

II

(Actos no legislativos)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (UE) Nº 709/2014 DE LA COMISIÓN

de 20 de junio de 2014

por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 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) nº 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) nº 152/2009 de la Comisión ⁽²⁾ incluye los métodos de determinación de los contenidos de policlorodibenzodioxinas (PCDD), policlorodibenzofuranos (PCDF) y policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas en los piensos.
- (2) Deben establecerse requisitos sobre métodos de cribado de alto rendimiento para detectar muestras con niveles significativos de PCDD, PCDF y PCB similares a las dioxinas (es preferible que detecten las muestras que sobrepasen los umbrales de intervención y obligatorio que detecten aquellas que sobrepasen los contenidos máximos). Por lo que respecta a los contenidos máximos, el porcentaje de falsos negativos de los métodos de cribado debe ser inferior al 5 %.
- (3) Si los resultados obtenidos con el método de cribado superan el valor de corte, la muestra original debe analizarse mediante un método que permita determinar y cuantificar las PCDD, los PCDF y los PCB similares a las dioxinas que contiene la muestra. Estos son los denominados «métodos de confirmación». La evolución y el progreso de la técnica han mostrado que, además de la cromatografía de gases/espectrometría de masas de alta resolución (CG-EMAR), también la cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (CG-EM/EM) debe autorizarse como método de confirmación para comprobar el contenido máximo.
- (4) Tras la experiencia adquirida con la aplicación de las normas actualmente en vigor, procede modificar las disposiciones vigentes por lo que respecta a la necesidad de un análisis por duplicado, el establecimiento de la conformidad en caso de análisis por duplicado y el requisito relativo a la diferencia aceptable entre el límite superior y el límite inferior de los resultados.
- (5) Procede, por tanto, modificar el Reglamento (CE) nº 152/2009 en consecuencia.
- (6) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal.

⁽¹⁾ DO L 165 de 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ Reglamento (CE) nº 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).

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*.

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

Hecho en Bruselas, el 20 de junio de 2014.

Por la Comisión
El Presidente
José Manuel BARROSO

ANEXO

En el anexo V del Reglamento (CE) n° 152/2009, la parte B, «DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES 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. 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 ⁽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 sublotes 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 ⁽²⁾*.

Además, 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. Deben 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 para comprobar el cumplimiento del contenido máximo serán verificados por un nuevo análisis completo de la muestra original mediante 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. Respeto de los PCB no similares a las dioxinas**

El lote respeta el contenido máximo si el resultado del análisis no supera el contenido 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 respeta el contenido máximo si el resultado analítico del límite superior ⁽³⁾*, confirmado mediante un análisis por duplicado ⁽⁴⁾*, supera el contenido máximo fijado en la Directiva 2002/32/CE, teniendo en cuenta la incertidumbre de medida. Para verificar la conformidad se usa la media de ambas determinaciones, 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 contenido máximo,
- estableciendo el límite de decisión (CC_α) 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_α.

Los apartados 1, 2 y 3 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 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 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,
- 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 de medida.

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 no respeta el contenido máximo si el resultado analítico del límite superior ⁽⁵⁾* 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 ⁽⁶⁾*. Para verificar la conformidad se usa la media de ambas determinaciones, 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 contenido 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 (CCa) 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 CCa.

Los apartados 1 a 4 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 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. Cuando sean necesarios esfuerzos significativos para identificar la fuente y reducir o eliminar la contaminación, puede ser 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 de medida ⁽⁷⁾*.

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 policlorodibenzo-p-dioxinas (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 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. Deben 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. Su aplicación debe perseguir que no se produzcan falsos negativos. Los métodos de cribado serán bioanalíticos o por 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 debe determinarse o confirmarse 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 fisicoquímicos 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, estos 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 equivalente tóxico (EQT) se multiplica 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 analito 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 analito en el extracto de una muestra que produzca una respuesta instrumental a dos iones diferentes, que se controlarán con una relación señal/ruido (S/R) de 3:1 para la señal menos sensible, 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 congéner, sino una simple indicación ^{(8)*} del nivel de EQT, expresado 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 de umbral de intervención o de contenido máximo.

3. Requisitos de aseguramiento de la calidad

- 3.1. Deben 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 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 los restos de polvo de papel del recipiente que contiene la muestra.

- 3.3. El almacenamiento y el transporte de las muestras de piensos deben realizarse de modo que se preserve la integridad de las mismas.
- 3.4. 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.
- 3.5. 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.
- 3.6. Debe efectuarse un análisis en blanco realizando todo el procedimiento analítico, únicamente sin la muestra.
- 3.7. 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.
- 3.8. 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 máximas o los umbrales de intervención.
- 3.9. Los procedimientos concretos de preparación de muestras que se empleen para los productos en cuestión deben cumplir directrices aceptadas a nivel internacional.

4. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

- 4.1. De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 882/2004, los laboratorios deben 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 debe efectuarse conforme a la norma EN ISO/IEC 17025.
- 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 para dioxinas (PCDD o PCDF) y 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 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 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 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).

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 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 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 deben permitir detectar los compuestos objeto de estudio como suma de PCDD, PCDF y 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 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).

5.3.2. Para los métodos bioanalíticos, debe 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 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.

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, deben 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 o del umbral de intervención 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 ⁽¹⁾	< 5 %	
Veracidad		- 20 % a + 20 %
Repetibilidad (RSD _r)	< 20 %	
Reproducibilidad intralaboratorio (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

⁽¹⁾ 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 interferentes 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 por CGAR o EMAR. 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, deben 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 deben 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 de medida del método de confirmación.

- 5.7.7. Tras un cribado, las muestras posiblemente 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 del carácter ventajoso del método de cribado se basará en la comparación de las muestras falsas positivas con el número total de muestras comprobadas. Ese índice debe ser lo suficientemente bajo para que la herramienta de cribado resulte ventajosa.
- 5.7.8. Al menos en condiciones de validación, los métodos bioanalíticos deben proporcionar 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_r intralaboratorio suele ser inferior a la 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 ^{13}C clorosustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con ^{13}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 diecisiete patrones internos de PCDD/PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y marcados con ^{13}C , así como los doce patrones internos de PCB similares a las dioxinas marcados con ^{13}C .
- 6.2.2. Deberán determinarse asimismo factores de respuesta relativos en el caso de los congéneres para los que no se añade ningún análogo marcado con ^{13}C , empleando las 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 %, 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. Debe 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.
- 6.2.4. Con anterioridad al análisis mediante CG/EM, deben 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 deben 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 deben situarse en un intervalo del 30 % al 140 %.

6.3. 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 difenlicos 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 analitos marcados y no marcados en el ámbito de aplicación de los análisis.

Tolerancia máxima permitida de las intensidades relativas del ion de ± 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 analito.

La resolución de cada cuádrupolo 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 analitos 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 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 2/3 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, podría tomarse como valor de corte un porcentaje adecuado de los mismos.

Por otro lado, en el caso de determinados métodos bioanalíticos, se puede dar un valor indicativo expresado en EQB para las muestras en el intervalo de trabajo que superen el límite de notificación (véanse 7.1.1 y 7.1.6).

7.1. Evaluación de la respuesta al ensayo

7.1.1. Requisitos generales

- Cuando se calculan las concentraciones a partir de una curva de calibración de TCDD, los valores del límite inferior y 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) debe 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 deben someterse a ensayo, 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 contienen 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. 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 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 puede 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. En este caso, la respuesta correspondiente a 2/3 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, podría tomarse como valor de corte un porcentaje adecuado de los mismos.

7.1.3. 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 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, 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 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.

7.1.5. Control de la recuperación para la limpieza

La pérdida de compuestos durante la fase de limpieza debe 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 notificación

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

Debe 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 de medida.

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:

$$\text{Valordecorte} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - S_{y,x} * t_{\alpha, f = m - 2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

Donde:

EQB_{LD} EQB correspondiente al límite de decisión del método de confirmación, contenido máximo que tiene en cuenta la incertidumbre de medida

$S_{y,x}$ desviación estándar residual

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

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

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

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

Con:

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 $2/3$ 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:

Figura 1

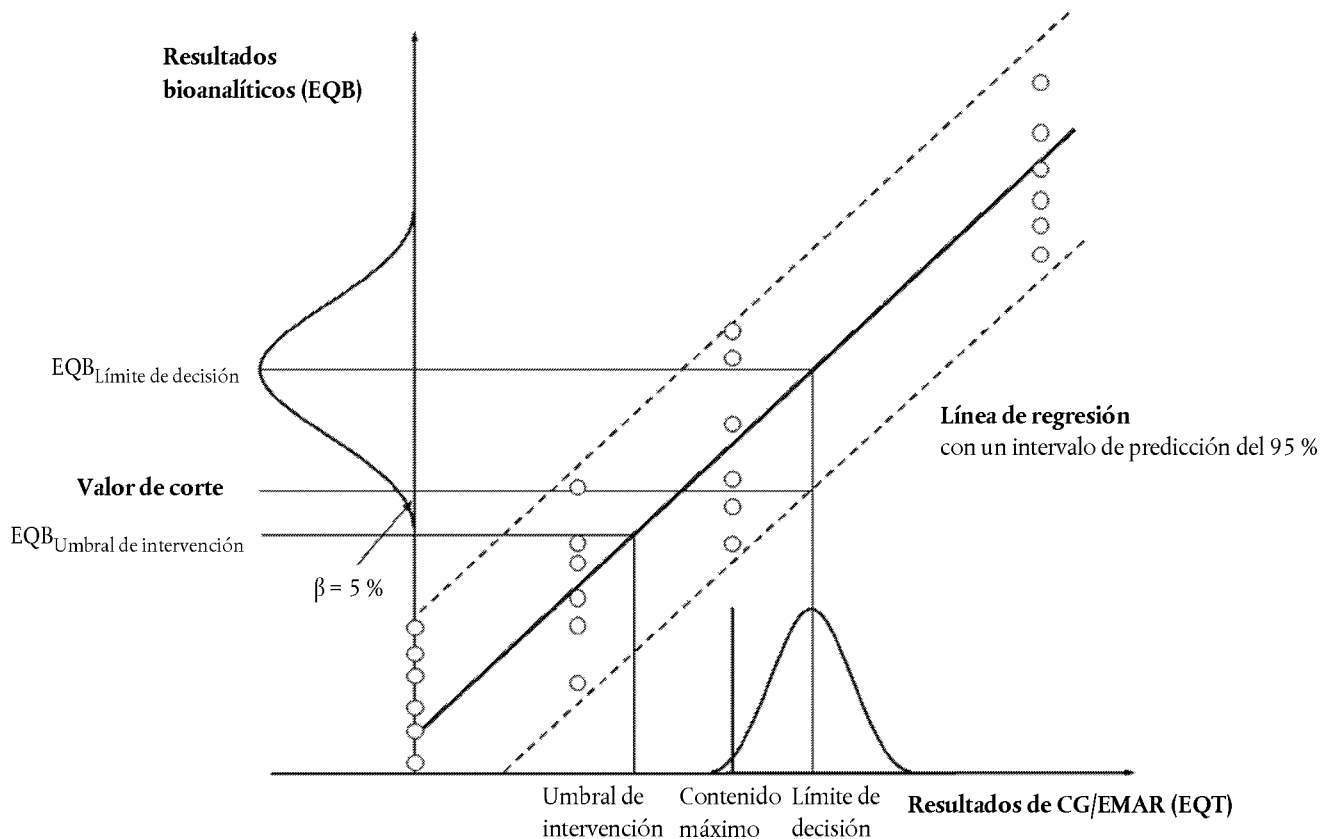


Figura 1. Cálculo de los valores de corte con un nivel de confianza del 95 %, lo que implica un porcentaje de falsos negativos < 5 %, y con una $RSD_R < 25\%$:

1. 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.

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 $2/3$ 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, deben 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 debe ser 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. Deben identificarse claramente los compuestos diana, 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. En la medida en que el procedimiento analítico seguido lo permita, los resultados del análisis deberán incluir los niveles de cada congéneres 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.
- 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 de medida, también se indicará este parámetro. Así pues, los resultados analíticos deben expresarse como $x \pm U$, donde x es el resultado analítico y U es 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.
- 8.1.5. Si la incertidumbre de medida se tiene en cuenta aplicando el CC α (según se describe en el punto 2.2 del capítulo I de la presente parte B), deberá indicarse este parámetro.
- 8.1.6. 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.

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, podrán indicarse resultados 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.

- 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.

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^{os} 28, 52, 101, 138, 153 y 180)**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 policlorobifenilos (PCB) no similares a las dioxinas y con otros fines reglamentarios.

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 analitos considerados

- 3.1. Tiempo relativo de retención en relación con patrones internos o patrones de referencia (desviación tolerable de $\pm 0,25$ %).
- 3.2. Separación por cromatografía de gases de los seis PCB indicadores (28, 52, 101, 138, 153 y 180) de sustancias interferentes, 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.

[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.]

3.3. 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 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:

Intensidad relativa del ion o los iones calificadores comparados con el ion objetivo	CG-EI-EM (desviación relativa)	CG-CI-EM, CG-EM ^a (desviación relativa)
< 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % a 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % a 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % ⁽¹⁾	± 50 % ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Número suficiente de fragmentos de masa con intensidad relativa > 10 % disponibles, por lo que no es recomendable utilizar iones calificadores con una intensidad relativa inferior al 10 % de la del ion considerado.

3.4. 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.

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

Los valores en blanco no deben superar el 30 % del nivel de contaminación correspondiente al contenido máximo ⁽¹⁰⁾*.

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 analitos considerados.

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 indicadores de PCB 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 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 %.

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 deben comprobarse por medio de muestras enriquecidas o de muestras de control de calidad con concentraciones en el intervalo del contenido máximo. Son aceptables para estos congéneres recuperaciones situadas entre el 70 % y el 120 %.

8. Requisitos que deben cumplir los laboratorios

De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) n° 882/2004, los laboratorios deben 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 debe efectuarse conforme a la norma EN ISO/IEC 17025.

9. 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 %

10. Comunicación de los resultados

- 10.1. En la medida en que el procedimiento analítico seguido lo permita, los resultados del análisis deberán incluir los niveles de cada congénere 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.
- 10.2. El informe indicará el método utilizado para la extracción de PCB y de lípidos.
- 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 de medida, también se indicará este parámetro. Así pues, los resultados analíticos deben expresarse como $x \pm U$, donde x es el resultado analítico y U es la incertidumbre de medida expandida, aplicando un factor de cobertura de 2, que ofrece un nivel de confianza aproximado del 95 %.
- 10.5. 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.
- 10.6. 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.

(¹)* Tabla de FET (= factores de equivalencia tóxica) correspondientes a dioxinas, furanos 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 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).
- (³)* 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.
- (⁴)* 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, el análisis por duplicado solo es necesario si el resultado de la primera determinación mediante la aplicación de métodos de confirmación con la utilización del patrón interno marcado con ¹³C para los analitos pertinentes 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 marco 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.
- (⁵)* 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.
- (⁶)* 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, el análisis por duplicado solo es necesario si el resultado de la primera determinación mediante la aplicación de métodos de confirmación con la utilización del patrón interno marcado con ¹³C para los analitos pertinentes 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 marco 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.
- (⁷)* 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 (5)* para los contenidos máximos.
- (⁸)* 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.
- (⁹)* Los requisitos actuales se basan en los FET publicados en: M. Van den Berg *et al.*, *Toxicol Sci* 93 (2), 223–241 (2006).
- (¹⁰)* 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.»
-