

**REGLAMENTO (UE) N° 278/2012 DE LA COMISIÓN****de 28 de marzo de 2012****por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 152/2009 en lo que respecta a la determinación de los contenidos de dioxinas y 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° 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 <sup>(1)</sup>, y, en particular, su artículo 11, apartado 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) La Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 7 de mayo de 2002, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal <sup>(2)</sup>, establece los contenidos máximos de dioxinas, furanos y policlorobifenilos (PCB) en los piensos y los umbrales de intervención a partir de los cuales los Estados miembros llevarán a cabo investigaciones para identificar las fuentes de las que provienen dichas sustancias.
- (2) El Reglamento (CE) n° 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 <sup>(3)</sup>, incluye los métodos de determinación de los contenidos de policlorodibenzodioxinas (PCDD), de policlorodibenzofuranos (PCDF) y de policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas en los piensos.
- (3) Para detectar muestras con contenidos significativos de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas puede utilizarse un método analítico de cribado de productividad elevada y validez ampliamente aceptable (preferiblemente seleccionando muestras que superen los umbrales de intervención y otras que superen los contenidos máximos). Es preciso determinar en estas muestras los contenidos de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas mediante un método analítico de confirmación. Por ello, conviene establecer requisitos adecuados para el método de cribado, de modo que arroje menos del 5 % de falsos negativos en cuanto a los contenidos máximos, y también requisitos estrictos para los métodos analíticos de confirmación.

Además, los métodos de confirmación permiten determinar también los contenidos en los niveles inferiores, lo cual es importante para observar las tendencias con el paso del tiempo, evaluar la exposición y reevaluar los contenidos máximos y los umbrales de intervención.

- (4) La modificación de los contenidos máximos de dioxinas y PCB similares a las dioxinas, el establecimiento de contenidos máximos de PCB no similares a las dioxinas en la Directiva 2002/32/CE y la necesidad de actualizar los criterios de los métodos de cribado hacen preciso modificar las normas sobre la determinación de dioxinas y PCB en los piensos, establecidas en la parte B del anexo V del Reglamento (CE) n° 152/2009. Por razones de claridad y comprensión, conviene sustituir la parte B del anexo V.
- (5) Es de vital importancia que los resultados analíticos se comuniquen e interpreten de manera uniforme, a fin de garantizar un enfoque armonizado en toda la Unión de las acciones encaminadas a hacer cumplir la normativa.
- (6) Procede, por tanto, modificar en consecuencia el anexo V del Reglamento (CE) n° 152/2009.
- (7) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal, y ni el Parlamento Europeo ni el Consejo se han opuesto a ellas.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

*Artículo 1*

La parte B del anexo V del Reglamento (CE) n° 152/2009 se modifica de conformidad con el anexo del presente Reglamento.

*Artículo 2*

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir de la fecha de su entrada en vigor.

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

Hecho en Bruselas, el 28 de marzo de 2012.

Por la Comisión

El Presidente

José Manuel BARROSO

<sup>(1)</sup> DO L 165 de 30.4.2004, p. 1.

<sup>(2)</sup> DO L 140 de 30.5.2002, p. 10.

<sup>(3)</sup> DO L 54 de 26.2.2009, p. 1.

## ANEXO

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

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

## CAPÍTULO I

**Métodos de muestreo e interpretación de los resultados analíticos**1. **Objeto y ámbito de aplicación**

Las muestras destinadas al control oficial de los contenidos de policlorodibenzodioxinas (PCDD), de policlorodibenzofuranos (PCDF), de policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas (\*) 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.A del anexo I. Las muestras globales así obtenidas se considerarán representativas de los lotes o sublotes de los que se obtengan. El cumplimiento de los contenidos máximos establecidos en la Directiva 2002/32/CE se determinará en función de los contenidos hallados en las muestras de laboratorio.

(\*) Tabla de FET (= factores de equivalencia tóxica) correspondientes a dioxinas, furanos y PCB similares a las dioxinas

Los FET-OMS para 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 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).

Congénera	Valor FET	Congénera	Valor FET
<b>Policlorodibenzodioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF)</b>		<b>PCB similares a las dioxinas: PCB no-orto + PCB mono-orto</b>	
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 empleadas: «T» = tetra; «Pe» = penta; «Hx» = hexa; «Hp» = hepta; «O» = octo; «CDD» = clorodibenzodioxina; «CDF» = clorodibenzofurano; «CB» = clorobifenilo.

A los efectos de la presente parte del anexo V, son de aplicación las definiciones establecidas en el anexo I de la Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 12 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.

## 2. Conformidad del lote o sublote con la especificación

### 2.1. *Por lo que respecta a los PCB no similares a las dioxinas*

El lote cumple la especificación si el resultado del análisis no supera el nivel máximo de PCB no similares a las dioxinas fijado en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida.

El lote no cumple la especificación si el resultado analítico del límite superior (\*\*\*) confirmado mediante un análisis por duplicado (\*\*\*\*) supera el nivel máximo fijado en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida.

La incertidumbre de medida se tendrá en cuenta con arreglo a uno de los siguientes métodos:

- calculando la incertidumbre expandida con un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza del 95 % aproximadamente. Un lote o sublote no es conforme si el valor medido menos U está por encima del nivel máximo,
- estableciendo el límite de decisión (CC $\alpha$ ) con arreglo al punto 3.1.2.5 del anexo I de la Decisión 2002/657/CE. Un lote o sublote no es conforme si el valor medido es igual o superior al CC $\alpha$ .

Las presentes normas de interpretación se aplican 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.

---

(\*\*\*) El concepto de "límite superior" exige considerar el límite de cuantificación como contribución de cada congénere no cuantificado. El concepto de "límite inferior" exige considerar cero la contribución de cada congénere no cuantificado. El concepto de "límite intermedio" exige considerar la mitad del límite de cuantificación como contribución de cada congénere no cuantificado.

(\*\*\*\*) El análisis por duplicado es necesario para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. El primer análisis, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida, se realiza para verificar el cumplimiento. Si el análisis se realiza en el marco de un incidente de contaminación, puede prescindirse de la confirmación mediante un análisis por duplicado si la trazabilidad pone de manifiesto que las muestras seleccionadas para el análisis están relacionadas con dicho incidente.

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

El lote cumple las especificaciones 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 nivel 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,
- realizado por un método de confirmación, indica que no se supera el nivel 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 de medida.

Para los ensayos de cribado se establecerá un valor de corte para decidir el cumplimiento o no de los niveles de interés que se hayan establecido para las PCDD o los PCDF y para la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas.

El lote no cumple la especificación si el resultado analítico del límite superior (\*\*\*\*) obtenido por un método de confirmación y confirmado mediante un análisis por duplicado supera el contenido máximo fijado en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida (\*\*\*\*\*).

La incertidumbre de medida se tendrá en cuenta con arreglo a uno de los siguientes métodos:

- calculando la incertidumbre expandida con un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza del 95 % aproximadamente. Un lote o sublote no es conforme si el valor medido menos U está por encima del nivel máximo. Si se determinan por separado las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas, para establecer la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas se utilizará la suma de la incertidumbre expandida estimada de los resultados analíticos obtenidos por separado de las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas,
- estableciendo el límite de decisión (CC $\alpha$ ) con arreglo al punto 3.1.2.5 del anexo I de la Decisión 2002/657/CE. Un lote o sublote no es conforme si el valor medido es igual o superior al CC $\alpha$ .

Las presentes normas de interpretación se aplican 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.

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

(\*\*\*\*\*) El análisis por duplicado es necesario para descartar la posibilidad de contaminación cruzada interna o de combinación accidental de muestras. El primer análisis, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida, se realiza para verificar el cumplimiento. Si el análisis se realiza en el marco de un incidente de contaminación, puede prescindirse de la confirmación mediante un análisis por duplicado si la trazabilidad pone de manifiesto que las muestras seleccionadas para el análisis están relacionadas con dicho incidente.

### 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 muestras cuando es necesario identificar una fuente de contaminación y tomar medidas para reducirla o eliminarla. Los métodos de cribado deben establecer valores de corte adecuados para seleccionar dichas muestras. Los esfuerzos necesarios para identificar la fuente y reducir o eliminar la contaminación se desplegarán solo cuando se confirme que se han superado los umbrales de intervención mediante un análisis por duplicado, con un método de confirmación y teniendo en cuenta la incertidumbre de medida (\*\*\*\*\*).

(\*\*\*\*\*) La misma explicación e idénticos requisitos para el análisis por duplicado para controlar los umbrales de intervención que en la nota (\*\*\*\*\*) a pie de página para los contenidos máximos.

## 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. **Ámbito de aplicación**

Los requisitos establecidos en el presente anexo se aplicarán al análisis de piensos realizado para el control oficial de los contenidos de policlorodibenzodioxinas (PCDD), policlorodibenzofuranos (PCDF) y policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8, y con fines reglamentarios.

El control de la presencia de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas en los piensos puede realizarse con dos objetivos diferentes:

- Seleccionar las muestras con contenidos de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas que superan los contenidos máximos o los umbrales de intervención. Este enfoque puede requerir un método que permita el cribado rentable de una gran cantidad de muestras, que aumente las posibilidades de descubrir nuevos incidentes con exposición y riesgo elevados para la salud de los consumidores. Los métodos de cribado pueden consistir en análisis biológicos y por cromatografía de gases o espectrometría de masas (CG/EM). Al aplicarlos debe velarse por evitar los falsos negativos. En las muestras con contenidos significativos, debe determinarse o confirmarse la concentración de PCDD y PCDF y la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas mediante un método de confirmación.
- Determinar los contenidos de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas en muestras de piensos en los niveles inferiores, lo que es importante para observar las tendencias temporales, evaluar la exposición de la población y construir una base de datos que permita reevaluar los umbrales de intervención y los contenidos máximos. Este objetivo se logra por métodos de confirmación que permiten identificar y cuantificar PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas de forma inequívoca, al nivel considerado. Estos métodos pueden servir, en el control de los piensos, para confirmar los resultados obtenidos por los métodos de cribado y para determinar niveles bajos. También son importantes para establecer pautas de congéneres que permitan determinar la fuente de una posible contaminación. Actualmente, estos métodos recurren a la cromatografía de gases de alta resolución (CGAR) o a la espectrometría de masas de alta resolución (EMAR).

#### 2. **Clasificación de los métodos por su grado de cuantificación (\*\*\*\*\*)**

(\*\*\*\*\*\*) Adaptado para PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas de *Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines* (Directrices para la validación de métodos de cribado de residuos de medicamentos veterinarios), Laboratorios de Referencia de la UE para residuos de medicamentos veterinarios y contaminantes en alimentos de origen animal de Fougères, Berlín y Bilthoven, 20.1.2010, [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab\\_analysis\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm).

- 2.1. Los *métodos cualitativos* indican si están presentes o no los analitos de interés, sin cuantificar la concentración del presunto analito. Los métodos cualitativos podrían servir asimismo para obtener resultados semicuantitativos, pero solo se usan para notificar si se han encontrado o no contenidos por encima o por debajo de determinados valores, como, por ejemplo, límite de detección, límite de cuantificación o valores de corte.

Para controlar en los piensos los contenidos máximos y los umbrales de intervención para PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas, pueden aplicarse métodos de cribado basados en la comparación del resultado analítico con un valor de corte para notificar si se ha superado o no el nivel considerado.

- 2.2. Los *métodos semicuantitativos* dan una indicación aproximada de la concentración del presunto analito, si bien el resultado numérico no cumple los requisitos de los métodos cuantitativos. Pueden servir para indicar el intervalo de la concentración del analito, de modo que el analista decida el ámbito de calibración de la prueba de confirmación que se realizará ulteriormente, y para control de la calidad. Por ejemplo, los métodos siguientes se consideran semicuantitativos:
- a) métodos que recurren a principios biológicos, como los análisis en células, los de receptores o los inmunoanálisis, denominados en lo sucesivo métodos bioanalíticos, que posibilitan la detección de los analitos de interés, incluyen una curva de calibración, indican si se ha superado el nivel considerado y permiten notificar los resultados como equivalentes bioanalíticos (EQB), lo que constituye una indicación del EQT de la muestra;
  - b) ensayos fisicoquímicos [por ejemplo, cromatografía de gases/espectrometría de masas-espectrometría de masas (CG/EM-EM) o cromatografía de gases/espectrometría de masas de baja resolución (CG/EMBR)] cuando los criterios medidos de precisión del método no cumplen los requisitos de los análisis cuantitativos.
- 2.3. Los *métodos cuantitativos* cumplen los mismos requisitos de exactitud, intervalo dinámico y precisión que los métodos de confirmación. Cuando se requiera cuantificación, los métodos cuantitativos se validarán como métodos de confirmación.

### 3. Antecedentes

Para calcular las concentraciones de equivalente tóxico (EQT), se multiplica la concentración de cada sustancia de una muestra dada por su respectivo factor de equivalencia tóxica (FET), establecido por la Organización Mundial de la Salud y enumerado en el apéndice del presente anexo, y se suman luego para obtener la concentración total de compuestos similares a dioxinas expresados en EQT.

A los efectos de la presente parte B del anexo V, el límite de cuantificación específico aceptado de un congénere individual es la concentración de un analito 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 menos sensible, y que cumple requisitos de identificación como los descritos, por ejemplo, en el proyecto de norma prEN 16215 [Alimentos para animales. Determinación de dioxinas y PCBs, como dioxinas mediante GC/HRMS y de PCBs mediante PCB indicadores mediante GC/HRMS] o en el método EPA 1613, revisión B.

Los métodos bioanalíticos de cribado no darán resultados a nivel de congénere, sino una simple indicación (\*\*\*\*\*) del nivel de EQT, expresada en equivalentes bioanalíticos (EQB), como signo de que no todos los compuestos presentes en un extracto de muestra que producen una respuesta en la prueba 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 considerado (umbral de intervención o contenido máximo).

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

### 4. Requisitos de aseguramiento de la calidad

- 4.1. Deben tomarse las medidas pertinentes para evitar la contaminación cruzada en cada fase del procedimiento de toma de muestras y de análisis.
- 4.2. Las muestras deben 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. Deben eliminarse del recipiente que contiene la muestra los restos de polvo de papel.

- 4.3. El almacenamiento y el transporte de las muestras de piensos deben realizarse de modo que se preserve la integridad de las mismas.
- 4.4. En su caso, cada muestra de laboratorio debe 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 deben secarse antes de triturarse si su contenido de humedad es muy elevado.
- 4.5. Deben controlarse los reactivos, los recipientes de vidrio y el resto del equipo para comprobar que no influyen en los resultados de EQT o EQB.
- 4.6. Debe efectuarse un análisis en blanco realizando todo el procedimiento analítico, omitiendo únicamente la muestra.
- 4.7. Para los métodos bioanalíticos, debe 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 debe 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.
- 4.8. La cantidad de la muestra utilizada para la extracción debe ser la suficiente para que se cumplan los requisitos relativos a un intervalo de trabajo lo suficientemente bajo, incluidas las concentraciones de interés.
- 4.9. Los procedimientos concretos de preparación de muestras que se empleen para los productos estudiados deben seguir directrices aceptadas internacionalmente.

## 5. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

- 5.1. De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) n° 882/2004, los laboratorios deberán estar acreditados por un organismo reconocido que opere de conformidad con la Guía ISO 58, para garantizar que llevan a cabo el aseguramiento de la calidad analítica. Dicha acreditación deberá efectuarse conforme a la norma EN ISO/IEC 17025.
- 5.2. 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.
- 5.3. 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.

## 6. Requisitos básicos que deben cumplir los procedimientos analíticos para dioxinas (PCDD o PCDF) y PCB similares a las dioxinas

### 6.1. Intervalo de trabajo y límites de cuantificación bajos

En el caso de las PCDD o los PCDF, las cantidades detectables deben 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 de los PCB, es suficiente una sensibilidad en el intervalo de los nanogramos ( $10^{-9}$  g). Para medir los congéneres más tóxicos de los PCB similares a las dioxinas (en particular, los congéneres no ortosustituidos), 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).

### 6.2. Selectividad elevada (especificidad)

- 6.2.1. Es necesario distinguir las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas de una multitud de otros compuestos extraídos simultáneamente de la muestra, que posiblemente interfieran y que están presentes en concentraciones de hasta varios órdenes de magnitud superiores a las de los analitos 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 17 PCDD y PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y los doce PCB similares a las dioxinas) y otros.
- 6.2.2. Los métodos bioanalíticos deben permitir detectar los compuestos objeto de estudio como suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas. Con la limpieza de la muestra se aspira a suprimir compuestos que producen resultados falsos positivos, o aquellos que pueden disminuir la respuesta, generando falsos negativos.

### 6.3. Exactitud elevada (veracidad y precisión, recuperación aparente del bioensayo)

- 6.3.1. Con los métodos de CG/EM, la determinación debe 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 analito 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).

- 6.3.2. Con los métodos bioanalíticos, debe determinarse la recuperación aparente del bioensayo. Se entiende por recuperación aparente del bioensayo el EQB calculado a partir de la TCDD o de la curva de calibración del PCB 126, corregido en función del blanco y dividido por el EQT determinado por CGAR o EMAR. 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 factor de equivalencia tóxica (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.
- 6.4. *Validación en el intervalo de nivel considerado y medidas generales de control de calidad*
- 6.4.1. Los laboratorios deberán demostrar el funcionamiento de un método en el intervalo del nivel considerado, por ejemplo 0,5, 1 y 2 veces el nivel considerado, con un coeficiente de variación aceptable para análisis repetidos durante el procedimiento de validación y durante análisis sistemáticos.
- 6.4.2. Como medidas internas de garantía de 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.
- 6.5. *Límite de cuantificación*
- 6.5.1. 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. Ha de demostrarse que el nivel de referencia difiere de las muestras en blanco del procedimiento al menos en un factor de 3, y que la respuesta es 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.
- 6.5.2. En un método de confirmación, el límite de cuantificación debe ser aproximadamente de un quinto del nivel considerado.
- 6.6. *Criterios analíticos*
- Para obtener resultados fiables con los métodos de confirmación o de cribado, deberán cumplirse los siguientes criterios para el valor EQT o EQB, respectivamente, ya se determinen como EQT 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		De - 20 % a + 20 %
Repetibilidad (RSD <sub>i</sub> )	< 20 %	
Reproducibilidad intralaboratorio (RSD <sub>R</sub> )	< 25 %	< 15 %

(\*) con respecto a los contenidos máximos.

- 6.7. *Requisitos específicos aplicables a los métodos de cribado*
- 6.7.1. Para el cribado pueden emplearse tanto CG o EM como métodos bioanalíticos. En el caso de los métodos con CG o EM deben cumplirse los requisitos establecidos en el punto 7. Para los análisis en células se establecen requisitos específicos en el punto 8.
- 6.7.2. Los laboratorios que aplican métodos de cribado para los controles sistemáticos de muestras cooperarán estrechamente con los que aplican el método de confirmación.
- 6.7.3. Durante los análisis sistemáticos se verificará el funcionamiento del método de cribado mediante el control de la calidad de los análisis y la validación permanente del método. Existirá un programa continuo para controlar la conformidad de los resultados.

6.7.4. Comprobación de la posible supresión de la respuesta celular y la citotoxicidad:

El 20 % de los extractos de la muestra se medirá por cribado sistemático, sin añadir y añadiendo TCDD 2, 3, 7 y 8 correspondiente al nivel considerado, para comprobar si en la muestra hay sustancias que interfieren y pueden provocar la supresión de la respuesta celular. 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 confirmatorios por CGAR o EMAR. Los resultados serán objeto de seguimiento mediante fichas de control de calidad.

6.7.5. Control de calidad de las muestras conformes:

Entre un 2 % y un 10 % de las muestras conformes, en función de la matriz de la muestra y de la experiencia del laboratorio, se confirmará mediante CGAR o EMAR.

6.7.6. 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. El porcentaje real de falsos negativos deberá ser inferior al 5 %. Cuando se disponga de un mínimo de 20 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 20 resultados para la evaluación del porcentaje de falsos negativos. Las muestras deberán abarcar las pautas de congéneres más frecuentes y representar 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 de medida del método de confirmación.

6.7.7. Las muestras presuntamente no conformes tras el cribado se verificarán siempre mediante un método de confirmación (CGAR o EMAR). Estas muestras pueden también utilizarse para evaluar el cociente de resultados falsos positivos. Para los métodos de cribado, el porcentaje de resultados falsos positivos será la fracción de resultados confirmados negativos por CGAR o EMAR, que en el cribado previo habían dado positivo o presunto positivo. Para evaluar las ventajas del método de cribado se compara el número de muestras falsas positivas con el número total de muestras estudiadas. Este cociente tiene que ser lo suficientemente bajo para que se considere ventajoso el cribado.

6.7.8. Los métodos bioanalíticos, al menos en condiciones de validación, darán una indicación válida del nivel de EQT, calculado y expresado como EQB.

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

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

7.1. *Requisitos generales*

La diferencia entre el límite superior y el límite inferior no debe exceder del 20 % en los piensos con una contaminación en torno a 1 ng EQT-OMS/kg de producto (suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas) con un 12 % de humedad. Para niveles de contaminación inferiores, por ejemplo 0,5 ng EQT-OMS/kg de producto, la diferencia entre el límite superior y el límite inferior podrá situarse en un intervalo del 25 % al 40 %.

7.2. *Control de la recuperación*

7.2.1. 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  $^{13}\text{C}$  clorosustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con  $^{13}\text{C}$ . Debe añadirse 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 EM y utilizada para el control de PCDD/PCDF y PCB similares a las dioxinas). En los métodos de confirmación, se utilizarán los 17 patrones internos de PCDD/PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y marcados con  $^{13}\text{C}$ , así como los doce patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con  $^{13}\text{C}$ .



- 7.2.2. Deberán determinarse asimismo factores de respuesta relativos en el caso de los congéneres para los que no se añade ningún análogo marcado con  $^{13}\text{C}$ , empleando las soluciones de calibración apropiadas.
- 7.2.3. Para los piensos de origen vegetal y de origen animal con un contenido de grasa inferior al 10 %, es 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 y de si los resultados notificados se refieren al producto o a las grasas.
- 7.2.4. Con anterioridad al análisis mediante CG/EM, deben añadirse uno o dos patrones de recuperación (sustitutos).
- 7.2.5. 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 dibenzodioxinas 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 mediante CG/EM, la recuperación deberá situarse en un intervalo del 30 % al 140 %.
- 7.3. *Eliminación de sustancias interferentes*
- Las PCDD y los PCDF se separarán de los compuestos clorados interferentes, 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.
- 7.4. *Calibración con curva estándar*
- El intervalo de la curva de calibración abarcará el intervalo pertinente de los niveles de interés.

## 8. Requisitos específicos aplicables a los métodos bioanalíticos

Los métodos bioanalíticos son métodos que recurren a principios biológicos, como los análisis en células, los de receptores o los inmunoanálisis. El presente punto 8 establece los requisitos que deben cumplir los métodos bioanalíticos en general.

Un método de cribado, en principio, clasifica una muestra como conforme o como presuntamente no conforme. Para ello, el nivel EQB calculado se compara con el valor de corte (véase el punto 8.3). 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 2/3 del contenido máximo puede ser el valor de corte más adecuado para garantizar un porcentaje de falsos negativos inferior a 5 % y un nivel aceptable de resultados falsos positivos. Como los contenidos máximos son distintos para PCDD/PCDF y para la suma de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas, comprobar la conformidad de las muestras sin fraccionamiento requiere valores de corte apropiados para los métodos bioanalíticos de PCDD/PCDF. Para el control de muestras que superan los umbrales de intervención, podría usarse como valor de corte un porcentaje adecuado de los respectivos niveles considerados.

Además, en el caso de algunos métodos bioanalíticos puede darse un nivel indicativo expresado en EQB para muestras en el intervalo de trabajo que superen el límite de comunicación (véanse los puntos 8.1.1 y 8.1.6).

### 8.1. Evaluación de la respuesta al ensayo

#### 8.1.1. Requisitos generales

- Al calcular las concentraciones a partir de una curva de calibración de TCDD, los valores de los extremos inferior y superior de la curva presentarán una gran variación (elevado coeficiente de variación, CV). El intervalo de trabajo es el área en que este CV es inferior a 15 %. El extremo inferior del intervalo de trabajo (límite de comunicación) debe establecerse, como mínimo, en el triple del de los análisis en blanco. El extremo superior del intervalo de trabajo lo constituye normalmente el valor  $\text{EC}_{70}$  (70 % de la concentración efectiva máxima), pero es inferior si el CV es superior al 15 % en ese intervalo. El intervalo de trabajo se establecerá durante la validación. Los valores de corte (véase el punto 8.3) estarán plenamente dentro del intervalo de trabajo.
- Las soluciones patrón y los extractos de la muestra se analizarán, al menos, por duplicado. Al recurrir a duplicados, las soluciones patrón y los extractos de la muestra analizados en cuatro a seis pocillos repartidos por la placa deberán presentar una respuesta o concentración (solo posible en el intervalo de trabajo) sobre la base de un  $\text{CV} < 15\%$ .

#### 8.1.2. Calibración

##### 8.1.2.1. 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 deberán contener de 8 a 12 concentraciones (al menos en los duplicados), con las suficientes concentraciones en la parte inferior de la curva (intervalo de trabajo). Deberá prestarse especial atención a la calidad del ajuste de la curva en el intervalo de trabajo. El valor  $R^2$ , por sí mismo, es de poca ayuda o ninguna para estimar la calidad 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 pertinentes muestras de referencia con pautas representativas de congéneres en torno al nivel considerado). Para corregir la recuperación, la recuperación aparente habrá de encontrarse en el intervalo requerido (véase el punto 8.1.4). Las muestras de referencia utilizadas para la corrección de la recuperación deberán cumplir los requisitos establecidos en el punto 8.2.

#### 8.1.2.2. Calibración con muestras de referencia

Como alternativa puede utilizarse una curva de calibración preparada, como mínimo, a partir de cuatro muestras de referencia (véase el punto 8.2.4: una matriz en blanco y tres muestras de referencia de 0,5, 1 y 2 veces el nivel considerado) en torno al nivel considerado, lo que evita tener que corregir en función del blanco y de la recuperación. En este caso, la respuesta correspondiente a 2/3 del contenido máximo (véase el punto 8.3) puede calcularse directamente de estas muestras y utilizarse como valor de corte. Para el control de las muestras que superan los umbrales de intervención, podría tomarse como valor de corte un porcentaje adecuado de los mismos.

#### 8.1.3. Determinación separada de las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas

Los extractos pueden dividirse en fracciones que contienen PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas, con lo que pueden expresarse por separado los EQT de cada uno (en EQB). Se utilizará preferentemente una curva de calibración PCB 126 estándar para evaluar los resultados correspondientes a la fracción que contiene PCB similares a las dioxinas.

#### 8.1.4. Recuperaciones aparentes de bioensayos

La "recuperación aparente de bioensayo" se calculará a partir de adecuadas muestras de referencia con pautas de congéneres representativas en torno al nivel considerado, y se expresará como porcentaje del EQB en comparación con el EQT. Según el tipo de ensayo y el esquema de FET (\*\*\*\*\*) utilizados, 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 25 % 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 el sumatorio 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.

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

#### 8.1.5. Control de la recuperación para la limpieza

Durante la validación se comprobará la pérdida de compuestos durante la limpieza. Una muestra en blanco, enriquecida con una mezcla de los diferentes congéneres, se someterá al procedimiento de limpieza (al menos,  $n = 3$ ) y se comprobarán la recuperación y la variabilidad mediante CGAR o EMAR. 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.

#### 8.1.6. Límite de comunicación

Al notificar los EQB, se determinará un límite de comunicación a partir de muestras matriz relevantes que presenten pautas típicas de congéneres, pero no a partir de la curva estándar de calibración, por su imprecisión en el intervalo inferior. 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.

#### 8.2. Utilización de muestras de referencia

##### 8.2.1. Las muestras de referencia deberán representar la matriz de la muestra, las pautas de congéneres y los intervalos de concentración de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas en torno al nivel considerado.

##### 8.2.2. 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 nivel considerado. 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. Estas muestras podrán ser utilizadas para las correcciones en función del blanco y de la recuperación.

- 8.2.3. Las muestras de referencia elegidas para corregir la recuperación serán representativas de las muestras de ensayo, lo que significa que las pautas de congéneres no pueden dar lugar a una subestimación de los contenidos.
- 8.2.4. Deberán incluirse otras muestras de referencia de, por ejemplo, 0,5 y dos veces el nivel considerado, a fin de demostrar el correcto funcionamiento del ensayo en el intervalo pertinente para el control del nivel considerado. Combinadas, estas muestras pueden utilizarse para calcular los EQB en las muestras de ensayo (véase el punto 8.1.2.2).

8.3. *Determinación de los valores de corte*

Deberá establecerse la relación entre los resultados bioanalíticos en EQB y los resultados de CGAR o EMAR en EQT, por ejemplo mediante experimentos de calibración ajustados por matrices, con muestras de referencia enriquecidas a 0, 0,5, 1 y 2 veces del 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 8.2.2.

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 niveles considerados 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 CGAR/EMAR 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 CGAR/EMAR es el nivel máximo, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida.

El valor de corte (en EQB) puede calcularse con arreglo a uno de los métodos establecidos en los puntos 8.3.1, 8.3.2 y 8.3.3 (véase la figura 1).

- 8.3.1. Utilización de la banda *inferior* del intervalo de predicción del 95 % en el límite de decisión CG/EMAR:

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

donde:

$\text{EQB}_{\text{DL}}$  EQB correspondiente al límite de decisión CG/EMAR, nivel máximo que tiene en cuenta la incertidumbre de medida

$s_{y,x}$  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, determinada por CGAR/EMAR (en EQT), del punto de calibración  $i$

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

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

- 8.3.2. 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 CG/EMAR, como el criterio de valoración más bajo de la distribución de los datos en la correspondiente media de EQB:

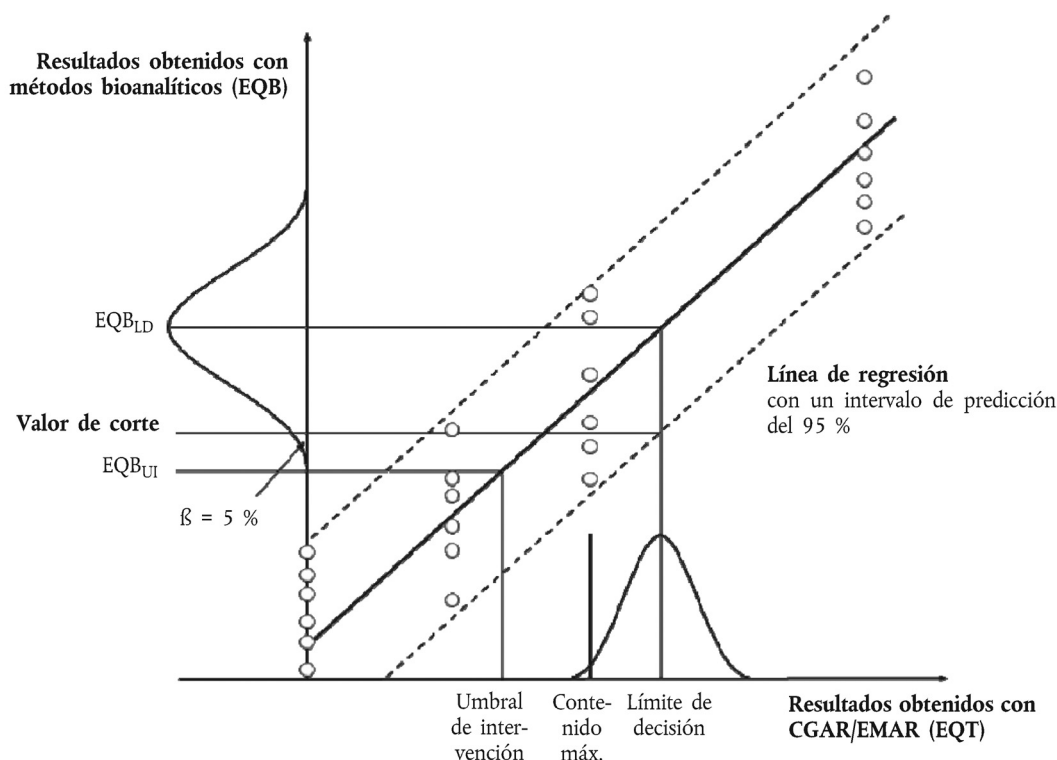
$$\text{Valor de corte} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 * \text{SD}_R$$

donde:

$\text{SD}_R$  desviación estándar de los resultados del bioensayo en  $\text{EQB}_{\text{LD}}$ , medidos en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio.

- 8.3.3. 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 2/3 del nivel considerado, pues se observa que este nivel se halla en torno al valor de corte determinado con arreglo al punto 8.3.1 o al punto 8.3.2:

Figura 1



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  $RSD_R < 25\%$ . 1. De la banda inferior del intervalo de predicción del 95 % en el límite de decisión CGAR/EMAR. 2. De múltiples análisis de muestras ( $n \geq 6$ ) contaminadas en el límite de decisión CGAR/EMAR 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.

#### 8.3.4. 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 niveles considerados 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  $2/3$  del nivel considerado.

#### 8.4. Características de funcionamiento

- 8.4.1. Se efectuarán ensayos de repetibilidad de los métodos bioanalíticos para obtener información sobre la desviación estándar en cada serie de ensayos y entre las series. La repetibilidad será  $< 20\%$ , y la reproducibilidad intralaboratorio  $< 25\%$ , sobre la base de los niveles calculados en EQB tras la corrección en función del blanco y de la recuperación.
- 8.4.2. 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 8.1.2).
- 8.4.3. Se definirán los compuestos objeto de estudio, las posibles interferencias y los valores máximos tolerables del blanco.
- 8.4.4. 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  $15\%$ .
- 8.4.5. Los resultados no corregidos de la muestra o las muestras de referencia expresados en EQB (blanco y nivel considerado) se utilizarán para evaluar el funcionamiento del método bioanalítico durante un período de tiempo constante.
- 8.4.6. 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.

- 8.4.7. Los resultados de los análisis por CGAR/EMAR de muestras sospechosas y entre el 2 % y el 10 % de las muestras conformes (mínimo de 20 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 reevaluar los valores de corte aplicables a las muestras sistemáticas de las matrices validadas.
- 8.4.8. El buen funcionamiento del método también puede demostrarse mediante la participación 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 deberán abarcar las pautas de congéneres más frecuentes y representar diversas fuentes.
- 8.4.9. En caso de incidente podrán reevaluarse los valores de corte, a fin de reflejar las pautas específicas de matriz y congéneres del incidente concreto.

## 9. Comunicación de los resultados

### 9.1. Métodos de confirmación

- 9.1.1. En la medida en que el procedimiento analítico seguido lo permita, los resultados del análisis deberán incluir los niveles de cada congénere de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas e indicarse como límite inferior, límite superior y límite intermedio, a fin de incluir el máximo de información posible en la comunicación de los resultados, para que sea posible interpretarlos en función de los requisitos específicos.
- 9.1.2. El informe indicará el método utilizado para la extracción de PCDD, PCDF, PCB similares a las dioxinas y lípidos.
- 9.1.3. Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno en caso de que estén fuera del intervalo mencionado en el punto 7.2.5 o de que se supere el nivel máximo, así como en otros casos cuando se solicite.
- 9.1.4. Puesto que, al decidir sobre la conformidad de una muestra, se ha de tener en cuenta la incertidumbre de medida, también se indicará este parámetro. Así pues, los resultados analíticos deberán expresarse como  $x \pm U$ , donde  $x$  es el resultado analítico y  $U$  la incertidumbre de medida expandida, 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 expandida estimada de los resultados analíticos obtenidos por separado de cada uno de ellos.
- 9.1.5. Si la incertidumbre de medida se tiene en cuenta aplicando el CCa (según se describe en el punto 2.2), deberá indicarse este parámetro.
- 9.1.6. 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.

### 9.2. Métodos bioanalíticos de cribado

- 9.2.1. El resultado del cribado se expresará como "conforme" o "presuntamente no conforme" ("sospechoso").
- 9.2.2. Además, podrán indicarse resultados de PCDD/PCDF y/o PCB similares a las dioxinas expresados en EQB, y no en EQT.
- 9.2.3. Si se indica la incertidumbre de medida del EQB calculado, por ejemplo como desviación estándar, deberá basarse al menos en un análisis por triplicado de la muestra, incluidas la extracción, limpieza y determinación de la respuesta del ensayo.
- 9.2.4. Las muestras con contenido inferior al límite de comunicación se indicarán como tales.
- 9.2.5. Para cada tipo de muestra matriz, el informe mencionará el nivel considerado en el que se basa la evaluación.
- 9.2.6. El informe mencionará el tipo de ensayo realizado, sus principios básicos y el tipo de calibración.
- 9.2.7. El informe indicará el método utilizado para la extracción de PCDD, PCDF, PCB similares a las dioxinas y lípidos.

## CAPÍTULO III

### Preparación de las muestras y requisitos aplicables a los métodos de análisis utilizados en el control oficial de los niveles de PCB no similares a las dioxinas (PCB n<sup>os</sup> 28, 52, 101, 138, 153 y 180)

#### 1. Métodos de detección aplicables

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

## 2. Identificación y confirmación de los analitos considerados

- 2.1. Tiempo relativo de retención en relación con los patrones internos o los de referencia (desviación aceptada +/- 0,25 %).
- 2.2. Deberá confirmarse la separación por CG de los seis PCB indicadores (28, 52, 101, 138, 153 y 180) de las sustancias interferentes, especialmente de los PCB que eluyen conjuntamente, sobre todo si los contenidos de las muestras se encuentran en el límite entre conformidad y no conformidad.

*Nota:* 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.]

## 2.3. Requisitos para las técnicas de CG/EM

Control de, al menos:

- a) dos iones específicos en el caso de la EMAR;
- b) dos iones específicos de  $m/z > 200$  o tres de  $m/z > 100$  en el caso de la EMBR;
- c) un precursor y dos iones producto en el caso de EM-EM.

Tolerancias máximas permitidas para la razón de abundancia de isótopos de determinados fragmentos de masa.

Desviación relativa de la razón de abundancia de isótopos de determinados fragmentos de masa con respecto a la abundancia teórica o al patrón de calibración del ion considerado (el ion más abundante de los controlados), y el ion o los iones calificadores.

Intensidad relativa de los iones calificadores frente al ion considerado	CG-EI-EM (desviación relativa)	CG-CI-EM, CG-EM <sup>a</sup> (desviación relativa)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % a 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % a 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % (*)	± 50 % (*)

(\*) Número suficiente de fragmentos de masa con intensidad relativa > 10 % disponibles, por lo que no es recomendable usar iones calificadores con una intensidad relativa inferior al 10 % de la del ion considerado.

## 2.4. Requisitos para las técnicas de CG/ECD

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

## 3. Demostración del funcionamiento del método

El funcionamiento del método deberá validarse en el intervalo considerado (de 0,5 a 2 veces el contenido considerado), con un coeficiente de variación aceptable para análisis repetidos (véanse los requisitos de precisión intermedia en el punto 8).

## 4. Límite de cuantificación

Los valores en blanco no excederán del 30 % del nivel de contaminación correspondiente al contenido máximo (\*\*\*\*\*).

(\*\*\*\*\*). Es altamente recomendable una contribución más baja del blanco de reactivo que del contenido de contaminante de una muestra. Recae en el laboratorio la responsabilidad de controlar la variación de los niveles del blanco, especialmente cuando se sustraen sus valores.

## 5. 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.

## 6. Control de la recuperación

- 6.1. Se utilizarán patrones internos adecuados con propiedades fisicoquímicas comparables a los analitos considerados.
- 6.2. Para añadir patrones internos:  
Se añaden a los productos (antes del proceso de extracción y limpieza).
- 6.3. Requisitos para los métodos que utilizan los seis congéneres de los PCB indicadores 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 deberán situarse entre el 50 % y el 120 %;
  - son aceptables recuperaciones superiores o inferiores de congéneres cuya contribución a la suma de los seis PCB indicadores sea inferior al 10 %.
- 6.4. Requisitos para los métodos que no utilizan los seis patrones internos marcados con isótopos u otros patrones internos:
- control de 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.
- 6.5. La recuperación de congéneres no marcados se comprobará mediante muestras enriquecidas o muestras de control de calidad con concentraciones en el intervalo del nivel considerado. Son aceptables para estos congéneres recuperaciones situadas entre el 70 % y el 120 %.

## 7. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) n° 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 de los análisis. Dicha acreditación deberá efectuarse conforme a la norma EN ISO/IEC 17025.

## 8. Características de funcionamiento: Criterios para la suma de los seis PCB indicadores al nivel considerado

Veracidad	- 30 a + 30 %
Precisión intermedia (RSD)	≤ 20 %
Diferencia entre el cálculo del límite superior y del límite inferior	≤ 20 %

## 9. Comunicación de los resultados

- 9.1. En la medida en que el procedimiento analítico seguido lo permita, los resultados del análisis deberán incluir los niveles de cada congener de PCB e indicarse como límite inferior, límite superior y límite intermedio, a fin de incluir el máximo de información posible en la comunicación de los resultados, para que sea posible interpretarlos en función de los requisitos específicos.
- 9.2. El informe indicará el método utilizado para la extracción de PCB y de lípidos.
- 9.3. Deberán indicarse los porcentajes de recuperación de cada patrón interno en caso de que estén fuera del intervalo mencionado en el punto 6 o de que se supere el nivel máximo, así como en otros casos cuando se solicite.
- 9.4. Puesto que, al decidir sobre la conformidad de una muestra, se ha de tener en cuenta la incertidumbre de medida, también se indicará este parámetro. Así pues, los resultados analíticos deberán expresarse como  $x \pm U$ , donde  $x$  es el resultado analítico y  $U$  la incertidumbre de medida expandida, aplicando un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza aproximado del 95 %.
- 9.5. Si la incertidumbre de medida se tiene en cuenta aplicando el CCa (según se describe en el punto 2.1 del capítulo I), deberá indicarse este parámetro.
- 9.6. 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.»