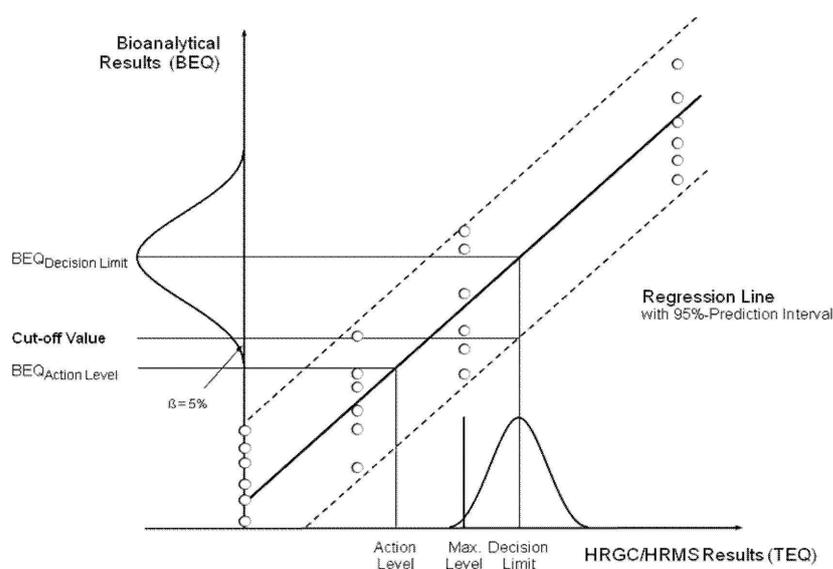
SD_{R} desviación estándar de los resultados de los bioensayos en EQB_{DL} , medidos en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio

- 7.3.3. Cálculo como valor medio de los resultados bioanalíticos (en EQB, corregidos en función del blanco y de la recuperación) de múltiples análisis de muestras ($n \geq 6$) contaminadas a dos tercios del contenido máximo o del umbral de intervención, pues se observa que este nivel se halla en torno al valor de corte determinado con arreglo al punto 7.3.1 o al punto 7.3.2:

Cálculo de los valores de corte con un nivel de confianza del 95 %, lo que implica un porcentaje de falsos negativos $< 5\%$, y con una $\text{RSD}_{\text{R}} < 25\%$:

- 1) A partir de la banda *inferior* del intervalo de predicción del 95 % en el límite de decisión del método de confirmación.
- 2) A partir de múltiples análisis de muestras ($n \geq 6$) contaminadas en el límite de decisión del método de confirmación, como el criterio de valoración *más bajo* de la distribución de los datos (representado en la figura por una curva en forma de campana) en la correspondiente media de EQB.

Figura 1



7.3.4. Restricciones de los valores de corte

Los valores de corte basados en el EQB y calculados a partir de la RSD_R obtenida durante la validación utilizando un reducido número de muestras con diferentes pautas de matriz o de congénere pueden ser superiores a los contenidos máximos o umbrales de intervención basados en EQT, pues así se alcanza más precisión que en los análisis sistemáticos, en los cuales hay que controlar un espectro desconocido de posibles pautas de congénere. En tales casos, los valores de corte se calcularán a partir de una $RSD_R = 25\%$, o, mejor, de dos tercios del contenido máximo o del umbral de intervención.

7.4. Características de funcionamiento

- 7.4.1. Puesto que en los métodos bioanalíticos no pueden utilizarse patrones internos, deberán efectuarse ensayos de la repetibilidad de los métodos bioanalíticos para obtener datos sobre la desviación estándar en una serie de ensayos y entre las mismas series. La repetibilidad será inferior al 20 %, y la reproducibilidad intralaboratorio inferior al 25 %, sobre la base de los niveles calculados en EQB tras la corrección en función del blanco y de la recuperación.
- 7.4.2. Como parte del proceso de validación, tendrá que demostrarse que las pruebas permiten discriminar entre una muestra en blanco y un contenido en el valor de corte, de modo que puedan identificarse las muestras con contenido superior al correspondiente valor de corte (véase el punto 7.1.2).
- 7.4.3. Deberán identificarse claramente los compuestos objeto de estudio, las posibles interferencias y los contenidos máximos tolerables de blanco.
- 7.4.4. La desviación estándar de la respuesta o la concentración calculada a partir de la respuesta (solo posible en el intervalo de trabajo) de una determinación por triplicado de un extracto de muestra no podrá ser superior al 15 %.
- 7.4.5. Los resultados no corregidos de la muestra o las muestras de referencia expresados en EQB (en blanco y en el contenido máximo o umbral de intervención) se utilizarán para evaluar el funcionamiento del método bioanalítico durante un período de tiempo constante.
- 7.4.6. Los controles en blanco y cada tipo de muestras de referencia se registrarán en fichas de control y se comprobarán para verificar que el análisis cumple los requisitos de funcionamiento; los controles en blanco, en particular, con respecto a la requerida diferencia mínima con el extremo inferior del intervalo de trabajo, y las muestras de referencia, en cuanto a la reproducibilidad intralaboratorio. Las pruebas en blanco se controlarán de modo que se eviten los falsos negativos al sustraer los valores.

- 7.4.7. Los resultados de los métodos de confirmación de muestras sospechosas y entre el 2 % y el 10 % de las muestras conformes (mínimo de veinte muestras por matriz) se recopilarán y utilizarán para evaluar el funcionamiento del método de cribado y la relación entre EQB y EQT. Esta base de datos puede utilizarse para evaluar de nuevo los valores de corte aplicables a las muestras sistemáticas de las matrices validadas.
- 7.4.8. También se puede demostrar el funcionamiento satisfactorio del método participando en ensayos interlaboratorios. Los resultados de las muestras analizadas en ensayos interlaboratorios, que cubran una gama de concentración de hasta, por ejemplo, dos veces el contenido máximo, podrán tenerse en cuenta para evaluar el porcentaje de falsos negativos, una vez que un laboratorio haya demostrado su correcto funcionamiento. Las muestras cubrirán los patrones de congéneres más frecuentes, que representen diversas fuentes.
- 7.4.9. Durante los incidentes, se pueden volver a evaluar los valores de corte, para reflejar la matriz y los patrones de congéneres específicos de ese mismo incidente.

8. Comunicación de los resultados

8.1. Métodos de confirmación

- 8.1.1. Los resultados del análisis incluirán los niveles de los congéneres individuales de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas y se indicarán como límite inferior, límite superior y límite intermedio, a fin de incluir el máximo de información posible en la notificación de los resultados, lo que permitirá así interpretarlos en función de los requisitos específicos.
- 8.1.2. La notificación indicará el método utilizado para la extracción de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas.
- 8.1.3. Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno cuando estén fuera del intervalo mencionado en el punto 6.2.5 o se supere el contenido máximo (en este caso, los porcentajes de recuperación de uno de los dos análisis duplicados), así como en otros casos cuando se solicite.
- 8.1.4. Puesto que, al decidir sobre la conformidad de una muestra, se ha de tener en cuenta la incertidumbre ampliada de medición, también se indicará este parámetro. Así pues, los resultados analíticos deberán expresarse como $x \pm U$, donde x es el resultado analítico y U es la incertidumbre ampliada de medición, aplicando un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza aproximado del 95 %. Si se determinan por separado las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas, para establecer su suma se utilizará la suma de la incertidumbre ampliada estimada de los resultados analíticos obtenidos por separado de cada uno de ellos.
- 8.1.5. Los resultados deberán expresarse en las mismas unidades y, como mínimo, con el mismo número de cifras significativas que los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE.

8.2. Métodos bioanalíticos de cribado

- 8.2.1. El resultado del cribado se expresará como “conforme” o “presuntamente no conforme” (“sospechoso”).
- 8.2.2. Además, podrá indicarse un resultado indicativo de PCDD/PCDF o PCB similares a las dioxinas expresados en EQB, y no en EQT.
- 8.2.3. Las muestras con contenido “inferior al límite de comunicación” se indicarán como tales. Las muestras cuya respuesta sea superior al intervalo de trabajo se notificarán como muestras que “superan el intervalo de trabajo” y el nivel correspondiente al límite superior del intervalo de trabajo se expresará en EQB.
- 8.2.4. Para cada tipo de matriz de la muestra, la notificación mencionará el contenido máximo o el umbral de intervención en el que se basa la evaluación.
- 8.2.5. La notificación mencionará el tipo de ensayo realizado, sus principios básicos y el tipo de calibración.

- 8.2.6. La notificación indicará el método utilizado para la extracción de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas.
- 8.2.7. En el caso de las muestras presuntamente no conformes, la notificación debe incluir una nota sobre las medidas que deben tomarse. La concentración de PCDD/PCDF y de la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas en esas muestras con niveles elevados debe determinarse o confirmarse mediante un método de confirmación.
- 8.2.8. Los resultados no conformes únicamente se notificarán a partir de análisis de confirmación.
- 8.3. *Métodos fisicoquímicos de cribado*
- 8.3.1. El resultado del cribado se expresará como “conforme” o “presuntamente no conforme” (“sospechoso”).
- 8.3.2. Para cada tipo de matriz de la muestra, la notificación mencionará el contenido máximo o el umbral de intervención en el que se basa la evaluación.
- 8.3.3. Además, podrán indicarse los niveles de los congéneres individuales de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas, así como los valores EQT, como límite inferior, límite superior y límite intermedio. Los resultados deberán expresarse en las mismas unidades y, como mínimo, con el mismo número de cifras significativas que los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE.
- 8.3.4. Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno cuando estén fuera del intervalo mencionado en el punto 6.2.5 o se supere el contenido máximo (en este caso, los porcentajes de recuperación de uno de los dos análisis duplicados), así como en otros casos cuando se solicite.
- 8.3.5. La notificación mencionará el método aplicado de CG-EM.
- 8.3.6. La notificación indicará el método utilizado para la extracción de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas.
- 8.3.7. En el caso de las muestras presuntamente no conformes, la notificación debe incluir una nota sobre las medidas que deben tomarse. La concentración de PCDD/PCDF y de la suma de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas en esas muestras con niveles elevados debe determinarse o confirmarse mediante un método de confirmación.
- 8.3.8. La no conformidad únicamente se decidirá después de análisis de confirmación.

CAPÍTULO III

Preparación de las muestras y requisitos aplicables a los métodos de análisis utilizados en el control oficial de los contenidos de pcb no similares a las dioxinas en los piensos

1. Campo de aplicación

Los requisitos establecidos en el presente capítulo se aplicarán al análisis de piensos realizado para el control oficial de los contenidos de PCB no similares a las dioxinas en lo que respecta a la preparación de las muestras y los requisitos analíticos con otros fines reglamentarios, incluidos los controles llevados a cabo por el explotador de la empresa de piensos para garantizar el cumplimiento de lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 183/2005.

2. Métodos de detección aplicables

Cromatografía de gases con detección por captura electrónica (CG/ECD), CG/EMBR, CG-EM/EM, CG/EMAR o métodos equivalentes.

3. **Identificación y confirmación de los análisis considerados**

- 3.1. Tiempo relativo de retención en relación con patrones internos o patrones de referencia (desviación tolerable de +/- 0,25 %).
- 3.2. Separación por cromatografía de gases de los PCB no similares a las dioxinas de sustancias interfirientes, especialmente los PCB que eluyen conjuntamente, sobre todo si los niveles de muestras están dentro de los límites legales y debe confirmarse la no conformidad ⁽¹⁾.
- 3.3. Requisitos para las técnicas de CG/EM

Control de al menos el siguiente número de iones moleculares o iones característicos del agregado molecular:

- a) dos iones específicos en el caso de la EMAR;
- b) tres iones específicos en el caso de la EMBR;
- c) dos iones precursores específicos, cada uno con un ion de transición correspondiente específico producido en el caso de EM/EM.

Tolerancias máximas permitidas para las relaciones de abundancia relativas a fragmentos de masa seleccionados:

Desviación relativa de la relación de abundancia de los fragmentos de masa seleccionados en términos de abundancia teórica o patrón de calibración para el ion objetivo (el ion más abundante controlado) y el ion o los iones calificadores: $\pm 15\%$

3.4. Requisitos para las técnicas de CG-ECD

Los resultados que superen el límite máximo se confirmarán mediante dos columnas de CG con fases estacionarias de polaridad diferente.

4. **Demostración del funcionamiento del método**

El funcionamiento del método deberá validarse en el intervalo del contenido máximo (de 0,5 a 2 veces el contenido máximo), con un coeficiente de variación aceptable para análisis repetidos (véanse los requisitos de precisión intermedia en el punto 9).

5. **Límite de cuantificación**

La suma de los límites de cuantificación ⁽²⁾ de los PCB no similares a las dioxinas no deberá superar un tercio del contenido máximo ⁽³⁾.

6. **Control de calidad**

Controles en blanco a intervalos regulares, análisis de muestras enriquecidas, muestras para el control de la calidad y participación en estudios interlaboratorios con las matrices pertinentes.

7. **Control de la recuperación**

- 7.1. Se utilizarán patrones internos adecuados con propiedades fisicoquímicas comparables a los análisis considerados.

⁽¹⁾ Entre los congéneres que suelen eluir conjuntamente figuran, por ejemplo, PCB 28/31, PCB 52/69 y PCB 138/163/164. En los análisis por CG/EM también hay que tener en cuenta posibles interferencias de fragmentos de congéneres más clorados.

⁽²⁾ Deberán aplicarse, cuando proceda, los principios que se describen en el "Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food" (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

⁽³⁾ Es altamente recomendable tener una contribución del nivel de blanco de reactivo inferior al nivel de un contaminante en una muestra. Corresponde al laboratorio controlar la variación de niveles de blanco, en particular si se restan dichos niveles.

- 7.2. Adición de patrones internos:
- Se añaden a los productos (antes del proceso de extracción y limpieza).
- 7.3. Requisitos para los métodos que utilizan los seis congéneres de PCB no similares a las dioxinas marcados con isótopos:
- se corregirán los resultados en función de la recuperación de los patrones internos;
 - la recuperación de los patrones internos marcados con isótopos deberá situarse entre el 60 % y el 120 %;
 - son aceptables recuperaciones superiores o inferiores de congéneres cuya contribución a la suma de los seis PCB no similares a las dioxinas sea inferior al 10 %.
- 7.4. Requisitos para los métodos que no utilizan los seis patrones internos marcados con isótopos u otros patrones internos:
- se controlará la recuperación de los patrones internos en cada muestra;
 - la recuperación de los patrones internos deberá situarse entre el 60 % y el 120 %;
 - se corregirán los resultados en función de la recuperación de los patrones internos.
- 7.5. Las recuperaciones de congéneres no marcados deberán comprobarse por medio de muestras enriquecidas o de muestras de control de calidad con concentraciones en el intervalo del contenido máximo. Serán aceptables para estos congéneres recuperaciones situadas entre el 60 % y el 120 %.

8. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 882/2004, los laboratorios deberán estar acreditados por un organismo reconocido que opere de conformidad con la Guía ISO 58, de modo que esté garantizado que aplican un aseguramiento de la calidad analítica. Dicha acreditación deberá efectuarse conforme a la norma EN ISO/IEC 17025. Además, deberán aplicarse, cuando proceda, los principios que se describen en las "Technical Guidelines for the estimation of measurement uncertainty and limits of quantification for PCDD/F and PCB analysis" ⁽¹⁾

9. Características de funcionamiento: Criterios para la suma de los seis PCB no similares a las dioxinas al nivel considerado

	Espectrometría de masas con dilución isotópica ⁽¹⁾	Otras técnicas
Veracidad	- 20 a + 20 %	- 30 a + 30 %
Precisión intermedia (RSD)	≤ 15 %	≤ 20 %
Diferencia entre el cálculo del límite superior y del límite inferior	≤ 20 %	≤ 20 %

⁽¹⁾ Es preciso utilizar los seis análogos marcados con C¹³ como patrones internos.

10. Comunicación de los resultados

- 10.1. Los resultados del análisis incluirán los niveles de los congéneres individuales de PCB no similares a las dioxinas y la suma de ellos, y se indicarán como límite inferior, límite superior y límite intermedio, a fin de incluir el máximo de información posible en la notificación de los resultados, lo que permitirá así interpretarlos en función de los requisitos específicos.

⁽¹⁾ Los requisitos actuales se basan en los FET publicados en: M. Van den Berg et al., Toxicol Sci 93 (2), 223-241 (2006).

- 10.2. El informe indicará el método utilizado para la extracción de PCB.
 - 10.3. Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno en caso de que estén fuera del intervalo mencionado en el punto 7 o de que se supere el contenido máximo, así como en otros casos cuando se solicite.
 - 10.4. Puesto que, al decidir sobre la conformidad de una muestra, se ha de tener en cuenta la incertidumbre ampliada de medición, también se indicará ese parámetro. Así pues, los resultados analíticos deberán expresarse como $x \pm U$, donde x es el resultado analítico y U es la incertidumbre ampliada de medición, aplicando un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza aproximado del 95 %.
 - 10.5. Los resultados deberán expresarse en las mismas unidades y, como mínimo, con el mismo número de cifras significativas que los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE.»
-