

ALLEGATO II
(previsto dall'art. 2, comma 1)

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E SPECIFICHE PER I METODI D'ANALISI IMPIEGATI NEL CONTROLLO UFFICIALE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E NELLA DETERMINAZIONE DI PCB DIOSSINA-SIMILI IN TALUNI MANGIMI

1. Finalità e campo d'applicazione

Queste specifiche si applicano all'analisi di materie prime e mangimi volta a determinare la presenza di diossine [policlorodibenzodiossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF)] e difenili policlorurati diossina-simili (PCB).

Il controllo della presenza di diossine nei mangimi può essere effettuato mediante una strategia che preveda un metodo di screening per selezionare i campioni con livelli di diossine e di PCB diossina-simili superiori al livello massimo consentito o inferiori di un valore al di sotto del 30-40 %. Occorre poi determinare/confermare la concentrazione di diossine nei campioni con livelli significativi tramite un metodo di conferma.

I metodi di screening sono impiegati per rilevare la presenza di diossine e PCB diossina-simili ai livelli massimi consentiti. Essi sono dotati di una grande capacità di trattamento di campioni, il che consente di passare al vaglio un'elevata quantità di campioni per ricercare quelli che potrebbero rivelarsi positivi. Questi metodi sono specialmente concepiti in modo da evitare i falsi risultati negativi.

I metodi di conferma forniscono informazioni complete o complementari che consentono di individuare e quantificare in maniera inequivocabile le diossine e i PCB diossina-simili al livello massimo consentito.

2. Contesto

Poiché i campioni ambientali e biologici (inclusi i campioni di materie prime/mangimi) generalmente contengono miscele complesse di diversi congeneri di diossine, per agevolare la valutazione dei rischi è stato elaborato il concetto di "fattori di tossicità equivalente" (TEF). I TEF consentono di esprimere concentrazioni di miscele di PCDD e PCDF sostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e, di recente, alcune forme di PCB non orto e orto clorosostituiti aventi proprietà simili a quelle delle diossine in equivalenti tossici (TE) di 2,3,7,8-TCDD (cfr. nota 1 dell'allegato I).

Le concentrazioni delle singole sostanze in un dato campione vengono dapprima moltiplicate per il corrispondente TEF e poi sommate per ottenere la concentrazione totale dei composti diossina-simili espressa in TE.

Per il calcolo del "limite superiore", si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale alla soglia di determinazione.

Per il calcolo del "limite inferiore", si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale a zero.

Per il calcolo del "valore intermedio", si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale alla metà della soglia di quantificazione.

3. Requisiti da applicare nella preparazione dei campioni per la garanzia della qualità.

Si applicano le disposizioni generali sulla preparazione dei campioni destinati all'analisi indicate nell'allegato, punto 1, del decreto ministeriale in data 28 maggio 1982, pubblicato nel supplemento ordinario n. 6 alla Gazzetta Ufficiale n. 265 del 25 settembre 1982.

Occorre inoltre che siano rispettate le seguenti prescrizioni:

- i campioni devono essere conservati e trasportati in appositi contenitori di vetro, alluminio, polipropilene o polietilene, dopo avere rimosso ogni traccia di polvere di carta dal contenitore. Gli strumenti in vetro devono essere risciacquati con solventi previamente sottoposti a un controllo volto a determinare la presenza di diossine;
- occorre fare un'analisi in bianco, ovvero effettuare l'intera procedura analitica senza il campione;
- il peso del campione utilizzato per l'estrazione deve essere tale da rispondere ai requisiti relativi alla sensibilità del metodo.

4. Requisiti applicabili ai laboratori

- I laboratori devono dimostrare la validità del metodo nell'intervallo di tolleranza del livello considerato, ad esempio, 0,5x, 1x e 2x il livello considerato, con un coefficiente di variazione accettabile per analisi ripetute. Per ulteriori informazioni sui criteri di validità, si veda il punto 5.
- Il limite di quantificazione per un metodo di conferma non deve essere superiore a un quinto del livello massimo consentito, per garantire coefficienti di variazione accettabili nell'intervallo di cui al punto precedente;
- Si devono costantemente effettuare controlli in bianco ed esperimenti o analisi dei campioni di controllo con l'aggiunta di indicatori (di preferenza, se disponibile, materiale di riferimento certificato), quali misure interne di garanzia della qualità.
- La riuscita partecipazione a studi condotti in collaborazione con altri laboratori che valutano la competenza del laboratorio è il modo migliore per dimostrarne la perizia nell'ambito di analisi specifiche. Tuttavia, il buon esito della partecipazione a studi condotti con altri laboratori, ad esempio, su campioni di terreno o di acque residue, non dimostra necessariamente che il laboratorio sia altrettanto competente a trattare campioni di prodotti alimentari o mangimi, caratterizzati da livelli di contaminazione minori. È pertanto requisito imprescindibile la partecipazione regolare a studi condotti in collaborazione con altri laboratori sulla determinazione di diossina e di PCB diossina-simili nelle corrispondenti matrici di prodotti alimentari/mangimi.

5. Requisiti applicabili alle procedure d'analisi per le diossine e i PCB diossina-simili

Requisiti di base di validità delle procedure d'analisi:

- Elevata sensibilità e limiti di rilevabilità bassi. Per quanto concerne le PCDD e i PCDF, le quantità rilevabili devono essere dell'ordine del picogrammo di TE (10-12 g), data l'estrema tossicità di alcuni di questi composti. È noto che i PCB si presentano in quantità più elevate rispetto alle PCDD e ai PCDF. Per quanto concerne la maggior parte dei congeneri di PCB, una sensibilità dell'ordine del nanogrammo (10-9 g) è sufficiente. Tuttavia, per la determinazione dei congeneri più tossici di PCB diossina-simili (in particolare i congeneri non orto sostituiti) si deve ottenere la stessa sensibilità delle PCDD e dei PCDF.

- Alta selettività (specificità). Occorre distinguere le PCDD, i PCDF e i PCB diossina-simili da una moltitudine di altri composti che, estratti simultaneamente dal campione e suscettibili d'interferire, sono presenti in concentrazioni di molto superiori a quelle degli analiti da rilevare. Per quanto concerne i metodi di gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS), è necessario distinguere tra vari congeneri, in particolare tra quelli tossici (ad esempio, i diciassette PCDD e PCDF sostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e i PCB diossina-simili) e altri congeneri. Mediante biotest dovrebbe essere possibile determinare selettivamente i valori di TE, quale somma di PCDD, PCDF e PCB diossina-simili.

- Estrema accuratezza (esattezza e precisione). La determinazione deve fornire una stima valida ed affidabile della concentrazione reale presente in un campione. È necessario porre estrema cura (accuratezza della misurazione: grado di concordanza tra il risultato di una misurazione e il valore reale o assegnato del misurando) per evitare che i risultati dell'analisi di un campione siano respinti a causa della scarsa affidabilità della stima dei TE. L'accuratezza è la risultante di esattezza (differenza tra il valore medio misurato per un analita in un materiale certificato, espressa in percentuale di tale valore) e precisione (la precisione viene generalmente calcolata sotto forma di scarto-tipo; essa include la ripetibilità e la riproducibilità e indica il grado di concordanza tra i risultati ottenuti applicando ripetutamente la procedura sperimentale in determinate condizioni).

I metodi di screening possono comprendere biotest e metodi GC/MS, mentre i metodi di conferma sono costituiti dalla gascromatografia ad alta risoluzione e dalla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS). Si devono osservare i seguenti criteri per il valore totale in TE:

	Metodi di screening	Metodi di conferma
Percentuale di falsi negativi	< 1 %	
Esattezza		- 20 % a + 20 %
CV (coefficiente di variazione)	< 30 %	< 15 %

6. Requisiti specifici applicabili ai metodi GC/MS a fini di screening o di conferma

- Quale primo passo dell'analisi per convalidarne la procedura, da effettuare, ad esempio, prima dell'estrazione, occorre aggiungere standard interni di PCDD/F clorosostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e marcati con 13C (e standard interni di PCB diossina-simile marcati con 13C, se si devono determinare PCB diossina-simili). Va aggiunto almeno un congenere per ciascun gruppo omologo di PCDD/F da tetra a octaclorati (e almeno un congenere per ciascun gruppo omologo di PCB diossina-simile, se si devono determinare PCB diossina-simili) (in alternativa, è possibile aggiungere almeno un congenere per ciascuna funzione di registrazione di ioni selezionati tramite spettrografia di massa utilizzata per il controllo di PCDD/F e PCB diossina-simile). Si consiglia vivamente, soprattutto per i metodi di conferma, di utilizzare l'insieme dei diciassette standard interni di PCDD/F clorosostituiti alle posizioni 2,3,7,8 marcati con 13C, nonché la totalità dei dodici standard interni di PCB diossina-simile marcati con 13C (nel caso si debbano determinare PCB diossina-simili).

Vanno inoltre determinati i fattori di risposta relativa per quei congeneri ai quali non è stato aggiunto alcun analogo marcato con 13C, utilizzando soluzioni di taratura adeguate.

- Per i mangimi d'origine vegetale e per i mangimi d'origine animale con un contenuto di grasso inferiore al 10 %, l'aggiunta di standard interni prima dell'estrazione è obbligatoria. Per i mangimi d'origine animale con un contenuto di grasso superiore al 10 %, gli standard interni possono essere aggiunti o prima dell'estrazione o dopo l'estrazione del grasso. Occorre convalidare adeguatamente l'efficacia dell'estrazione, a seconda della fase in cui sono stati introdotti gli standard interni e del modo in cui i risultati sono riportati sulla base di un prodotto o del grasso.

- Prima dell'analisi GC/MS, occorre aggiungere 1 o 2 standard di recupero (surrogato).

- È necessario effettuare il controllo del recupero. Per i metodi di conferma, i recuperi dei singoli standard interni devono essere compresi tra il 60 % e il 120 %. Recuperi inferiori o superiori per singoli congeneri, in particolare alcune dibenzodiossine e alcuni dibenzofurani epta e octaclorati, sono accettabili, purché il loro contributo al valore TE non superi il 10 % del valore totale TE (tenendo conto unicamente di PCDD/F). Per quanto concerne i metodi di screening, i recuperi devono essere compresi tra il 30 % e il 140 %.

- È opportuno separare le diossine dai composti clorurati interferenti, quali i PCB e gli eteri clorurati di difenile, ricorrendo ad adeguate tecniche cromatografiche (di preferenza tramite una colonna di florisil, d'allumina e/o di carbone).

- La separazione gascromatografica degli isomeri deve essere adeguata (overlapping < 25 % tra 1,2,3,4,7,8-HxCDD e 1,2,3,6,7 8-HxCDD).

- Per la determinazione, si consiglia di fare riferimento al metodo "EPA Method 1613, Revision B: Tetra- through Octachlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC-HRMS", o ad un altro metodo con criteri di rendimento equivalenti.

- La differenza tra il livello massimo e il livello minimo non deve essere superiore al 20 % per i mangimi con una contaminazione da diossina pari o superiore il livello massimo. Per i mangimi che presentano livelli di contaminazione di molto inferiori al livello massimo, la differenza può essere dell'ordine del 25-40 %.

7. Metodi d'analisi di screening

7.1. Introduzione

Il metodo di screening consente di applicare vari approcci analitici: un approccio puramente di screening e un approccio quantitativo.

Approccio di screening

La risposta dei campioni è confrontata con quella di un campione di riferimento al livello considerato. I campioni la cui risposta è inferiore a quella del campione di riferimento sono considerati negativi, mentre quelli con risposta superiore sono ritenuti positivi. Requisiti:

- In ogni serie di prove si devono includere un campione di riferimento e uno in bianco, estratti e analizzati allo stesso tempo e alle medesime condizioni. Il campione di riferimento deve presentare una risposta nettamente superiore a quella del bianco.

- Si devono includere campioni di riferimento supplementari con concentrazione pari a 0,5x e 2x il livello considerato, per dimostrare l'efficacia del test nell'intervallo considerato per il controllo del livello considerato.

- Qualora si analizzino altre matrici, occorre dimostrare la validità dei campioni di riferimento, utilizzando di preferenza campioni il cui livello di TE, stabilito tramite HRGC/HRMS, sia equivalente a quello del campione di riferimento o di un bianco arricchito.

- Poiché nei biotest non si possono utilizzare standard interni, i test di ripetibilità sono estremamente importanti per ottenere informazioni sullo scarto-tipo nell'ambito di una serie di test. Il coefficiente di variazione deve essere inferiore al 30 %.

- Per quanto concerne i biotest, occorre definire quali sono i composti-bersaglio, le potenziali interferenze e il valore massimo tollerato per il bianco.

Approccio quantitativo

L'approccio quantitativo comprende obbligatoriamente una serie di diluizioni-tipo, un processo di purificazione e di misurazione doppio o triplo, nonché analisi in bianco e controlli di recupero. Il risultato può essere espresso in TE, dando per scontato che i composti responsabili del segnale soddisfano il principio di TE. A tale fine, si può impiegare la TCDD (o una miscela-tipo di diossine/furani) per elaborare una curva di taratura che consenta di calcolare il livello di TE nell'estratto e di conseguenza, nel campione. Tale risultato è poi corretto con il livello di TE calcolato per un campione in

bianco (per tenere conto di impurezze derivanti dai solventi e dalle sostanze chimiche utilizzate) e per il recupero (quest'ultima quantità è calcolata a partire dal livello di TE in un campione di controllo qualità la cui concentrazione è equivalente a quella del livello massimo considerato). È fondamentale tenere conto che una parte della perdita apparente del recupero può essere dovuta agli effetti della matrice e/o alle differenze tra i valori dei TEF nei biotest e i valori dei TEF ufficiali stabiliti dall'OMS.

7.2. Requisiti per i metodi d'analisi utilizzati per lo screening

- Lo screening può essere effettuato tramite metodi d'analisi GC/MS e biotest. Ai metodi GC/MS si applicano le prescrizioni stabilite al punto 6. Prescrizioni specifiche sono stabilite al punto 7.3 per i biotest cellulari, e al punto 7.4 per i biotest realizzati con kit.

- Si devono fornire informazioni sul numero di risultati falsi positivi e falsi negativi di un'ampia serie di campioni al di sopra e al di sotto dei livelli massimi o dei valori delle soglie d'intervento, raffrontati al contenuto di TE determinato tramite metodo analitico di conferma. La percentuale reale di falsi negativi deve essere inferiore all'1 %. Affinché il metodo di screening risulti vantaggioso, la percentuale di campioni falsi positivi deve essere sufficientemente bassa.

- I risultati positivi devono essere sempre convalidati tramite un metodo analitico di conferma (HRGC/HRMS). I campioni corrispondenti a una vasta gamma di TE devono inoltre essere confermati tramite HRGC/HRMS (circa 2-10 % dei campioni negativi). Si devono fornire dati sulle corrispondenze tra i risultati dei biotest e quelli della HRGC/HRMS.

7.3. Requisiti specifici per i biotest cellulari

- Quando si effettua un biotest, si deve utilizzare in ogni prova una serie di concentrazioni di riferimento di TCDD o una miscela di diossine/furani (curva di risposta con un $R^2 > 0,95$ per una dose completa). Tuttavia, ai fini dello screening, si può utilizzare nell'analisi dei campioni a bassa concentrazione una curva dettagliata nei livelli bassi.

- Per i risultati del biotest in un intervallo di tempo costante, è opportuno usare una concentrazione di riferimento di TCDD (circa 3x il limite di determinazione) su un modulo di controllo della qualità. In alternativa, si può utilizzare la risposta relativa di un campione di riferimento paragonata a una curva di taratura di TCDD, dato che la risposta delle cellule può dipendere da molteplici fattori.

- Si raccomanda di compilare e verificare i grafici del controllo della qualità (QC) per ogni tipo di materiale di riferimento, per garantire che il risultato sia conforme alle linee guida indicate.

- L'induzione della diluizione utilizzata per il campione deve situarsi nella parte lineare della curva di risposta, in particolare per i calcoli quantitativi. I campioni che non rientrano nella parte lineare della curva di risposta devono essere diluiti e nuovamente analizzati. Si consiglia pertanto di analizzare almeno 3 diluizioni alla volta.

- Lo scarto percentuale-tipo non deve essere superiore al 15 % quando si effettua una determinazione tripla per ogni diluizione del campione, né superiore al 30 % fra tre esperimenti indipendenti.

- È possibile scegliere come limite di rilevamento un valore equivalente a 3 volte lo scarto-tipo della soluzione di solvente in bianco o della risposta di fondo. Un altro metodo consiste nell'applicare una risposta che sia superiore alla risposta di fondo (fattore d'induzione 5 volte il solvente in bianco) calcolata dalla curva di taratura del giorno. È possibile scegliere come limite di quantificazione un valore equivalente a 5-6 volte lo scarto-tipo della soluzione di solvente in bianco o della risposta di fondo oppure applicare una risposta che sia nettamente superiore alla risposta di fondo (fattore d'induzione 10 volte il solvente in bianco) calcolata dalla curva di taratura del giorno.

7.4. Requisiti specifici per i biotest effettuati con kit (1)

- Occorre seguire le istruzioni del fabbricante relative alla preparazione dei campioni e alle analisi.
- Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza indicata.
- Non si devono utilizzare materiali o componenti previsti per altri kit.
- I kit vanno conservati e utilizzati alle temperature di conservazione e di impiego indicate.
- Il limite di rilevazione per gli immunodosaggi è pari alla somma della media e $3x$ lo scarto tipo, basandosi su 10 analisi ripetute del bianco, diviso per il valore della pendenza dell'equazione di regressione lineare.
- È opportuno impiegare standard di riferimento per le prove di laboratorio, al fine di garantire che la risposta allo standard rientri in un intervallo di valori accettabile.

8. Comunicazione dei risultati

A condizione che il metodo d'analisi impiegato lo consenta, i risultati dell'analisi devono contenere i livelli dei singoli congeneri di PCDD/F e PCB, nonché essere indicati come limite inferiore, limite superiore e valore intermedio, onde fornire la maggior quantità di dati possibile e permettere così d'interpretare i risultati in base alle prescrizioni specifiche.

La relazione deve inoltre menzionare il contenuto lipidico del campione e il metodo impiegato per l'estrazione del grasso.

I recuperi dei singoli standard interni devono essere forniti se si situano al di fuori dell'intervallo menzionato al punto 6 e qualora eccedano il livello massimo; negli altri casi, dietro richiesta.

(1) I kit per biotest attualmente in commercio non hanno dato prove sufficienti di sensibilità e affidabilità, tali da poterli utilizzare per rilevare la presenza di diossine ai livelli richiesti nei campioni di prodotti alimentari e mangimi.