

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 519/2014**ze dne 16. května 2014,****kterým se mění nařízení (ES) č. 401/2006, pokud jde o metody odběru vzorků z velkých šarží, koření a doplňků stravy, výkonnostní kritéria pro T-2 toxin, HT-2 toxin a citrinin a o screeningové metody analýzy****(Text s významem pro EHP)**

EVROPSKÁ KOMISE,

s ohledem na Smlouvu o fungování Evropské unie,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 ze dne 29. dubna 2004 o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat ⁽¹⁾, a zejména na čl. 11 odst. 4 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ⁽²⁾ stanoví maximální limity některých mykotoxinů v určitých potravinách.
- (2) Odběr vzorků má rozhodující vliv na přesnost stanovení množství mykotoxinů, které jsou v šarži rozloženy nestejně. Proto je nezbytné stanovit kritéria, jež by měla metoda odběru vzorků splňovat.
- (3) Nařízení Komise (ES) č. 401/2006 ⁽³⁾ stanoví kritéria odběru vzorků pro kontrolu množství mykotoxinů.
- (4) Je nezbytné upravit pravidla pro odběr vzorků koření, aby byly zohledněny rozdíly ve velikosti částic, jež způsobují nestejně rozložení kontaminace mykotoxiny v koření. Dále je vhodné stanovit pravidla pro odběr vzorků z velkých šarží s cílem zajistit jednotný postup při uplatňování předpisů v celé Unii. Rovněž je vhodné objasnit, jaká metoda odběru vzorků se použije pro odběr vzorků jablečné šťávy.
- (5) Výkonnostní kritéria pro T-2 a HT-2 toxin je třeba aktualizovat, aby se zohlednil vědecký a technický pokrok. Je třeba stanovit výkonnostní kritéria pro citrinin vzhledem k maximálnímu limitu pro citrinin v doplňcích stravy stanovenému na bázi rýže fermentované červenými kvasnicemi *Monascus purpureus*.
- (6) Pro analýzu mykotoxinů se stále více používají screeningové metody. Je vhodné stanovit, jaká kritéria musí screeningové metody splňovat, aby mohly být použity k regulačním účelům.
- (7) Opatření stanovená tímto nařízením jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Nařízení (ES) č. 401/2006 se mění takto:

1) Příloha I se mění takto:

a) V části B se poznámka pod čarou 1 nahrazuje tímto:

„(1) Odběr vzorků z těchto šarží se provádí v souladu s pravidly stanovenými v části L. Pokyny pro odběr vzorků z velkých šarží budou uvedeny v návodu k postupu, který bude k dispozici na internetové stránce: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>”⁽¹⁾ Úř. věst. L 165, 30.4.2004, s. 1.⁽²⁾ Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách (Úř. věst. L 364, 20.12.2006, s. 5).⁽³⁾ Nařízení Komise (ES) č. 401/2006 ze dne 23. února 2006, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu množství mykotoxinů v potravinách (Úř. věst. L 70, 9.3.2006, s. 12).

Uplatňování pravidel pro odběr vzorků v souladu s normou EN ISO 24333:2009 nebo pravidly pro odběr vzorků GAFTA 124, jež používají provozovatelé potravinářských podniků v zájmu dodržování právních předpisů, je rovnocenné s pravidly pro odběr vzorků stanovenými v části L.

Při odběru vzorků z šarží na výskyt fusariových toxinů je uplatňování pravidel pro odběr vzorků v souladu s normou EN ISO 24333:2009 nebo pravidly pro odběr vzorků GAFTA 124, jež používají provozovatelé potravinářských podniků v zájmu dodržování právních předpisů, rovnocenné s pravidly pro odběr vzorků stanovenými v části B.“

b) V části B.2 se tabulka 1 nahrazuje tímto:

„Tabulka 1

Rozdělení šarží na dílčí šarže v závislosti na produktu a hmotnosti šarže

Komodita	Hmotnost šarže (tuny)	Hmotnost nebo počet dílčích šarží	Počet dílčích vzorků	Hmotnost souhrnného vzorku (kg)
Obiloviny a výrobky z obilovin	> 300 a < 1 500	3 dílčí šarže	100	10
	≥ 50 a ≤ 300	100 tun	100	10
	< 50	—	3 – 100 (*)	1 – 10 (*)

(*) Závisí na hmotnosti šarže – viz tabulka 2.“

c) V části B.3 se na konec první odrážky doplňuje nová věta, která zní:

„Pro šarže > 500 tun je počet dílčích vzorků stanoven v části L.2 přílohy I.“;

d) V části D.2 se za první větu doplňuje nová věta, která zní:

„Tato metoda odběru vzorků se rovněž použije pro úřední kontrolu maximálních množství stanovených pro ochratoxin A, aflatoxin B1 a celkový obsah aflatoxinů v kořeni s relativně velkou velikostí částic (velikostí částic srovnatelnou s jádry podzemnice olejné nebo větší, například muškátový oříšek).“

e) V části E se první věta nahrazuje tímto:

„Tato metoda odběru vzorků se rovněž použije pro úřední kontrolu maximálních množství stanovených pro ochratoxin A, aflatoxin B1 a celkový obsah aflatoxinů v kořeni s výjimkou kořeni s relativně velkou velikostí částic (nestejně rozložení kontaminace mykotoxiny).“

f) V části I se nadpis a první věta nahrazují tímto:

„I. METODA ODBĚRU VZORKŮ U PEVNÝCH VÝROBKŮ Z JABLEK

Tato metoda odběru vzorků se použije pro úřední kontrolu maximálních množství stanovených pro patulin v pevných výrobcích z jablek včetně pevných výrobků z jablek určených pro kojence a malé děti.“

g) V části I.1 druhém pododstavci se zrušují tyto věty:

„V případě tekutých výrobků se šarže těsně před odběrem vzorků co nejdůkladněji manuálně či strojně zamíchá. V tom případě můžeme rozložení patulinu v dané šarži považovat za rovnoměrné. Proto je pro vytvoření souhrnného vzorku dostačující odběr tří dílčích vzorků ze šarže.“

h) Doplňují se nové části L a M, jak je stanoveno v příloze I tohoto nařízení.

2. V příloze II se body 4.2 „Obecné požadavky“, 4.3 „Zvláštní požadavky“ a 4.4 „Odhad nejistoty měření, výpočet výtě-žnosti a uvádění výsledků“ nahrazují zněním uvedeným v příloze II tohoto nařízení.

Článek 2

Toto nařízení vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Použije se ode dne 1. července 2014.

Toto nařízení je závazné v celém rozsahu a přímo použitelné ve všech členských státech.

V Bruselu dne 16. května 2014.

Za Komisi

předseda

José Manuel BARROSO

PŘÍLOHA I

„L. METODA ODBĚRU VZORKŮ PRO VELMI VELKÉ ŠARŽE NEBO ŠARŽE SKLADOVANÉ NEBO PŘEPRAVOVANÉ TAK, ŽE ODBĚR VZORKŮ V CELÉ ŠARŽI NENÍ PROVEDITELNÝ

L.1 **Obecné zásady**

V případě, že způsob přepravy nebo skladování šarže neumožňuje odběr dílčích vzorků z celé šarže, měl by se odběr z těchto šarží pokud možno provádět, když je šarže v pohybu (dynamický odběr vzorků).

V případě velkých skladů určených ke skladování potravin by měli být provozovatelé nabádáni, aby do skladu instalovali zařízení, které umožní (automatický) odběr vzorků z celé skladované šarže.

V případě uplatňování postupů odběru vzorků, jak jsou stanoveny v této části L, by měl být o postupu odběru vzorků informován provozovatel potravinářského podniku nebo jeho zástupce. Pokud provozovatel potravinářského podniku nebo jeho zástupce postup odběru vzorků zpochybní, umožní provozovatel potravinářského podniku nebo jeho zástupce příslušnému orgánu odběr vzorků z celé šarže na své vlastní náklady.

Je možné provést odběr vzorků u části šarže pod podmínkou, že vzorkované množství činí nejméně 10 % šarže, z níž mají být odebrány vzorky. V případě, že se vzorky odebírají z části šarže potravin stejné třídy nebo popisu a že bylo zjištěno, že tato část šarže nesplňuje požadavky Unie, předpokládá se, že celá šarže vykazuje stejné vlastnosti, pokud další důkladné šetření neprokáže, že neexistují důkazy o tom, že zbytek šarže je nevhovující.

Pro odběr vzorků z velmi velkých šarží či z šarží skladovaných nebo přepravovaných tak, že odběr vzorků v celé šarži není proveditelný, jsou použitelná příslušná ustanovení jiných částí této přílohy, např. ohledně hmotnosti dílčího vzorku.

L.2 **Počet dílčích vzorků, které mají být odebrány z velmi velkých šarží**

V případě velkých vzorkovaných partií (vzorkované partie > 500 tun) se počet dílčích vzorků, které mají být odebrány, rovná součtu 100 dílčích vzorků + $\sqrt{}$ tun. Avšak v případě, že šarže má méně než 1500 tun a lze ji rozdělit na dílčí šarže dle tabulky 1 části B, a pokud lze dílčí šarže fyzicky oddělit, musí být odebrán počet dílčích vzorků stanovený v části B.

L.3 **Velké šarže přepravované lodí**

L.3.1 *Dynamický odběr vzorků z velkých šarží přepravovaných lodí*

Odběr vzorků z velkých šarží na lodích se přednostně provádí, když je produkt v pohybu (dynamický odběr vzorků).

Odběr vzorků se provádí po nákladových prostorech (jednotka, kterou lze fyzicky oddělit). Nákladové prostory se však částečně jeden po druhém vyprazdňují, takže počáteční fyzické oddělení po přesunu do skladovacího zařízení již neexistuje. Odběr vzorků lze proto provádět na základě počátečního fyzického oddělení nebo na základě oddělení po přesunu do skladovacího zařízení.

Vykládka lodí může trvat několik dní. Odběr vzorků musí být za běžných okolností prováděn v pravidelných intervalech po celou dobu trvání vykládky. Přítomnost úředního inspektora za účelem odběru vzorků po celou dobu vykládky však není vždy možná nebo vhodná. Je proto možné provést odběr vzorků z části šarže (vzorkovaná partie). Počet dílčích vzorků se stanoví s přihlédnutím k velikosti vzorkované partie.

Přítomnost inspektora je nezbytná, i když se úřední vzorek odebírá automaticky. Avšak v případě, že za účelem předejití podvodu probíhá automatický odběr s předem stanovenými parametry, které nelze změnit během odběru, a že jsou dílčí vzorky odebírány do zapečetěné nádoby, je přítomnost inspektora nutná pouze na počátku odběru vzorků, dále pokaždé, kdy je nutno vyměnit nádobu se vzorky, a na konci odběru vzorků.

L.3.2 *Statický odběr vzorků z šarží přepravovaných lodí*

V případech, kdy je odběr vzorků prováděn statickým způsobem, musí se použít stejný postup jako pro shora přístupná skladovací zařízení (sila) (viz bod L.5.1).

Odběr vzorků se musí provádět na (shora) přístupné části šarže/nákladového prostoru. Počet dílčích vzorků se stanoví s přihlédnutím k velikosti vzorkované partie.

L.4 Odběr vzorků z velkých šarží uložených ve skladech

Odběr vzorků se musí provádět na přístupné části šarže. Počet dílčích vzorků se stanoví s přihlédnutím k velikosti vzorkované partie.

L.5 Odběr vzorků ze skladovacích zařízení (sila)**L.5.1 Odběr vzorků ze (snadno) shora přístupných sil**

Odběr vzorků se musí provádět na přístupné části šarže. Počet dílčích vzorků se stanoví s přihlédnutím k velikosti vzorkované partie.

L.5.2 Odběr vzorků ze shora nepřístupných sil (uzavřená sila)**L.5.2.1 Shora nepřístupná sila (uzavřená sila) o individuální velikosti > 100 tun**

Odběr vzorků potravin skladovaných v těchto silech nelze provádět statickým způsobem. V případě, že je třeba odebrat vzorky potravin v takovém silu a není možné jeho obsah přemístit, je třeba se dohodnout s provozovatelem, že je povinen informovat inspektora o tom, kdy bude silo částečně či zcela vykládáno, a umožnit mu odběr vzorků, až budou potraviny v pohybu.

L.5.2.2 Shora nepřístupná sila (uzavřená sila) o individuální velikosti < 100 tun

Odchylně od ustanovení bodu L.1 (vzorkovaná část tvoří nejméně 10 %) se při odběru postupuje tak, že se 50 až 100 kg potravin upustí do nádoby a z ní se odebere vzorek. Velikost souhrnného vzorku odpovídá celé šarži a počet dílčích vzorků se řídí množstvím potravin upuštěných ze sila do nádoby pro účely odběru vzorků.

L.6 Odběr vzorků potravin volně ložených ve velkých uzavřených kontejnerech

Vzorky z těchto šarží lze často odebírat pouze při vykládce. V některých případech není vyložení v místě dovozu nebo kontroly možné, a odběr vzorků by proto měl proběhnout ve chvíli, kdy se tyto kontejnery vykládají. Provozovatel je povinen informovat inspektora o místě a času vykládky kontejnerů.

M. METODA ODBĚRU VZORKŮ PRO DOPLŇKY STRAVY NA BÁZI RÝŽE FERMENTOVANÉ ČERVENÝMI KVASNICEMI MONASCUS PURPUREUS

Tato metoda odběru vzorků se použije pro úřední kontrolu maximálního množství stanoveného pro citrinin v doplňcích stravy na bázi rýže fermentované červenými kvasnicemi *Monascus purpureus*.

Postup odběru vzorků a velikost vzorků

Při postupu odběru vzorků se předpokládá, že doplňky stravy na bázi rýže fermentované červenými kvasnicemi *Monascus purpureus* se dodávají na trh v maloobchodních baleních obsahujících obvykle 30 až 120 kapslí/maloobchodní balení.

Velikost šarže (počet maloobchodních balení)	Počet maloobchodních balení, jež mají být odebrána jako vzorek	Velikost vzorku
1 – 50	1	Všechny kapsle
51 – 250	2	Všechny kapsle
251 – 1 000	4	Polovina kapslí z každého maloobchodního balení odebraného jako vzorek
> 1 000	4 + 1 maloobchodní balení na 1 000 maloobchodních balení, max. 25 maloobchodních balení	≤ 10 maloobchodních balení: polovina kapslí z každého maloobchodního balení > 10 maloobchodních balení: z každého maloobchodního balení se odebere stejný počet kapslí, výsledný vzorek odpovídá obsahu 5 maloobchodních balení“

PŘÍLOHA II

„4.2. **Obecné požadavky**

Konfirmační metody analýzy použité pro účely kontroly potravin musí být v souladu s ustanoveními bodů 1 a 2 přílohy III nařízení (ES) č. 882/2004.

4.3. **Zvláštní požadavky**4.3.1. *Zvláštní požadavky na konfirmační metody*

4.3.1.1. Výkonnostní kritéria

Doporučuje se, aby byly používány plně validované konfirmační metody (tj. metody pro příslušné matrice validované mezilaboratorními zkouškami), jsou-li vhodné a dostupné. Mohou být použity i jiné vhodné validované konfirmační metody (například metody interně validované na relevantních matricích z příslušné skupiny komodit), pokud splňují výkonnostní kritéria uvedená v následujících tabulkách.

Je-li to možné, zahrnuje validace interně validovaných metod certifikovaný referenční materiál.

a) Výkonnostní kritéria pro aflatoxiny

Kritérium	Rozsah koncentrací	Doporučená hodnota	Maximální povolená hodnota
Prázdné	Celý rozsah	Bezvýznamná	–
Výtěžnost – aflatoxin M1	0,01 – 0,05 µg/kg	60 až 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 až 110 %	
Výtěžnost – aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 µg/kg	50 až 120 %	
	1–10 µg/kg	70 až 110 %	
	> 10 µg/kg	80 až 110 %	
Reprodukovatelnost RSD _R	Celý rozsah	Odvozeno z Horwitzovy rovnice (*) (**)	2 × povolená hodnota vypočtená z Horwitzovy rovnice (*) (**)

Opakovatelnost RSD_r se může vypočítat jako 0,66násobek reprodukovatelnosti RSD_R při příslušné koncentraci.

Poznámka:

- Hodnoty platí jak pro B₁, tak pro sumu B₁ + B₂ + G₁ + G₂.
- Pokud má být uvedena suma jednotlivých aflatoxinů B₁ + B₂ + G₁ + G₂, musí být odezva každého z nich na analytický systém buď známá, nebo stejná.

b) Výkonnostní kritéria pro ochratoxin A

Množství µg/kg	Ochratoxin A		
	RSD _r %	RSD _R %	Výtěžnost %
< 1	≤ 40	≤ 60	50 až 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	70 až 110

c) Výkonnostní kritéria pro patulin

Množství µg/kg	Patulin		
	RSD _r %	RSD _R %	Výtěžnost %
< 20	≤ 30	≤ 40	50 až 120
20 – 50	≤ 20	≤ 30	70 až 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 až 105

d) Výkonnostní kritéria pro deoxynivalenol

Množství µg/kg	Deoxynivalenol		
	RSD _r %	RSD _R %	Výtěžnost %
> 100 – ≤ 500	≤ 20	≤ 40	60 až 110
> 500	≤ 20	≤ 40	70 až 120

e) Výkonnostní kritéria pro zearalenon

Množství µg/kg	Zearalenon		
	RSD _r %	RSD _R %	Výtěžnost %
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 až 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 až 120

f) Výkonnostní kritéria pro fumonisin B₁ a B₂ jednotlivě

Množství µg/kg	Fumonisin B ₁ a B ₂ jednotlivě		
	RSD _r %	RSD _R %	Výtěžnost %
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 až 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 až 110

g) Výkonnostní kritéria pro T-2 a HT-2 toxin jednotlivě

Množství µg/kg	T-2 a HT-2 toxin jednotlivě		
	RSD _r %	RSD _R %	Výtěžnost %
15 – 250	≤ 30	≤ 50	60 až 130
> 250	≤ 25	≤ 40	60 až 130

h) Výkonnostní kritéria pro citrinin

Množství µg/kg	Citrinin			
	RSD _r %	Doporučená hodnota RSD _R %	Maximální povolená hodnota RSD _R %	Výtěžnost %
Celý rozsah	0,66 × RSD _R	Odvozeno z Horwitzovy rovnice (*) (**)	2 × povolená hodnota vypočtená z Horwitzovy rovnice (*) (**)	70 až 120

i) Poznámky k výkonnostním kritériím pro mykotoxiny

- Detekční limity použitých metod nejsou uvedeny, protože přesnost je uvedena pro uvažované koncentrace.
- Hodnoty přesnosti jsou vypočteny z Horwitzovy rovnice, zejména z původní Horwitzovy rovnice (pro koncentrace $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$) (*) a z upravené Horwitzovy rovnice (pro koncentrace $C < 1,2 \times 10^{-7}$) (**).

(*) Horwitzova rovnice pro koncentrace $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

(Viz: W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, J.Assoc.Off.Analy.Chem., 1980, č. 63, s. 1344)

(**) Upravená Horwitzova rovnice (*) pro koncentrace $C < 1,2 \times 10^{-7}$:

$$RSD_R = 22 \%$$

(Viz: M. Thompson, Analyst, 2000, č. 125, s. 385–386)

kde:

— RSD_R je relativní směrodatná odchylka vypočtená z výsledků získaných za podmínek reprodukovatelnosti $[(sR) \times 100]$

— C je poměr koncentrací (tj. $1 = 100 \text{ g}/100 \text{ g}$, $0,001 = 1 \text{ 000 mg}/\text{kg}$).

Toto je zobecněná rovnice pro přesnost, u níž se ukázalo, že u většiny běžných metod analýzy nezáleží na analytu a matici, nýbrž pouze na koncentraci.

4.3.1.2. Přístup založený na vhodnosti pro daný účel

U interně validovaných metod může být k hodnocení jejich vhodnosti pro úřední kontrolu alternativně použit přístup založený na vhodnosti pro daný účel (***). Metody vhodné pro úřední kontrolu musí poskytovat výsledky se standardní nejistotou měření (u) menší, než je maximální standardní nejistota měření vypočtená pomocí následující rovnice:

$$Uf = \sqrt{(\text{LOD}/2)^2 + (\alpha \times C)^2}$$

kde:

- Uf je maximální standardní nejistota měření ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- LOD je mez detekce metody ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- α je konstantní číselný faktor používaný v závislosti na hodnotě C. Hodnoty, které mají být použity, jsou uvedeny v následující tabulce,
- C je příslušná koncentrace ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Jestliže metoda analýzy poskytuje výsledky s nejistotou měření menší než maximální standardní nejistota, považuje se metoda za vhodnou do stejné míry jako metoda, která splňuje výkonnostní kritéria uvedená v bodě 4.3.1.1.

Tabulka

Číselné hodnoty konstanty α závisící na uvažované koncentraci použitelné v rovnici uvedené v tomto bodě

C ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	α
≤ 50	0,2
51 – 500	0,18
501– 1 000	0,15
1 001 – 10 000	0,12
$> 10 \text{ 000}$	0,1

(***) Viz: M. Thompson a R. Wood, Accred. Qual. Assur., 2006, č. 10, s. 471–478

4.3.2. Zvláštní požadavky na semikvantitativní screeningové metody

4.3.2.1. Rozsah působnosti

Rozsah působnosti se vztahuje na bioanalytické metody založené na imunitním rozpoznávání nebo receptorem vázání (například test ELISA, měřidla, pomůcky k měření s bočním průtokem, imunosenzory) a fyzikálně-chemické metody založené na chromatografii nebo na přímé detekci hmotnostní spektrometrií (např. hmotnostní spektrometrie vnitřního prostředí). Jiné metody (např. tenkovrstvá chromatografie) nejsou vyloučeny za předpokladu, že vzniklé signály přímo souvisejí s příslušnými mykotoxiny a umožňují použít níže popsanou zásadu.

Zvláštní požadavky se vztahují na metody, u nichž je výsledek měření číselná hodnota, například (relativní) odezva z čidla měřidla, signál z LC-MS atd., a kde se uplatňují běžné statistiky.

Tyto požadavky se nevztahují na metody, které neposkytují číselné hodnoty (např. pouze linie, jež je přítomna nebo nepřítomna), u nichž jsou nutné odlišné validační přístupy. Zvláštní požadavky pro tyto metody jsou uvedeny v bodě 4.3.3.

Tento dokument popisuje postupy validace screeningových metod pomocí mezilaboratorní validace, ověření účinnosti dané metody validované pomocí mezilaboratorní zkoušky a vnitrolaboratorní validaci u screeningové metody.

4.3.2.2. Terminologie

Cílová koncentrace screeningu (screening target concentration, STC): příslušná koncentrace pro zjištění mykotoxinu ve vzorku. Pokud je cílem ověřit dodržování regulačních limitů, rovná se STC použitelné maximální úrovni. Pro jiné účely nebo v případě, že maximální úroveň není stanovena, se STC stanoví předem v laboratoři.

Screeningová metoda: metoda použitá při výběru těch vzorků s úrovní mykotoxinů, které překračují STC s danou jistotou. Pro účely screeningu mykotoxinů se za vhodnou pro daný účel považuje 95 % jistota. Výsledek screeningové analýzy je buď „negativní“, nebo „podezřelý“. Screeningové metody musí umožňovat nákladově efektivní analýzu velkého množství vzorků, čímž se zvyšuje pravděpodobnost, že se objeví nové případy vysoké expozice a ohrožení zdraví spotřebitelů. Tyto metody musí vycházet z bioanalytických metod nebo metody LC-MS či HPLC. Výsledky ze vzorků, které překračují mezní hodnotu, musí být ověřeny opakovanou úplnou analýzou původního vzorku pomocí konfirmační metody.

„Negativní vzorek“ znamená, že obsah mykotoxinu ve vzorku je s 95 % jistotou < STC (tj. existuje 5 % pravděpodobnost, že vzorky budou nesprávně hlášeny jako negativní).

„Falešně negativní vzorek“ znamená, že obsah mykotoxinu ve vzorku je > STC, ale byl označen jako negativní.

„Podezřelý vzorek“ (pozitivní screening) znamená, že vzorek překračuje mezní úroveň (viz níže) a může obsahovat mykotoxin na vyšší úrovni, než je STC. Jakýkoli podezřelý výsledek iniciuje konfirmační analýzu za účelem jednoznačné identifikace a kvantifikace mykotoxinu.

„Falešně podezřelý vzorek“ je negativní vzorek, který byl označen jako podezřelý.

„Konfirmační metody“ jsou metody, které poskytují úplné nebo doplňující informace umožňující jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci mykotoxinu na sledované úrovni.

„Mezní úroveň“: odezva, signál nebo koncentrace získaná pomocí screeningové metody, při jejímž překročení je vzorek klasifikován jako „podezřelý“. Mezní úroveň je stanovena během validace a zohledňuje variabilitu měření.

Negativní kontrolní vzorek (slepá matrice): vzorek, o kterém je známo, že neobsahuje ⁽¹⁾ mykotoxin, na nějž má být proveden screening, např. na základě předchozího určení pomocí konfirmační metody s dostatečnou citlivostí. Není-li možné slepé vzorky získat, může se použít materiál s nejnižší úrovní, kterou lze získat, umožňující-li tato úroveň konstatovat, že je tato screeningová metoda vhodná pro daný účel.

Pozitivní kontrolní vzorek: vzorek, který obsahuje mykotoxin na úrovni STC, např. certifikovaný referenční materiál, materiál se známým obsahem (např. testovací materiál z testů způsobilosti nebo materiál) jinak dostatečně charakterizovaný pomocí konfirmační metody. Při absenci takového materiálu lze použít směs vzorků s různou úrovní kontaminace nebo vnitrolaboratorně připravený a dostatečně charakterizovaný obohacený vzorek za předpokladu, že lze prokázat ověření míry kontaminace.

4.3.2.3. Postup validace

Cílem validace je prokázat vhodnost screeningové metody pro daný účel. Provádí se stanovením mezní hodnoty a míry falešně negativních a falešně podezřelých vzorků. V těchto dvou parametrech jsou obsažena kritéria účinnosti, jako je citlivost, selektivita a přesnost.

Screeningové metody mohou být validovány pomocí mezilaboratorní nebo vnitrolaboratorní validace. Pokud jsou již k dispozici údaje z mezilaboratorní validace pro určité kombinace mykotoxinů/matric/STC, je ověření účinnosti metody v laboratoři používající příslušnou metodu dostatečné.

4.3.2.3.1 Počáteční vnitrolaboratorní validace

Mykotoxiny:

Provádí se validace u každého jednotlivého mykotoxinu v rámci rozsahu zkoumání. U bioanalytických metod, jež poskytují u některých skupin mykotoxinů kombinovanou odezvu (např. aflatoxiny B₁, B₂, G₁ a G₂, fumonisin B₁ a B₂), musí být prokázána použitelnost a uvedena omezení daného testu v rámci rozsahu metody. Nežádoucí křížová reaktivita (např. DON-3-glykosid, 3- nebo 15-acetyl-DON u metod založených na imunitě pro DON) se nepovažuje za důvod zvýšení míry falešně negativních vzorků cílových mykotoxinů, ale může zvyšovat míru falešně podezřelých vzorků. Toto nežádoucí zvýšení se sníží pomocí konfirmační analýzy, která zajistí jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci mykotoxinů.

Matrice:

Počáteční validace by se měla provést pro každou komoditu, nebo pro každou skupinu komodit, je-li známo, že je daná metoda použitelná pro více komodit. V druhém případě se z uvedené skupiny vybere jedna reprezentativní a relevantní komodita (viz tabulka A).

Soubor vzorků:

Minimální počet různých vzorků požadovaných pro validaci je 20 homogenních negativních kontrolních vzorků a 20 homogenních pozitivních kontrolních vzorků, které obsahují mykotoxin na úrovni STC, analyzovaných za podmínek mezilehlé přesnosti (RSD_{Ri}) po dobu 5 různých dnů. Případně mohou být do validačního souboru přidány další soubory 20 vzorků obsahujících mykotoxin na jiných úrovních, aby se zjistilo, do jaké míry lze danou metodou rozlišovat jednotlivé koncentrace mykotoxinů.

Koncentrace:

Pro každou úroveň STC, která má být použita při běžné aplikaci, musí být provedena validace.

4.3.2.3.2 Počáteční validace prostřednictvím mezilaboratorních zkoušek

Validace pomocí mezilaboratorních zkoušek se provádí v souladu s mezinárodně uznaným protokolem o mezilaboratorních zkouškách (např. ISO 5725:1994 nebo Mezinárodní harmonizovaný protokol IUPAC), který vyžaduje, aby byly zahrnuty platné údaje z nejméně osmi různých laboratoří. Jinak je jediným rozdílem oproti vnitrolaboratorní validaci to, že ≥ 20 vzorků z každé komodity/úrovně může být rovnoměrně rozděleno mezi zúčastněné laboratoře, přičemž minimální počet je dva vzorky na laboratoř.

⁽¹⁾ Vzorky jsou považovány za vzorky bez výskytu analytu, pokud jeho množství ve vzorku nepřesahuje 1/5 STC. Pokud lze úroveň kvantifikovat konfirmační metodou, je třeba tuto úroveň zohlednit při posuzování validace.

4.3.2.4. Stanovení mezní úrovně a míry falešně podezřelých výsledků u slepých vzorků

(Relativní) odezvy u negativních kontrolních a pozitivních kontrolních vzorků se berou jako základ pro výpočet požadovaných parametrů.

Screeningové metody s odezvou úměrnou koncentraci mykotoxinu

U screeningových metod s odezvou úměrnou koncentraci mykotoxinu platí:

$$\text{Mezní hodnota} = R_{\text{STC}} - \text{hodnota } t_{0,05} * SD_{\text{STC}}$$

R_{STC} = střední hodnota odezvy u pozitivních kontrolních vzorků (na úrovni STC)

hodnota t : jednostranná hodnota t u 5 % míry falešně negativních výsledků (viz tabulka B)

SD_{STC} = standardní odchylka Screeningové metody s odezvou nepřímo úměrnou koncentraci mykotoxinu

Podobně se u screeningových metod s odezvou nepřímo úměrnou koncentraci mykotoxinu určuje mezní hodnota jako:

$$\text{Mezní hodnota} = R_{\text{STC}} + \text{hodnota } t_{0,05} * SD_{\text{STC}}$$

Pomocí této specifické hodnoty t sloužící ke stanovení mezní hodnoty je míra falešně negativních výsledků standardně stanovena na 5 %.

Hodnocení vhodnosti pro daný účel

Výsledky negativních kontrolních vzorků se použijí pro odhad odpovídající míry falešně podezřelých výsledků. Hodnota t se vypočte podle případu, kdy výsledek negativního kontrolního vzorku přesahuje mezní hodnotu, a proto se chybně klasifikuje jako podezřelý.

hodnota $t = (\text{mezní hodnota} - \text{střed}_{\text{slepý}}) / SD_{\text{slepý}}$ pro screeningové metody s odezvou úměrnou koncentraci mykotoxinu

nebo

hodnota $t = (\text{střed}_{\text{slepý}} - \text{mezní hodnota}) / SD_{\text{slepý}}$ pro screeningové metody s odezvou nepřímo úměrnou koncentraci mykotoxinu

Ze získané hodnoty t se na základě stupňů volnosti vypočítaných z určitého počtu experimentů může pravděpodobnost falešně podezřelých vzorků pro jednostrannou distribuci buď vypočítat (např. tabulková funkce 'TDIS'), nebo převzít z tabulky pro distribuci- t .

Odpovídající hodnota jednostranné distribuce t určuje míru falešně podezřelých výsledků.

Tato koncepce je popsána podrobně i s příkladem v Analytical and Bioanalytical Chemistry DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

4.3.2.5. Rozšíření rozsahu působnosti metody

4.3.2.5.1 Rozšíření rozsahu působnosti na další mykotoxiny:

Když se přidávají nové mykotoxiny do rozsahu působnosti stávající screeningové metody, musí se provést úplná validace, aby se prokázala vhodnost metody.

4.3.2.5.2 Rozšíření na další komodity:

Pokud se ví nebo předpokládá, že je screeningová metoda použitelná i na další komodity, musí se ověřit její platnost pro tyto další komodity. Patří-li nová komodita do skupiny komodit (viz tabulka A), u nichž již proběhla počáteční validace, je dostačující omezená dodatečná validace. Pro tento účel se musí analyzovat nejméně 10 homogenních negativních kontrolních vzorků a 10 homogenních pozitivních kontrolních vzorků (na úrovni STC) za podmínek mezilehlé přesnosti. Všechny pozitivní kontrolní vzorky musí přesahovat mezní hodnotu. V případě, že toto kritérium není splněno, musí se provést úplná validace.

4.3.2.6. Ověřování metod, které již byly validovány prostřednictvím mezilaboratorních zkoušek

U screeningových metod, které již byly úspěšně validovány prostřednictvím mezilaboratorních zkoušek, je třeba ověřit účinnost. K tomu se musí analyzovat nejméně 6 negativních kontrolních vzorků a 6 pozitivních kontrolních vzorků (na úrovni STC). Všechny pozitivní kontrolní vzorky musí přesahovat mezní hodnotu. V případě, že toto kritérium není splněno, laboratoř musí provést analýzu hlavních příčin, aby určila, proč nemůže splnit specifikaci získanou při mezilaboratorní zkoušce. Až po přijetí nápravných opatření musí znovu ověřit účinnost metody ve své laboratoři. Pokud laboratoř není schopna ověřit výsledky mezilaboratorní zkoušky, bude muset stanovit vlastní mezní hodnotu pomocí úplné počáteční vnitrolaboratorní validace.

4.3.2.7. Neustálé ověřování metod/průběžná validace metod

Po počáteční validaci se další údaje z validace získávají tak, že se v každé partii vzorků podrobených screeningu zahrnou alespoň dva pozitivní kontrolní vzorky. Jeden pozitivní kontrolní vzorek je známý vzorek (například vzorek použitý v počáteční validaci), druhý je jiná komodita ze stejné skupiny komodit (v případě, že se analyzuje pouze jedna komodita, použije se místo něj jiný vzorek této komodity). Zařazení negativního kontrolního vzorku je nepovinné. Výsledky získané pro tyto dva pozitivní kontrolní vzorky se přidávají do stávajícího validačního souboru.

Nejméně jednou ročně se opětovně určí mezní hodnota a znovu se posoudí platnost metody. Neustálé ověřování metod slouží několika účelům:

- ke kontrole kvality pro partii vzorků podrobených screeningu,
- k poskytování informací o spolehlivosti metody za podmínek v laboratoři, která metodu uplatňuje,
- k odůvodnění použitelnosti metody u různých komodit,
- aby bylo možné upravit mezní hodnoty v případě postupných posunů v průběhu času.

4.3.2.8. Zpráva o validaci

Zpráva o validaci musí obsahovat:

- prohlášení o STC,
- prohlášení o zjištěné mezní hodnotě,

Poznámka: Mezní hodnota musí mít stejný počet platných číslic jako STC. Číselné hodnoty použité k výpočtu mezní hodnoty musí mít alespoň o jednu platnou číslici víc než STC.

- prohlášení o vypočtené míře falešně podezřelých vzorků,
- prohlášení o tom, jak byla vygenerována míra falešně podezřelých vzorků.

Poznámka: V prohlášení o vypočtené míře falešně podezřelých vzorků se uvede, zda je metoda vhodná pro daný účel, a rovněž počet slepých vzorků (nebo vzorků s nízkou úrovní kontaminace), které budou předmětem ověřování.

Tabulka A

Skupiny komodit pro validaci screeningových testů

Skupiny komodit	Kategorie komodit	Typické reprezentativní komodity zahrnuté do dané kategorie
Vysoký obsah vody	Ovocné šťávy	Jablečná šťáva, hroznová šťáva
	Alkoholické nápoje	Víno, pivo, cider
	Kořenová a hlíznatá zelenina	Čerstvý zázvor
	Cereální nebo ovocné kaše	Kaše pro kojence a malé děti

Skupiny komodit	Kategorie komodit	Typické reprezentativní komodity zahrnuté do dané kategorie
Vysoký obsah oleje	Ořechy	Vlašské ořechy, lískové ořechy, jedlé kaštiny
	Olejnata semena a výrobky z nich	Řepka olejná, slunečnicové semeno, bavlníkové semeno, sójové boby, arašídý, sezamová semínka atd.
	Olejnate plody a výrobky z nich	Oleje a pasty (např. arašídové máslo, tahína)
Vysoký obsah škrobu a/nebo bílkovin a nízký obsah vody a tuku	Obilná zrna a výrobky z nich	Pšenice, žito, ječmen, oves Celozrnný chléb, bílý chléb, krekry, snídaňové cereálie, těstoviny
	Dietetické výrobky	Sušené prášky pro přípravu stravy pro kojence a malé děti
Vysoký obsah kyselin a vody (*)	Výrobky z citrusů	
„Náročné nebo jedinečné komodity“ (**)		Kakaové boby a výrobky z nich, kokosový ořech a výrobky z něj, káva, čaj Koření, lékořice
Vysoký obsah cukru, nízký obsah vody	Sušené ovoce	Fíky, rozinky, korintky, sultánky
Mléko a mléčné výrobky	Mléko	Kravné, kozí a buvolí mléko
	Sýry	Sýr z kravného, kozího mléka
	Mléčné výrobky (např. sušené mléko)	Jogurt, smetana

(*) Pokud se používá tlumivý roztok ke stabilizaci změn pH během extrakce, lze tuto skupinu komodit sloučit do jedné skupiny komodit „vysoký obsah vody“.

(**) „Náročné nebo jedinečné komodity“ by měly být plně validovány jen tehdy, pokud se analyzují často. Analyzují-li se jen příležitostně, může se validace omezit pouze na kontrolu oznamovacích mezí za použití obohacených slepých výtahů.

Tabulka B

Jednostranná hodnota t u 5 % míry falešně negativních vzorků

Stupně volnosti	Počet opakování	Hodnota t (5 %)
10	11	1,812
11	12	1,796
12	13	1,782
13	14	1,771
14	15	1,761
15	16	1,753
16	17	1,746
17	18	1,74
18	19	1,734

Stupně volnosti	Počet opakování	Hodnota t (5 %)
19	20	1,729
20	21	1,725
21	22	1,721
22	23	1,717
23	24	1,714
24	25	1,711
25	26	1,708
26	27	1,706
27	28	1,703
28	29	1,701
29	30	1,699
30	31	1,697
40	41	1,684
60	61	1,671
120	121	1,658
∞	∞	1,645

4.3.3. Požadavky na kvalitativní screeningové metody (metody, které neposkytují číselné hodnoty)

Různé normalizační orgány (např. AOAC, ISO) v současnosti pracují na vývoji pokynů pro validaci binárních testovacích metod. Organizace AOAC nedávno přišla s návrhem pokynů v této oblasti. Tento dokument lze považovat za obraz současného stavu techniky v této oblasti. Metody, jež poskytují výsledky v binární podobě (např. vizuální kontrola měřených zkoušek), by proto měly být validovány podle těchto pokynů.

http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/ISPAM/Qual_Chem_Guideline_Final_Approved_031412.pdf

4.4. Odhad nejistoty měření, výpočet výtěžnosti a uvádění výsledků ⁽¹⁾

4.4.1. Konfirmační metody

Výsledek analýzy se musí vyjádřit takto:

- korigovaný na výtěžnost s uvedením míry výtěžnosti. Korekce na výtěžnost není nutná v případě, že výtěžnost je v rozmezí 90–110 %;
- ve tvaru $x \pm U$, kde x je výsledek analýzy a U je rozšířená nejistota měření při použití faktoru pokrytí 2, který odpovídá hladině spolehlivosti přibližně 95 %.

Pro potraviny živočišného původu lze zohlednění nejistoty měření provést také ustanovením rozhodovací meze (CCa) v souladu s rozhodnutím Komise 2002/657/ES ⁽²⁾ (bod 3.1.2.5 přílohy I – případ látek s uvedenými nejvyššími přípustnými mezemi).

Pokud je však výsledek analýzy výrazně (> 50 %) nižší než maximální úroveň nebo výrazně vyšší než maximální úroveň (tj. více než pětikrát maximální úroveň), pokud byly dodrženy vhodné postupy kontroly kvality a pokud analýza slouží jen pro účely kontroly dodržení ustanovení právních předpisů, může být výsledek analýzy vyjádřen bez korekce na výtěžnost a v těchto případech lze údaje o výtěžnosti a o nejistotě měření vynechat.

⁽¹⁾ Více podrobností o postupech pro odhad nejistoty měření a pro posouzení výtěžnosti lze nalézt ve zprávě „Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation“ – http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf

⁽²⁾ Rozhodnutí Komise 2002/657/ES ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků (Úř. věst. L 221, 17.8.2002, s. 8).

Tato pravidla interpretace výsledků analýzy týkající se přijetí nebo odmítnutí šarže se použijí na výsledky analýzy získané ze vzorku pro úřední kontrolu. V případě analýzy pro účely obhajoby nebo rozhodčího řízení se použijí vnitrostátní předpisy.

4.4.2. *Screeningové metody*

Výsledek screeningu se vyjádří jako vyhovující nebo podezřelý jako nevyhovující.

„Podezřelý jako nevyhovující“ znamená, že vzorek překračuje mezní úroveň a může obsahovat mykotoxin na vyšší úrovni, než je STC. Jakýkoli podezřelý výsledek iniciuje konfirmační analýzu za účelem jednoznačné identifikace a kvantifikace mykotoxinu.

„Vyhovující“ znamená, že obsah mykotoxinu ve vzorku je s 95 % jistotou < STC (tj. existuje 5 % pravděpodobnost, že vzorky budou nesprávně hlášeny jako negativní). Výsledek analýzy se vyjádří jako „< úroveň STC“ a uvede se úroveň STC.“
