

RÈGLEMENT (UE) N° 278/2012 DE LA COMMISSION

du 28 mars 2012

portant modification du règlement (CE) n° 152/2009 en ce qui concerne la détermination des teneurs en dioxines et en polychlorobiphényles

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (CE) n° 882/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux ⁽¹⁾, et notamment son article 11, paragraphe 4,

considérant ce qui suit:

- (1) La directive 2002/32/CE du Parlement européen et du Conseil du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux ⁽²⁾ prescrit les teneurs maximales en dioxines, en furanes et en polychlorobiphényles (PCB) des aliments pour animaux et les seuils d'intervention au-delà desquels les États membres procèdent à des enquêtes visant à déterminer les sources desdites substances.
- (2) Le règlement (CE) n° 152/2009 de la Commission du 27 janvier 2009 portant fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux ⁽³⁾ prévoit des méthodes de détermination des teneurs en dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD), en dibenzofuranes polychlorés (PCDF) et en polychlorobiphényles (PCB) de type dioxine des aliments pour animaux.
- (3) Une méthode analytique de dépistage dont la validité est largement reconnue et qui est dotée d'une grande capacité peut être utilisée pour déterminer les échantillons présentant des teneurs significatives en PCDD/F et en PCB de type dioxine (qui sélectionne de préférence les échantillons dépassant les seuils d'intervention et garantit la sélection d'échantillons dépassant les teneurs maximales). Les teneurs en PCDD/F et en PCB de type dioxine de ces échantillons doivent être déterminées au moyen d'une méthode analytique de confirmation. Il convient dès lors de prévoir des prescriptions appropriées applicables à la méthode de dépistage pour s'assurer que le taux de faux conformes par rapport aux teneurs maxi-

males est inférieur à 5 %, ainsi que des prescriptions strictes applicables aux méthodes analytiques de confirmation. En outre, les méthodes de confirmation permettent la détermination des teneurs au niveau du bruit de fond également, ce qui est important pour le suivi de l'évolution chronologique, pour l'évaluation de l'exposition et pour la réévaluation des teneurs maximales et des seuils d'intervention.

- (4) La modification des teneurs maximales en dioxines et en PCB de type dioxine et l'établissement des teneurs maximales en PCB autres que ceux de type dioxine dans la directive 2002/32/CE, ainsi que la nécessaire mise à jour des critères applicables aux méthodes de dépistage, imposent de modifier les prescriptions applicables au dosage des dioxines et des PCB dans les aliments pour animaux, énoncées à l'annexe V, partie B, du règlement (CE) n° 152/2009. Il convient, pour des raisons de clarté et d'intelligibilité, de remplacer la partie B de l'annexe V.
- (5) Il est essentiel que les résultats d'analyse soient consignés et interprétés de manière uniforme pour garantir une démarche harmonisée au stade des mesures exécutoires dans l'ensemble de l'Union.
- (6) Il convient donc de modifier l'annexe V du règlement (CE) n° 152/2009 en conséquence.
- (7) Les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale et n'ont soulevé l'opposition ni du Parlement européen, ni du Conseil,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

La partie B de l'annexe V du règlement (CE) n° 152/2009 est modifiée conformément à l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Il s'applique à partir de la date d'entrée en vigueur.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 28 mars 2012.

Par la Commission

Le président

José Manuel BARROSO

⁽¹⁾ JO L 165 du 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ JO L 140 du 30.5.2002, p. 10.

⁽³⁾ JO L 54 du 26.2.2009, p. 1.

ANNEXE

À l'annexe V du règlement (CE) n° 152/2009, la partie B, intitulée «DÉTERMINATION DES TENEURS EN DIOXINES (PCDD/PCDF) ET EN PCB DE TYPE DIOXINE», est remplacée par le texte suivant:

«B. DÉTERMINATION DES TENEURS EN DIOXINES (PCDD/PCDF) ET EN PCB

CHAPITRE I

Méthodes de prélèvement d'échantillons et interprétation des résultats d'analyse1. **Objet et champ d'application**

Les échantillons destinés au contrôle officiel des teneurs en dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD), en dibenzofuranes polychlorés (PCDF), en polychlorobiphényles (PCB) (*) de type dioxine et en PCB autres que ceux de type dioxine des aliments pour animaux sont prélevés conformément aux dispositions de l'annexe I. Les exigences quantitatives concernant le contrôle des substances ou des produits répartis uniformément dans les aliments pour animaux prévues au point 5.A de l'annexe I sont appliquées. Les échantillons globaux ainsi obtenus sont considérés comme représentatifs des lots ou sous-lots sur lesquels ils sont prélevés. Le respect des teneurs maximales fixées dans la directive 2002/32/CE est établi sur la base des teneurs déterminées dans les échantillons de laboratoire.

(*) Tableau des TEF (= facteurs d'équivalence toxique) pour les dioxines, les furanes et les PCB de type dioxine: TEF de l'OMS pour l'évaluation des risques pour les êtres humains, fondés sur les conclusions de la réunion des experts du programme international sur la sécurité des substances chimiques (PISSC) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) qui s'est tenue en juin 2005 à Genève [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), p. 223 à 241 (2006)]

Congénère	Valeur TEF	Congénère	Valeur TEF
Dibenzo-p-dioxines ("PCDD") et dibenzo-p-furanes ("PCDF")		PCB "de type dioxine" PCB non ortho + PCB mono ortho	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-ortho PCBs	
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		
		Mono-ortho PCBs	
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		

Abréviations utilisées: "T" = tétra; "Pe" = penta; "Hx" = hexa; "Hp" = hepta; "O" = octa; "CDD" = chlorodibenzodioxine; "CDF" = chlorodibenzofurane; "CB" = chlorobiphényle.

Aux fins de la présente partie de l'annexe V, les définitions figurant à l'annexe I de la décision 2002/657/CE de la Commission du 14 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats (**) s'appliquent.

(**) JO L 221 du 17.8.2002, p. 8.

2. Conformité du lot ou sous-lot avec les spécifications

2.1. Spécifications relatives aux PCB autres que ceux de type dioxine

Le lot est conforme aux spécifications si le résultat d'analyse ne dépasse pas la teneur maximale en PCB autres que ceux de type dioxine fixée dans la directive 2002/32/CE, compte tenu de l'incertitude de mesure.

Le lot n'est pas conforme aux spécifications si le résultat d'analyse supérieur (***) , confirmé par une double analyse (****), dépasse la teneur maximale fixée dans la directive 2002/32/CE, compte tenu de l'incertitude de mesure.

L'incertitude de mesure est prise en compte de l'une des manières suivantes:

- en calculant l'incertitude élargie à l'aide d'un facteur d'élargissement de 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %. Un lot ou sous-lot est non conforme si la valeur mesurée moins U dépasse la teneur maximale,
- en établissant la limite de décision (CCa) conformément au point 3.1.2.5 de l'annexe I de la décision 2002/657/CE. Un lot ou sous-lot est non conforme si la valeur mesurée est égale ou supérieure à la CCa.

Ces règles d'interprétation s'appliquent aux résultats d'analyse des échantillons destinés au contrôle officiel. En cas d'analyse à des fins de recours ou d'arbitrage, les règles nationales s'appliquent.

(***) L'"estimation supérieure" est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié égale à la limite de quantification. L'"estimation inférieure" est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié égale à zéro. L'"estimation intermédiaire" est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié égale à la moitié de la limite de quantification.

(****) La double analyse est nécessaire pour exclure la possibilité d'une contamination croisée interne ou un mélange accidentel des échantillons. La première analyse, compte tenu de l'incertitude de mesure, sert à vérifier la conformité. Si l'analyse est effectuée dans le contexte d'un cas de contamination, la confirmation par double analyse peut être omise lorsque la traçabilité permet d'établir le lien entre les échantillons prélevés en vue de l'analyse et le cas de contamination.

2.2. Spécifications relatives aux PCDD/F et aux PCB de type dioxine

Le lot est conforme aux spécifications si le résultat d'une seule analyse:

- effectuée selon une méthode de dépistage avec un taux de faux conformes inférieur à 5 % indique que la teneur ne dépasse pas les limites maximales correspondantes fixées pour les PCDD/PCDF et la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans la directive 2002/32/CE,
- effectuée selon une méthode de confirmation ne dépasse pas les limites maximales correspondantes fixées pour les PCDD/PCDF et la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans la directive 2002/32/CE, compte tenu de l'incertitude de mesure.

Pour les analyses de dépistage, une valeur seuil est établie pour déterminer la conformité avec les niveaux considérés correspondants établis pour les PCDD/PCDF ou pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine.

Le lot n'est pas conforme aux spécifications si le résultat d'analyse supérieur (****), obtenu à l'aide d'une méthode de confirmation et confirmé par une double analyse, dépasse la teneur maximale fixée dans la directive 2002/32/CE, compte tenu de l'incertitude de mesure (*****).

L'incertitude de mesure est prise en compte de l'une des manières suivantes:

- en calculant l'incertitude élargie à l'aide d'un facteur d'élargissement de 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %. Un lot ou sous-lot est non conforme si la valeur mesurée moins U dépasse la teneur maximale. En cas de dosage distinct des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine, la somme des estimations de l'incertitude élargie des résultats d'analyse distincts concernant les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine doit être utilisée pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine;
- en établissant la limite de décision (CCa) conformément au point 3.1.2.5 de l'annexe I de la décision 2002/657/CE. Un lot ou sous-lot est non conforme si la valeur mesurée est égale ou supérieure à la CCa.

Ces règles d'interprétation s'appliquent aux résultats d'analyse des échantillons destinés au contrôle officiel. En cas d'analyse à des fins de recours ou d'arbitrage, les règles nationales s'appliquent.

(*****) L'“estimation supérieure” est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié à l'équivalent toxique (TEQ) égale à la limite de quantification. L'“estimation inférieure” est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié au TEQ égale à zéro. L'“estimation intermédiaire” est une valeur calculée sur la base d'une contribution de chaque congénère non quantifié au TEQ égale à la moitié de la limite de quantification.

(*****) La double analyse est nécessaire pour exclure la possibilité d'une contamination croisée interne ou un mélange accidentel des échantillons. La première analyse, compte tenu de l'incertitude de mesure, sert à vérifier la conformité. Si l'analyse est effectuée dans le contexte d'un cas de contamination, la confirmation par double analyse peut être omise lorsque la traçabilité permet d'établir le lien entre les échantillons prélevés en vue de l'analyse et le cas de contamination.

3. Résultats dépassant les seuils d'intervention prévus à l'annexe II de la directive 2002/32/CE

Les seuils d'intervention sont utilisés aux fins de la sélection d'échantillons dans les cas où il est nécessaire de déterminer une source de contamination et de prendre des mesures de réduction ou d'élimination de celle-ci. Les méthodes de dépistage établissent des valeurs seuil appropriées aux fins de la sélection de ces échantillons. Il n'y a lieu de prendre les mesures nécessaires à la détermination d'une source et à la réduction ou à l'élimination de la contamination que si le dépassement des seuils d'intervention est confirmé par une double analyse à l'aide d'une méthode de confirmation, compte tenu de l'incertitude de mesure (*****).

(*****) Les explications et les prescriptions concernant la double analyse applicable aux teneurs maximales figurant à la note de bas de page (*****) valent également pour la mesure des seuils d'intervention.

CHAPITRE II

Préparation des échantillons et prescriptions applicables aux méthodes d'analyse à utiliser pour le contrôle officiel des teneurs en dioxines (PCDD/PCDF) et en PCB de type dioxine des aliments pour animaux

1. Champ d'application

Les prescriptions de la présente annexe s'appliquent aux analyses d'aliments pour animaux effectuées aux fins du contrôle officiel des teneurs en dibenzo-p-dioxines polychlorées et dibenzofuranes polychlorés (PCDD/F) substitués en 2,3,7,8 et en polychlorobiphényles de type dioxine (PCB de type dioxine), ainsi qu'à d'autres fins réglementaires.

Le contrôle de la présence de PCDD/F et de PCB de type dioxine dans les aliments pour animaux peut avoir deux objectifs:

- la sélection des échantillons dont les teneurs en PCDD/F et en PCB de type dioxine dépassent les teneurs maximales, ou les seuils d'intervention. Cette démarche peut reposer sur une méthode de dépistage offrant une grande capacité de traitement d'échantillons à la fois efficace et économique et augmentant les chances de découvrir de nouveaux cas d'exposition élevée des consommateurs et de risques pour leur santé. Les méthodes de dépistage peuvent comprendre des méthodes de bioanalyse et des méthodes de CG/SM. Leur application est destinée à éviter les faux conformes. La concentration en PCDD/F et la somme des PCDD/F et des PCB de type dioxine dans les échantillons présentant des teneurs significatives doivent être déterminées/confirmées par une méthode de confirmation;
- la détermination des teneurs en PCDD/F et en PCB de type dioxine des échantillons d'aliments pour animaux au niveau du bruit de fond. Cette démarche est importante pour suivre l'évolution chronologique, pour évaluer l'exposition de la population et pour constituer une base de données aux fins de la réévaluation éventuelle des seuils d'intervention et des teneurs maximales. Cet objectif est atteint à l'aide de méthodes de confirmation permettant l'identification et la quantification univoque des PCDD/F et des PCB de type dioxine au niveau considéré. Ces méthodes peuvent servir à la confirmation des résultats obtenus par les méthodes de dépistage et à la détermination des niveaux de bruit de fond dans le contrôle des aliments pour animaux. Elles sont aussi importantes pour établir les profils de congénères afin de déterminer la source d'une contamination éventuelle. À l'heure actuelle, ces méthodes reposent sur la chromatographie en phase gazeuse haute résolution couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (CGHR/SMHR).

2. Classement des méthodes selon leur degré de quantification (*****)

(******) Adapté aux PCDD/F et aux composés de type dioxine sur la base du document intitulé “Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines”, laboratoires de référence de l'Union européenne pour les résidus de médicaments vétérinaires et de contaminants dans les denrées alimentaires d'origine animale de Fougères, de Berlin et de Bilthoven, 20 janvier 2010, http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm.

- 2.1. Les *méthodes qualitatives* donnent une réponse de type présence/absence des analytes considérés, sans indication quantitative de la concentration de l'analyte supposé. Ces méthodes pourraient fournir des résultats semi-quantitatifs mais elles sont utilisées exclusivement pour donner une réponse de type présence/absence des analytes et donner une indication des niveaux supérieurs ou inférieurs à certaines plages, par exemple la limite de détection, la limite de quantification ou les valeurs seuil.

Le contrôle des teneurs maximales et des seuils d'intervention concernant les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine dans les aliments pour animaux peut se faire à l'aide de méthodes de dépistage, qui sont fondées sur la comparaison du résultat d'analyse à une valeur seuil et donnent une réponse de type présence/absence des analytes indiquant la possibilité d'un dépassement du niveau considéré.

- 2.2. Les *méthodes semi-quantitatives* donnent une indication approximative de la concentration de l'analyte supposé lorsque les résultats numériques ne remplissent pas les prescriptions concernant les méthodes quantitatives. Elles peuvent servir à fournir des informations sur la plage de concentration de l'analyte et aider l'analyste à décider de la plage d'étalonnage pour l'essai de confirmation à effectuer ultérieurement et à des fins de contrôle qualité. Exemples:

- a) méthodes fondées sur le recours aux principes biologiques tels que les bioessais cellulaires, les tests d'interaction récepteurs ou les immuno-essais, ci-après dénommées méthodes de bioanalyse, qui sont capables de détecter les analytes considérés, qui reposent sur une courbe d'étalonnage, donnent une réponse de type présence/absence indiquant la possibilité d'un dépassement du niveau considéré et qui permettent de consigner le résultat en équivalents de bioanalyse (BEQ), lesquels donnent une indication de la valeur TEQ dans l'échantillon,
- b) essai physico-chimique [chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse/spectrométrie de masse (CG-SM/SM) ou chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse basse résolution (CG/SMBR)], pour lequel les caractéristiques de la précision de la méthode établies ne remplissent pas les prescriptions applicables aux essais quantitatifs.

- 2.3. Les *méthodes quantitatives* remplissent les mêmes conditions en matière d'exactitude, de gamme dynamique et de précision que les méthodes de confirmation. Lorsque la quantification est nécessaire, les méthodes quantitatives sont validées en tant que méthodes de confirmation.

3. Contexte

Pour le calcul des concentrations en équivalents toxiques (TEQ), les concentrations de chaque substance dans un échantillon donné sont multipliées par leurs facteurs d'équivalence toxique (TEF) respectifs, tels qu'ils sont fixés par l'Organisation mondiale de la santé et mentionnés à l'appendice de la présente annexe, puis elles sont additionnées de façon à donner la concentration totale en composés de type dioxine, exprimée en TEQ.

Aux fins de la présente partie B de l'annexe V, la limite de quantification spécifique acceptée d'un congénère individuel est la concentration d'un analyte dans l'extrait d'un échantillon qui produit une réponse instrumentale à deux ions suivis avec un rapport S/B (signal/bruit) de 3:1 pour le signal le moins intense et remplit les critères d'identification décrits, par exemple, dans la norme prEN 16215 (Aliments des animaux – Dosage des dioxines, des PCB de type dioxine et des PCB indicateurs par CG/SMHR) et/ou dans la méthode EPA 1613, révision B.

Les méthodes bioanalytiques de dépistage ne donnent pas de résultats à l'échelle du congénère mais une simple indication (*****) de la valeur TEQ, exprimée en équivalents de bioanalyse (BEQ) compte tenu du fait que les composés présents dans un extrait d'échantillon qui produit une réponse lors de l'essai peuvent ne pas tous remplir l'ensemble des conditions du principe du TEQ.

Les méthodes de dépistage et de confirmation ne peuvent être appliquées aux fins du contrôle d'une matrice donnée que si les méthodes sont suffisamment sensibles pour détecter les teneurs de manière fiable au niveau considéré (seuil d'intervention ou teneur maximale).

(*****) Les méthodes de bioanalyse ne sont pas spécifiques aux congénères inclus dans le système des TEF. D'autres composés structurellement proches activant le récepteur aryl hydrocarbone (AhR) et susceptibles d'être présents dans l'extrait d'échantillon contribuent à la réponse générale. Aussi les résultats de bioanalyse ne sauraient-ils être une estimation et constituent plutôt une indication de la valeur TEQ dans l'échantillon.

4. Prescriptions d'assurance qualité

- 4.1. Des mesures doivent être prises en vue d'éviter toute contamination croisée à chaque étape de la procédure d'échantillonnage et d'analyse.
- 4.2. Les échantillons doivent être conservés et transportés dans des récipients en verre, en aluminium, en polypropylène ou en polyéthylène adaptés à la conservation, préservant les teneurs en PCDD/PCDF et en PCB de type dioxine dans les échantillons de la moindre influence. Toute trace de poussière de papier doit être enlevée du contenant de l'échantillon.

- 4.3. La conservation et le transport de l'échantillon doivent être effectués d'une façon telle que l'intégrité de l'échantillon d'aliment pour animaux est préservée.
- 4.4. Si nécessaire, chaque échantillon de laboratoire doit être broyé finement et soigneusement mélangé, selon une méthode garantissant une homogénéisation complète (par exemple de façon à pouvoir passer au travers d'un tamis à mailles de 1 mm). Les échantillons doivent être séchés avant le broyage si leur teneur en humidité est trop élevée.
- 4.5. Il y a lieu de contrôler les réactifs, la verrerie et l'équipement en vue de déceler toute influence des résultats exprimés en TEQ ou en BEQ.
- 4.6. Un essai à blanc est réalisé, en suivant tout le procédé d'analyse, mais sans l'échantillon.
- 4.7. Pour les méthodes de bioanalyse, l'ensemble de la verrerie et des solvants utilisés dans l'analyse doivent faire l'objet d'un dépistage de composés interférant avec la détection des composés cibles dans la plage de travail. La verrerie est rincée à l'aide de solvants ou chauffée à des températures permettant d'éliminer de sa surface les traces de PCDD/PCDF, de composés de type dioxine et de composés interférents.
- 4.8. La quantité de l'extrait doit être suffisamment élevée, de façon à répondre aux prescriptions dans une plage de travail suffisamment basse comprenant les concentrations considérées.
- 4.9. Les procédures spécifiques de préparation des échantillons utilisées pour les produits considérés doivent respecter des directives reconnues sur le plan international.

5. Prescriptions applicables aux laboratoires

- 5.1. Conformément aux dispositions du règlement (CE) n° 882/2004, les laboratoires sont agréés par un organisme habilité qui se conforme au guide ISO 58, de manière à garantir qu'ils appliquent les procédures d'assurance qualité à leurs analyses. Les laboratoires sont agréés selon la norme ISO/CEI 17025.
- 5.2. La compétence des laboratoires est prouvée par la participation continue et réussie à des études interlaboratoires sur le dosage des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine dans les matrices d'aliments pour animaux et les plages de concentration correspondantes.
- 5.3. Les laboratoires appliquant les méthodes de dépistage pour les contrôles de routine des échantillons coopèrent étroitement avec les laboratoires appliquant la méthode de confirmation, tant pour le contrôle qualité que pour la confirmation du résultat de l'analyse des échantillons suspects.

6. Prescriptions fondamentales applicables aux procédés d'analyse relatifs aux dioxines (PCDD/PCDF) et aux PCB de type dioxine

6.1. Sensibilité élevée et limite de quantification basse

En ce qui concerne les PCDD/PCDF, étant donné la toxicité extrêmement élevée de certains de ces composés, les seuils de détection doivent être de l'ordre de quelques femtogrammes (10^{-15} g). Pour la plupart des congénères PCB, une limite de quantification de l'ordre du nanogramme (10^{-9} g) est déjà suffisante. Pour la mesure des congénères PCB de type dioxine plus toxiques (en particulier les congénères non ortho substitués), la limite inférieure de la plage de travail doit être sous le picogramme (10^{-12} g). Pour tous les autres congénères PCB, une limite de quantification de l'ordre du nanogramme (10^{-9} g) est suffisante.

6.2. Grande sélectivité (spécificité)

- 6.2.1. Il est nécessaire de distinguer les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine d'une multitude d'autres composés extraits simultanément de l'échantillon qui sont susceptibles d'interférer et peuvent être présents à des concentrations supérieures, jusqu'à plusieurs ordres de grandeur, à celles des analytes à doser. Pour les méthodes de CG/SM, il est nécessaire d'établir une distinction entre les congénères, notamment entre les congénères toxiques (par exemple, les dix-sept PCDD/PCDF substitués en 2,3,7,8 et les douze PCB de type dioxine) et les autres congénères.
- 6.2.2. Les méthodes de bioanalyse doivent permettre la détection des composés cibles en tant que somme des PCDD/PCDF et/ou des PCB de type dioxine. La purification des échantillons est destinée à éliminer les composés à l'origine de faux non conformes ou les composés susceptibles d'atténuer la réponse et de donner des faux conformes.

6.3. Grande exactitude (justesse et précision, taux de récupération apparent du bioessai)

- 6.3.1. Pour les méthodes de CG/SM, le dosage fournit une estimation juste de la concentration réelle dans un échantillon. Une grande exactitude est nécessaire pour empêcher que le résultat d'une analyse d'échantillon ne soit écarté en raison du manque de fiabilité de la valeur TEQ déterminée. L'exactitude est une expression de la justesse (la différence entre la valeur moyenne mesurée pour un analyte dans un matériau certifié et sa valeur certifiée, exprimée en pourcentage de cette valeur) et de la précision (RSD_R est l'écart type relatif calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité).

- 6.3.2. Pour les méthodes de bioanalyse, le taux de récupération apparent du bioessai doit être déterminé. Le taux de récupération apparent du bioessai désigne la valeur BEQ calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la TCDD ou du PCB 126 corrigée du blanc, puis divisée par la valeur TEQ déterminée par CG/SMHR. Elle vise à corriger des facteurs tels que la perte de PCDD/PCDF et de composés de type dioxine durant les phases d'extraction et de purification, la co-extraction de composés qui augmentent ou atténuent la réponse (effets agonistes et antagonistes), la qualité de l'ajustement de la courbe ou les différences entre les valeurs TEF (facteur d'équivalence toxique) et REP (potentiel relatif). Le taux de récupération apparent du bioessai est calculé à partir d'échantillons de référence appropriés avec des profils de congénères représentatifs proches du niveau considéré.
- 6.4. *Validation dans la plage du niveau considéré et mesures générales de contrôle qualité*
- 6.4.1. Les laboratoires démontrent la validité de la méthode dans une certaine plage proche du niveau considéré, par exemple à des niveaux égaux à 0,5 fois, 1 fois et 2 fois ce niveau, avec un coefficient de variation acceptable pour les analyses répétées, durant la procédure de validation et durant l'analyse de routine.
- 6.4.2. Des essais à blanc et des expériences avec enrichissement ou des analyses sur des échantillons de contrôle (si possible, des matériaux de référence certifiés) sont effectués régulièrement dans le cadre des mesures internes de contrôle qualité. Il convient de réaliser et de vérifier des cartes de contrôle qualité pour les essais à blanc, les expériences avec enrichissement ou l'analyse des échantillons de contrôle afin de garantir que les performances analytiques sont conformes aux prescriptions.
- 6.5. *Limite de quantification*
- 6.5.1. Pour une méthode bioanalytique de dépistage, l'établissement de la limite de quantification n'est pas indispensable, mais la méthode doit démontrer qu'elle permet de distinguer la valeur de blanc de la valeur seuil. La transmission d'une valeur BEQ nécessite l'établissement d'un seuil d'inscription pour décider du sort des échantillons produisant une réponse au-dessous de ce seuil. Le seuil d'inscription présente une différence avérée d'un facteur de trois au moins par rapport aux échantillons du blanc de procédure produisant une réponse au-dessous de la plage de travail. Il est donc calculé à partir d'échantillons contenant les composés cibles proches de la teneur minimale requise et non à partir d'un rapport S/B ou d'un blanc d'essai.
- 6.5.2. La limite de quantification pour une méthode de confirmation est de l'ordre d'un cinquième du niveau considéré.
- 6.6. *Critères d'analyse*
- La fiabilité des résultats des méthodes de confirmation ou de dépistage impose le respect des critères ci-après pour la valeur TEQ ou la valeur BEQ, qu'elle soit exprimée en TEQ totaux (somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine) ou séparément pour les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine.

	Dépistage à l'aide de méthodes de bioanalyse ou physico-chimiques	Méthodes de confirmation
Taux de faux conformes (*)	< 5 %	
Justesse		De - 20 % à + 20 %
Répétabilité (RSD _r)	< 20 %	
Reproductibilité intralaboratoire (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) au regard des teneurs maximales.

- 6.7. *Prescriptions spécifiques applicables aux méthodes de dépistage*
- 6.7.1. Le dépistage peut être effectué à l'aide de méthodes de CG/SM ou de méthodes de bioanalyse. Pour les méthodes de CG/SM, les prescriptions établies au point 7 doivent être appliquées. Pour les méthodes de bioanalyse cellulaire, des prescriptions spécifiques sont établies au point 8.
- 6.7.2. Les laboratoires appliquant les méthodes de dépistage pour les contrôles de routine d'échantillons coopèrent étroitement avec les laboratoires appliquant la méthode de confirmation.
- 6.7.3. Les performances de la méthode de dépistage doivent être vérifiées durant l'analyse de routine par un contrôle qualité des analyses et par la validation continue de la méthode. Il doit exister un programme continu de contrôle des résultats conformes.

6.7.4. Contrôle de l'atténuation éventuelle de la réponse cellulaire et cytotoxicité

Vingt pour-cent des extraits d'échantillons sont mesurés par dépistage de routine sans et avec ajout de la 2,3,7,8-TCDD en fonction du niveau considéré, pour vérifier si la réponse est éventuellement atténuée par des substances interférentes présentes dans l'extrait d'échantillon. La concentration mesurée dans l'échantillon enrichi est comparée à la somme de la concentration de l'extrait non enrichi et de la concentration de l'enrichissement. Si cette concentration mesurée est inférieure de plus de 25 % à la concentration (somme) calculée, cela indique la possibilité d'atténuation du signal et l'échantillon en question doit faire l'objet de l'analyse de confirmation par CG/SMHR. Les résultats sont contrôlés à l'aide de cartes de contrôle qualité.

6.7.5. Contrôle qualité sur des échantillons conformes

Environ 2 à 10 % des échantillons conformes, en fonction de la matrice et de l'expérience du laboratoire, sont confirmés par CG/SMHR.

6.7.6. Détermination des taux de faux conformes à partir des données du contrôle qualité

Le taux de faux conformes résultant du dépistage des échantillons au-dessous et au-dessus de la teneur maximale ou du seuil d'intervention est déterminé. Les taux réels de faux conformes doivent être inférieurs à 5 %. Dès lors que le contrôle qualité des échantillons conformes fait apparaître au moins vingt résultats confirmés par matrice/groupe de matrices, des conclusions sur le taux de faux conformes doivent être tirées à partir de cette base de données. Les résultats des échantillons analysés au moyen d'essais circulaires ou durant des cas de contamination, jusqu'à concurrence d'une concentration de deux fois la teneur maximale, par exemple, peuvent figurer parmi les vingt résultats à atteindre pour déterminer le taux de faux conformes. Les échantillons couvrent les profils de congénères les plus fréquents, représentant différences sources.

Bien que les bioanalyses de dépistage servent avant tout à révéler les échantillons dépassant le seuil d'intervention, le critère appliqué pour la détermination des taux de faux conformes est la teneur maximale, compte tenu de l'incertitude de mesure de la méthode de confirmation.

6.7.7. Les résultats du dépistage suspectés d'être non conformes sont toujours vérifiés au moyen d'une méthode analytique de confirmation (CG/SMHR). Ces échantillons peuvent également servir à l'évaluation du taux de faux non conformes. Pour les méthodes de dépistage, le taux de faux non conformes est la fraction des résultats dont la conformité est confirmée par une analyse de confirmation par CG/SMHR, alors que lors du dépistage précédent, l'échantillon a été déclaré suspecté d'être non conforme. L'évaluation du caractère avantageux de la méthode de dépistage se fonde sur la comparaison du nombre d'échantillons faussement non conformes et du nombre total d'échantillons contrôlés. Ce taux doit être suffisamment faible pour rendre l'utilisation de la méthode de dépistage avantageuse.

6.7.8. Les méthodes de bioanalyse doivent fournir une indication juste de la valeur TEQ, calculée et exprimée en BEQ, au moins dans des conditions de validation.

De plus, pour les méthodes de bioanalyse suivies dans des conditions de répétabilité, le RSD_r intralaboratoire sera généralement inférieur au RSD_R (reproductibilité).

7. Prescriptions spécifiques applicables aux méthodes de CG/SM à respecter à des fins de dépistage ou de confirmation

7.1. Prescriptions générales

L'écart entre l'estimation supérieure et l'estimation inférieure ne peut dépasser 20 % pour les aliments pour animaux dont la contamination est d'environ 1 ng OMS-TEQ/kg de produit avec une teneur en humidité de 12 % (sur la base de la somme des PCDD/F et des PCB de type dioxine). Pour des niveaux de contamination inférieurs, par exemple 0,5 ng OMS-TEQ/kg de produit, la différence entre l'estimation supérieure et l'estimation inférieure peut se situer dans une plage comprise entre 25 et 40 %.

7.2. Mesure des taux de récupération

7.2.1. Des étalons internes de PCDD/PCDF substitués en 2,3,7,8 marqués au ^{13}C et des étalons internes de PCB de type dioxine marqués au ^{13}C doivent être ajoutés au tout début de la méthode d'analyse, par exemple avant la phase d'extraction, afin de valider le procédé d'analyse. Il est nécessaire d'ajouter au moins un congénère pour chacun des groupes d'isomères tétra à octachlorés des PCDD/PCDF et au moins un congénère pour chaque groupe d'isomères des PCB de type dioxine (une autre méthode consiste à ajouter au moins un congénère pour chaque fenêtre d'acquisition spectrométrique utilisée pour le contrôle des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine). Pour les méthodes de confirmation, il y a lieu d'utiliser l'ensemble des dix-sept étalons internes de PCDD/PCDF substitués en 2,3,7,8 marqués au ^{13}C ainsi que la totalité des douze étalons internes de PCB de type dioxine marqués au ^{13}C .

- 7.2.2. Des facteurs de réponse relatifs doivent également être déterminés dans le cas des congénères pour lesquels aucun analogue marqué au ^{13}C n'est ajouté, en utilisant des solutions d'étalonnage appropriées.
- 7.2.3. Pour les aliments pour animaux d'origine végétale et les aliments pour animaux d'origine animale contenant moins de 10 % de graisses, il est obligatoire d'ajouter les étalons internes avant la phase d'extraction. Pour les aliments pour animaux d'origine animale contenant plus de 10 % de graisses, les étalons internes sont ajoutés soit avant soit après l'extraction des graisses. Une validation adéquate de l'efficacité de l'extraction est conduite, en fonction de la phase au cours de laquelle les étalons internes sont introduits et de la façon dont les résultats sont consignés (sur la base du produit ou des graisses).
- 7.2.4. Avant l'analyse par CG/SM, un ou deux étalons de récupération doivent être ajoutés.
- 7.2.5. Le taux de récupération doit être mesuré. Dans le cas des méthodes de confirmation, les taux de récupération des étalons internes se situent dans une plage comprise entre 60 et 120 %. Pour des congénères individuels, en particulier pour certains dibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes heptachlorés et octachlorés, des taux de récupération inférieurs ou supérieurs sont acceptables, à condition que leur contribution à la valeur TEQ ne dépasse pas 10 % de la valeur TEQ totale (sur la base de la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine). Dans le cas des méthodes de dépistage par CG/SM, les taux de récupération se situent dans une plage comprise entre 30 et 140 %.
- 7.3. *Élimination des substances interférentes*
- Les PCDD/PCDF sont séparés des composés chlorés interférents, tels que les PCB autres que ceux de type dioxine et les diphenyléthers chlorés, au moyen de techniques chromatographiques appropriées (de préférence au moyen d'une colonne de florisil, d'alumine et/ou de charbon).
 - La séparation des isomères par chromatographie en phase gazeuse doit être < 25 % de pic à pic entre 1,2,3,4,7,8-HxCDF et 1,2,3,6,7,8-HxCDF.
- 7.4. *Étalonnage avec courbe étalon*
- La plage de la courbe d'étalonnage couvre la plage correspondante des niveaux considérés.

8. Prescriptions spécifiques applicables aux méthodes de bioanalyse

Les méthodes de bioanalyse sont des méthodes fondées sur le recours aux principes biologiques tels que les bioessais cellulaires, les tests d'interaction récepteurs ou les immuno-essais. Le présent point 8 énonce les prescriptions applicables aux méthodes de bioanalyse en général.

Dans une méthode de dépistage, l'échantillon est en principe déclaré conforme ou est déclaré suspecté d'être non conforme. À cette fin, la valeur BEQ calculée est comparée à la valeur seuil (voir point 8.3). Les échantillons au-dessous de la valeur seuil sont déclarés conformes, et ceux à la valeur seuil ou au-dessus de celle-ci sont déclarés suspectés d'être non conformes et nécessitent une analyse au moyen d'une méthode de confirmation. Dans la pratique, une valeur BEQ équivalant aux deux tiers de la teneur maximale est la valeur seuil la plus indiquée garantissant un taux de faux conformes inférieur à 5 % et un taux acceptable de faux non conformes. Avec des teneurs maximales distinctes pour les PCDD/F et pour la somme des PCDD/F et des PCB de type dioxine, le contrôle de la conformité des échantillons sans fractionnement requiert des valeurs seuil de bioessai appropriées pour les PCDD/F. Pour la vérification des échantillons dépassant les seuils d'intervention, la valeur seuil pourrait être un pourcentage approprié du niveau considéré.

Par ailleurs, dans le cas de certaines méthodes de bioanalyse, une valeur indicative exprimée en BEQ peut être donnée pour les échantillons dans la plage de travail et dépassant le seuil d'inscription (voir points 8.1.1 et 8.1.6).

- 8.1. *Évaluation de la réponse à l'essai*
- 8.1.1. Prescriptions générales
- Le calcul des concentrations à partir d'une courbe d'étalonnage de la TCDD fera apparaître une variation importante (coefficient de variation élevé – CV) des valeurs aux extrémités inférieure et supérieure de la courbe. La plage de travail est la zone où ce CV est inférieur à 15 %. L'extrémité inférieure de la plage de travail (seuil d'inscription) doit par ailleurs être établie à un niveau supérieur d'un facteur de trois au moins aux blancs de procédure. L'extrémité supérieure de la plage de travail est habituellement représentée par la valeur EC_{70} (70 % de la concentration effective maximale), mais elle se situe à un niveau inférieur si le CV est supérieur à 15 % dans cette plage. La plage de travail est établie durant la validation. Les valeurs seuil (point 8.3) doivent se situer dans la plage de travail.
 - Les solutions étalon et les extraits d'échantillon sont analysés au moins en double. En cas d'utilisation de doubles, une solution étalon ou un extrait témoin analysé dans quatre à six puits répartis sur la plaque produisent une réponse ou une concentration (possible uniquement dans la plage de travail) sur la base d'un CV inférieur à 15 %.
- 8.1.2. *Étalonnage*
- 8.1.2.1. *Étalonnage avec courbe étalon*
- Les teneurs dans les échantillons peuvent être estimées par comparaison de la réponse à l'essai avec une courbe d'étalonnage de la TCDD (ou du PCB 126 ou d'un mélange type de PCDD/PCDF/PCB de type dioxine) pour calculer la valeur BEQ dans l'extrait et, par la suite, dans l'échantillon.

- Les courbes d'étalonnage contiennent huit à douze concentrations (au moins en double), la concentration dans la partie inférieure de la courbe (plage de travail) devant être suffisante. Une attention particulière est accordée à la qualité de l'ajustement de la courbe dans la plage de travail. La valeur R^2 a peu ou n'a pas de valeur en tant que telle pour l'appréciation de la justesse de l'ajustement en régression non linéaire. La réduction de l'écart entre les valeurs calculées et les valeurs observées dans la plage de travail de la courbe améliorera l'ajustement (la réduction de la somme des résidus au carré, par exemple).
- Le niveau estimatif dans l'extrait d'échantillon est ensuite corrigé de la valeur BEQ calculée pour un échantillon blanc de matrice/de solvant (pour tenir compte des impuretés provenant des solvants et substances chimiques utilisés) et du taux de récupération apparent (calculé à partir de la valeur BEQ d'échantillons de référence adéquats avec des profils de congénères représentatifs proches du niveau considéré). Pour la correction par le taux de récupération, le taux de récupération apparent doit se situer dans les limites de la plage requise (voir point 8.1.4). Les échantillons de référence utilisés pour corriger du taux de récupération doivent respecter les prescriptions énoncées au point 8.2.

8.1.2.2. *Étalonnage avec des échantillons de référence*

Une autre solution consiste à utiliser une courbe d'étalonnage élaborée à partir d'au moins quatre échantillons de référence (voir point 8.2.4: une matrice blanche et trois échantillons de référence à 0,5 fois, 1,0 fois et 2,0 fois le niveau considéré) proches du niveau considéré, ce qui permet de se passer de la correction par le blanc et le taux de récupération. Dans ce cas, la réponse à l'essai correspondant aux deux tiers de la teneur maximale (voir point 8.3) peut être calculée directement à partir de ces échantillons et servir de valeur seuil. Pour la vérification des échantillons dépassant les seuils d'intervention, la valeur seuil pourrait être un pourcentage approprié de ces seuils d'intervention.

8.1.3. Dosage distinct des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine

Les extraits peuvent être séparés en fractions contenant des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine, permettant une indication distincte des teneurs en PCDD/PCDF et en PCB de type dioxine (en BEQ). Il convient d'utiliser de préférence une courbe d'étalonnage du PCB 126 pour évaluer les résultats de la fraction contenant les PCB de type dioxine.

8.1.4. Taux de récupération apparents du bioessai

Le "taux de récupération apparent du bioessai" est calculé à partir d'échantillons de référence appropriés avec des profils de congénères représentatifs qui sont proches du niveau considéré et est exprimé en pourcentage de la valeur BEQ par rapport à la valeur TEQ. En fonction du type de bioessai et des TEF (*****) utilisés, les écarts entre les facteurs TEF et REP pour les PCB de type dioxine peuvent entraîner des taux de récupération apparents faibles pour les PCB de type dioxine par rapport aux PCDD/PCDF. Par conséquent, en cas de dosage distinct des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine, les taux de récupération apparents du bioessai doivent être de 25 à 60 % pour les PCB de type dioxine et de 50 à 130 % pour les PCDD/PCDF (les plages s'appliquent pour la courbe d'étalonnage de la TCDD). Comme la contribution des PCB de type dioxine à la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine peut varier en fonction des matrices et des échantillons, les taux de récupération apparents du bioessai pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine reflètent ces plages et doivent se situer entre 30 et 130 %. Toute modification substantielle des valeurs TEF aux fins de la législation de l'Union relative aux PCDD/PCDF et aux PCB de type dioxine requiert la révision de ces plages.

(*****) Les prescriptions actuelles sont fondées sur les TEF publiés dans *Toxicol Sci* 93(2), M. Van den Berg et al, p. 223 à 241 (2006).

8.1.5. Contrôle des taux de récupération de la purification

La perte de composés durant la purification est vérifiée durant la validation. Un échantillon blanc enrichi d'un mélange des différents congénères fait l'objet d'une purification ($n = 3$ au moins) et la récupération et la variabilité doivent être vérifiées à l'aide d'une analyse par CG/SMHR. Le taux de récupération doit se situer entre 60 et 120 %, surtout pour les congénères contribuant à hauteur de plus de 10 % à la valeur TEQ dans différents mélanges.

8.1.6. Seuil d'inscription

S'agissant de l'inscription des valeurs BEQ dans un rapport, un seuil d'inscription est déterminé à partir des échantillons de matrice considérés associant des profils de congénères types, mais pas à partir de la courbe d'étalonnage des étalons, la précision de la plage inférieure de la courbe n'étant pas suffisante. Les effets de l'extraction et de la purification doivent être pris en compte. Le seuil d'inscription doit être établi à un niveau supérieur d'un facteur de trois au moins aux blancs de procédure.

8.2. *Utilisation d'échantillons de référence*

8.2.1. Les échantillons de référence représentent la matrice de prélèvement, les profils de congénères et les plages de concentration des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine proches du niveau considéré.

8.2.2. Chaque série d'essais doit comporter une matrice blanche ou, à défaut, un blanc de procédure, et un échantillon de référence au niveau considéré. Ces échantillons doivent être extraits et analysés au même moment et dans les mêmes conditions. La réponse de l'échantillon de référence doit être nettement plus élevée que celle de l'échantillon blanc, garantissant ainsi la validité de l'essai. Ces échantillons peuvent être utilisés pour corriger du blanc et du taux de récupération.

8.2.3. Les échantillons de référence choisis pour corriger du taux de récupération sont représentatifs des échantillons de l'essai, ce qui signifie que les profils de congénères ne peuvent pas conduire à une surestimation des teneurs.

8.2.4. Des échantillons de référence supplémentaires, d'une concentration égale à 0,5 fois et 2 fois le niveau considéré, par exemple, peuvent être inclus pour démontrer l'efficacité de l'essai dans la plage pertinente pour le contrôle du niveau considéré. Agrégés, ces échantillons peuvent servir au calcul des valeurs BEQ dans les échantillons d'essai (point 8.1.2.2).

8.3. Détermination de valeurs seuil

Le lien entre les résultats de bioanalyse en BEQ et les résultats de la CG/SMHR en TEQ doit être établi, par exemple par des expériences d'étalonnage avec adaptation matricielle, à l'aide d'échantillons de référence enrichis pour atteindre 0, 0,5 fois, 1 fois et 2 fois la teneur maximale, avec six répétitions sur chaque teneur ($n = 24$). Les facteurs de correction (blanc et taux de récupération) peuvent être estimés à partir de ce lien mais doivent être contrôlés conformément au point 8.2.2.

Des valeurs seuil sont établies pour déterminer la conformité de l'échantillon avec les teneurs maximales ou pour vérifier que les seuils d'intervention, s'ils sont considérés, sont conformes aux niveaux considérés respectifs établis pour les PCDD/PCDF ou pour les PCB de type dioxine pris isolément, ou pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine. Elles sont représentées par l'extrémité *inférieure* de la répartition des résultats de bioanalyse (corrigés du blanc et du taux de récupération) correspondant à la limite de décision de la CG/SMHR fondée sur un niveau de confiance de 95 %, soit un taux de faux conformes inférieur à 5 %, et sur un RSD_R inférieur à 25 %. La limite de décision de la CG/SMHR est la teneur maximale, compte tenu de l'incertitude de mesure.

La valeur seuil (en BEQ) peut être calculée selon l'une des formules énoncées aux points 8.3.1, 8.3.2 et 8.3.3 (voir graphique 1).

8.3.1. Utilisation de la plage *inférieure* de l'intervalle de prédiction de 95 % à la limite de décision de la CG/SMHR:

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

BEQ_{DL} BEQ correspondant à la limite de décision de la CG/SMHR, soit la teneur maximale compte tenu de l'incertitude de mesure

$s_{y,x}$ Écart type résiduel

$t_{\alpha, f=m-2}$ Facteur de Student ($\alpha = 5\%$, $f = \text{degrés de liberté, unilatéral}$)

m Nombre total de points d'étalonnage (indice j)

n Nombre de répétitions à chaque niveau

x_i Concentration dans l'échantillon de la CG/SMHR (en TEQ) du point d'étalonnage i

\bar{x} Concentration moyenne (en TEQ) de tous les échantillons d'étalonnage

$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2$ Paramètre de la somme des carrés, $i = \text{indice pour le point d'étalonnage } i$

8.3.2. Calcul à partir des résultats de bioanalyse (corrigés du blanc et du taux de récupération) de multiples analyses d'échantillons ($n \geq 6$) contaminés à hauteur de la limite de décision de la CG/SMHR, en tant qu'extrémité *inférieure* de la répartition des données à la valeur BEQ moyenne correspondante:

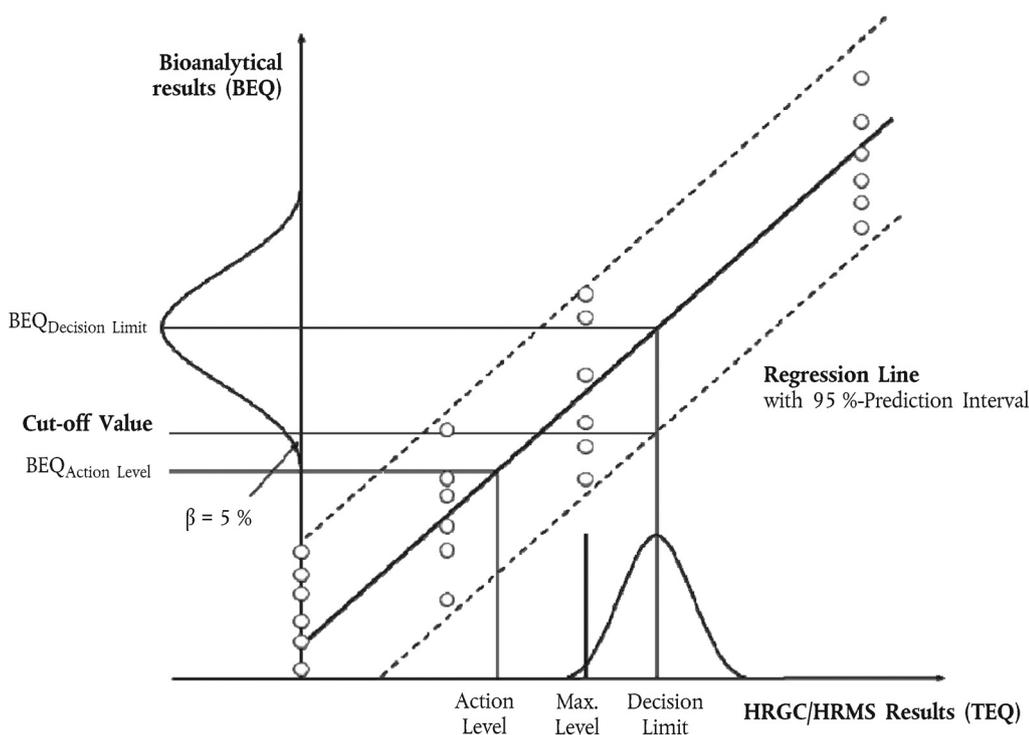
$$\text{Valeur seuil} = \text{BEQ}_{DL} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

où:

SD_R Écart type des résultats de bioanalyse à la BEQ_{DL} , mesuré dans des conditions de reproductibilité intralaboratoire

8.3.3. Mesure en tant que valeur moyenne des résultats de bioanalyse (en BEQ, corrigée du blanc et du taux de récupération) à partir de l'analyse multiple d'échantillons ($n \geq 6$) contaminés aux deux tiers du niveau considéré, sachant que ce niveau sera proche de la valeur seuil déterminée conformément au point 8.3.1 ou 8.3.2:

Graphique 1



Calcul des valeurs seuil sur la base d'un niveau de confiance de 95 %, soit un taux de faux conformes inférieur à 5 %, et d'un RSD_R inférieur à 25 %: 1) à partir de la plage inférieure de l'intervalle de prédiction de 95 % à la limite de décision de la CGHR/SMHR, 2) à partir de l'analyse multiple d'échantillons ($n \geq 6$) contaminés à hauteur de la limite de décision de la CGHR/SMHR en tant qu'extrémité inférieure de la répartition des données (représentée dans le graphique par une courbe en cloche) à la valeur BEQ moyenne correspondante.

8.3.4. Restriction aux valeurs seuil

Les valeurs seuil fondées sur la valeur BEQ calculées à partir du RSD_R atteint durant la validation à l'aide d'un nombre limité d'échantillons de matrices/profils de congénères différents peuvent être supérieures aux niveaux considérés fondés sur la valeur TEQ en raison d'une plus grande précision que celle qu'il est possible d'atteindre dans les analyses de routine lorsqu'un spectre inconnu de profils de congénères possibles doit être contrôlé. Dans de tels cas, les valeurs seuil sont calculées à partir d'un RSD_R égal à 25 %, ou, de préférence, aux deux tiers du niveau considéré.

8.4. Caractéristiques de performances

- 8.4.1. Des tests de répétabilité des méthodes de bioanalyse sont effectués pour obtenir des données sur l'écart type au sein des séries d'essais et entre elles. La répétabilité doit être inférieure à 20 % et la reproductibilité intralaboratoire, inférieure à 25 %. Ce calcul doit être fondé sur les valeurs calculées en BEQ après correction par le blanc et le taux de récupération.
- 8.4.2. Dans le cadre de la procédure de validation, l'essai doit permettre de distinguer un échantillon blanc d'une teneur à la valeur seuil, permettant ainsi l'identification des échantillons au-dessus de la valeur seuil correspondante (voir point 8.1.2).
- 8.4.3. Les composés cibles, les interférences potentielles et les valeurs maximales tolérées pour le blanc sont définis.
- 8.4.4. L'écart type relatif de la concentration calculée à partir des réponses (possible uniquement dans la plage de travail) d'un triple dosage d'un extrait d'échantillon ne peut être supérieur à 15 %.
- 8.4.5. Les résultats non corrigés de l'échantillon ou des échantillons de référence exprimés en BEQ (blanc et niveau considéré) sont utilisés pour évaluer les performances de la méthode de bioanalyse dans un intervalle de temps constant.
- 8.4.6. Il convient de réaliser et de vérifier des cartes de contrôle qualité pour les blancs de procédure et chaque type d'échantillon de référence afin de s'assurer que la performance analytique est conforme aux prescriptions, notamment pour les blancs de procédure en ce qui concerne la différence minimale requise par rapport à l'extrémité inférieure de la plage de travail et pour les échantillons de référence en ce qui concerne la reproductibilité intralaboratoire. Les blancs de procédure doivent être bien contrôlés en vue d'éviter les faux conformes lorsqu'ils sont retranchés.

- 8.4.7. Les résultats des analyses par CG/SMHR d'échantillons suspects et de 2 à 10 % des échantillons conformes (minimum de vingt échantillons par matrice) sont collectés et utilisés pour l'évaluation des performances de la méthode de dépistage et du lien entre les valeurs BEQ et TEQ. Cette base de données peut être utilisée aux fins de la réévaluation des valeurs seuil applicables aux échantillons de routine pour les matrices validées.
- 8.4.8. Les bonnes performances des méthodes peuvent également être démontrées à l'aide d'essais interlaboratoire. Les résultats des échantillons analysés dans des essais interlaboratoire, couvrant une concentration jusqu'à deux fois la teneur maximale, par exemple, peuvent également faire partie de l'évaluation du taux de faux conformes, si un laboratoire est en mesure de démontrer ses bonnes performances. Les échantillons couvrent les profils de congénères les plus fréquents, représentant différences sources.
- 8.4.9. Durant les cas de crise, les valeurs seuil peuvent être réévaluées, reflétant mieux la matrice et les profils de congénères particuliers de ce cas précis.
- 9. Inscription des résultats dans un rapport**
- 9.1. *Méthodes de confirmation*
- 9.1.1. Dans la mesure où le procédé d'analyse utilisé le permet, les résultats d'analyse comprennent les teneurs en congénères individuels des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine et sont indiqués en estimation inférieure, estimation supérieure et estimation intermédiaire, afin que soit consigné un maximum de données, ce qui permet une interprétation des résultats en fonction de prescriptions spécifiques.
- 9.1.2. Le rapport mentionne également la méthode utilisée pour extraire les PCDD/PCDF, les PCB de type dioxine et les graisses.
- 9.1.3. Les taux de récupération des étalons internes individuels doivent être fournis s'ils se situent en dehors de la plage mentionnée au point 7.2.5 ou si la teneur maximale est dépassée. Dans tous les autres cas, ils doivent être fournis sur demande.
- 9.1.4. L'incertitude de mesure doit également être mentionnée, car ce paramètre est pris en compte lorsqu'il s'agit de déterminer la conformité d'un échantillon. Par conséquent, les résultats de l'analyse sont consignés sous la forme $x \pm U$, où x est le résultat de l'analyse et U l'incertitude de mesure élargie calculée au moyen d'un facteur d'élargissement de 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %. En cas de dosage distinct des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine, la somme des estimations de l'incertitude élargie des résultats d'analyse distincts concernant les PCDD/PCDF et les PCB de type dioxine doit être utilisée pour la somme des PCDD/PCDF et des PCB de type dioxine.
- 9.1.5. Si l'incertitude de mesure est prise en considération au moyen de la CC α (conformément au point 2.2), ce paramètre est inscrit dans le rapport.
- 9.1.6. Les résultats sont exprimés dans les mêmes unités et par au moins le même nombre de chiffres significatifs que les teneurs maximales établies dans la directive 2002/32/CE.
- 9.2. *Méthodes bioanalytiques de dépistage*
- 9.2.1. Le dépistage livre un résultat exprimé en tant que "conforme" ou "suspecté d'être non conforme" ("suspect").
- 9.2.2. Il peut aussi livrer un résultat pour les PCDD/PCDF et/ou les PCB de type dioxine exprimé en BEQ, et non en TEQ.
- 9.2.3. Si l'incertitude de mesure de la valeur BEQ calculée est donnée, en tant qu'écart type par exemple, elle doit être fondée sur une triple analyse au moins de l'échantillon, incluant l'extraction, la purification et la détermination de la réponse à l'essai.
- 9.2.4. Les échantillons dont la réponse est au-dessous du seuil d'inscription sont indiqués comme étant "sous le seuil d'inscription".
- 9.2.5. Pour chaque type de matrice de prélèvement, le rapport mentionne le niveau considéré sur lequel repose l'évaluation.
- 9.2.6. Le rapport mentionne le type d'essai appliqué, le principe de base de l'essai et le type d'étalonnage.
- 9.2.7. Le rapport mentionne également la méthode utilisée pour extraire les PCDD/PCDF, les PCB de type dioxine et les graisses.

CHAPITRE III

Préparation des échantillons et prescriptions applicables aux méthodes d'analyse à utiliser pour le contrôle officiel des teneurs en PCB autres que ceux de type dioxine (PCB # 28, 52, 101, 138, 153 et 180)

1. Méthodes de détection applicables

Chromatographie en phase gazeuse/détection à capture d'électrons (CG/DCE), CG/SMBR, CG/SM-SM, CG/SMHR ou méthodes équivalentes.

2. Identification et confirmation des analytes considérés

- 2.1. Temps de rétention relatif par rapport aux étalons internes ou aux étalons de référence (écart admissible de +/- 0,25 %).
- 2.2. Séparation par chromatographie en phase gazeuse des six PCB indicateurs (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 et PCB 180) des substances interférentes, surtout les PCB coélués, notamment si les teneurs des échantillons sont dans les limites légales et la non-conformité doit être confirmée.

Note: les congénères qui coéluent souvent sont, par exemple, les PCB 28/31, les PCB 52/69 et les PCB 138/163/164. Pour la CG/SM, il convient de tenir compte aussi des interférences possibles de fragments de congénères plus fortement chlorés.

2.3. Prescriptions applicables aux techniques de CG/SM

Mesure d'au moins:

- a) deux ions spécifiques pour la SMHR;
- b) deux ions spécifiques d'un $m/z > 200$ ou trois ions spécifiques d'un $m/z > 100$ pour la SMBR;
- c) un précurseur et deux ions produits pour la SM-SM.

Tolérances maximales admises applicables aux rapports isotopiques des fragments de masse sélectionnés:

Écart relatif entre le rapport de l'ion cible (l'ion recherché le plus abondant) et l'ion qualificateur (2^e ion recherché), et le rapport théorique de ces ions ou celui déterminé grâce à un standard d'étalonnage:

Intensité relative du ou des ions qualificateurs par rapport à l'ion cible	CG-IE-SM (écart relatif)	CG-IC-SM, CG-SM ^a (écart relatif)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
De > 20 % à 50 %	± 15 %	± 25 %
De > 10 % à 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 % (*)	± 50 % (*)

(*) Le nombre de fragments de masse dont l'intensité relative est supérieure à 10 % étant suffisant, il est préférable de ne pas utiliser d'ion(s) qualificateur(s) d'une intensité relative inférieure à 10 % par rapport à l'ion cible.

2.4. Prescriptions applicables aux techniques de CG/DCE

Les résultats dépassant la tolérance sont confirmés avec deux colonnes de CG présentant des phases stationnaires de polarité différente.

3. Démonstration des performances de la méthode

Les performances de la méthode sont validées dans la plage autour du niveau considéré (0,5 à 2 fois le niveau considéré) avec un coefficient de variation acceptable pour les analyses répétées (voir prescriptions relatives à la précision intermédiaire au point 8).

4. Limite de quantification

Les valeurs de blanc ne peuvent être supérieures à 30 % du niveau de contamination correspondant à la teneur maximale (*****).

(*****) Il est fortement recommandé d'avoir une contribution de la valeur de blanc de réactif inférieure à la teneur en un contaminant d'un échantillon. Il incombe au laboratoire de contrôler la variation des valeurs de blanc, notamment si ces valeurs sont soustraites.

5. Contrôle qualité

Essais à blanc, analyse d'échantillons enrichis, échantillons servant de contrôle, participation à des essais inter-laboratoire sur les matrices pertinentes à intervalles réguliers.

6. Mesure des taux de récupération

- 6.1. Des étalons internes appropriés avec des propriétés physico-chimiques comparables à celles des analytes considérés sont utilisés.
- 6.2. Ajout d'étalons internes
Ajouts dans les échantillons (avant l'extraction et la purification).
- 6.3. Prescriptions applicables aux méthodes recourant aux six congénères indicateurs des PCB marqués d'un isotope:
- les résultats sont corrigés des taux de récupération des étalons internes;
 - les taux de récupération des étalons internes marqués d'un isotope se situent entre 50 et 120 %;
 - les taux de récupération inférieurs ou supérieurs pour les congénères individuels avec une contribution à la somme des six PCB indicateurs inférieure à 10 % sont acceptables.
- 6.4. Prescriptions applicables aux méthodes ne recourant pas à l'ensemble des six étalons internes marqués d'un isotope ou recourant à d'autres étalons internes:
- le taux de récupération du ou des étalons internes est mesuré pour chaque échantillon;
 - les taux de récupération du ou des étalons internes se situent entre 60 et 120 %;
 - les résultats sont corrigés des taux de récupération des étalons internes.
- 6.5. Les taux de récupération des congénères non marqués sont vérifiés à l'aide d'échantillons enrichis ou d'échantillons de contrôle qualité présentant des concentrations de l'ordre du niveau considéré. Les taux de récupération pour ces congénères sont réputés acceptables s'ils se situent entre 70 et 120 %.

7. Prescriptions applicables aux laboratoires

Conformément aux dispositions du règlement (CE) n° 882/2004, les laboratoires sont agréés par un organisme habilité qui se conforme au guide ISO 58, de manière à garantir qu'ils appliquent les procédures d'assurance qualité à leurs analyses. Les laboratoires sont agréés selon la norme ISO/CEI 17025.

8. Caractéristiques de performances: critères pour la somme des six PCB indicateurs au niveau considéré

Justesse	De - 30 à + 30 %
Précision intermédiaire (RSD%)	≤ 20 %
Différence entre l'estimation supérieure et l'estimation inférieure	≤ 20 %

9. Inscription des résultats dans un rapport

- 9.1. Dans la mesure où le procédé d'analyse utilisé le permet, les résultats d'analyse comprennent les teneurs en congénères individuels des PCB et sont indiqués en estimation inférieure, estimation supérieure et estimation intermédiaire, afin que soit consigné un maximum de données, ce qui permet une interprétation des résultats en fonction de prescriptions spécifiques.
- 9.2. Le rapport mentionne également la méthode utilisée pour extraire les PCB et les graisses.
- 9.3. Les taux de récupération des étalons internes individuels doivent être fournis s'ils se situent en dehors de la plage mentionnée au point 6 ou si la teneur maximale est dépassée. Dans tous les autres cas, ils doivent être fournis sur demande.
- 9.4. L'incertitude de mesure doit également être inscrite dans le rapport, car ce paramètre est pris en compte lorsqu'il s'agit de déterminer la conformité d'un échantillon. Par conséquent, les résultats de l'analyse sont consignés sous la forme $x \pm U$, où x est le résultat de l'analyse et U l'incertitude de mesure élargie calculée au moyen d'un facteur d'élargissement de 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %.
- 9.5. Si l'incertitude de mesure est prise en considération au moyen de la CCa (conformément au point 2.1 du chapitre I), ce paramètre est inscrit dans le rapport.
- 9.6. Les résultats sont exprimés dans les mêmes unités et par au moins le même nombre de chiffres significatifs que les teneurs maximales établies dans la directive 2002/32/CE.»