

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 519/2014**z dnia 16 maja 2014 r.****zmieniające rozporządzenie (WE) nr 401/2006 w odniesieniu do metody pobierania próbek z dużych partii, przypraw i suplementów żywnościowych, kryteriów skuteczności dla toksyn T-2, HT-2 i cytryniny oraz przesiewowych metod analizy****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regulami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 11 ust. 4,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1881/2006 ⁽²⁾ ustanowiono maksymalne dopuszczalne poziomy niektórych mikotoksyn w niektórych środkach spożywczych.
- (2) Pobieranie próbek ma istotne znaczenie dla precyzyjnego oznaczenia poziomów mikotoksyn, których rozmieszczenie w partii jest niejednorodne. Należy zatem określić kryteria, które powinny spełniać metody pobierania próbek.
- (3) W rozporządzeniu Komisji (WE) nr 401/2006 ⁽³⁾ ustanowiono kryteria pobierania próbek do celów kontroli poziomów mikotoksyn.
- (4) Konieczna jest zmiana zasad dotyczących pobierania próbek przypraw, aby uwzględnić zróżnicowanie w zakresie wielkości cząstek, które prowadzi do niejednorodnego rozmieszczenia zanieczyszczenia mikotoksynami w przyprawach. Ponadto należy ustanowić przepisy dotyczące pobierania próbek z dużych partii w celu zapewnienia jednolitego podejścia w zakresie egzekwowania w całej Unii. Należy również wyjaśnić, jaką metodę pobierania próbek należy stosować do celów pobierania próbek soku jabłkowego.
- (5) Należy uaktualnić kryteria skuteczności dla toksyn T-2 i HT-2 w celu uwzględnienia postępu naukowego i technologicznego. Należy ustanowić kryteria skuteczności dla cytryniny, biorąc pod uwagę maksymalny poziom ustanowiony dla cytryniny w suplementach żywnościowych na bazie ryżu poddanego fermentacji grzybami *Monascus purpureus*.
- (6) Do analizy mikotoksyn coraz częściej stosuje się metody badań przesiewowych. Do celów regulacyjnych należy ustanowić kryteria, z którymi muszą być zgodne metody przesiewowe.
- (7) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Łańcucha Żywnościowego i Zdrowia Zwierząt,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W rozporządzeniu (WE) nr 401/2006 wprowadza się następujące zmiany:

1) w załączniku I wprowadza się następujące zmiany:

a) w części B przypis 1 otrzymuje brzmienie:

„(1) Pobieranie próbek z takich partii przeprowadza się zgodnie z zasadami określonymi w części L. Wytyczne dotyczące pobierania próbek z dużych partii są określone w dokumencie dostępnym na stronie internetowej: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>

⁽¹⁾ Dz.U. L 165 z 30.4.2004, s. 1.⁽²⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (Dz.U. L 364 z 20.12.2006, s. 5).⁽³⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych (Dz.U. L 70 z 9.3.2006, s. 12).

Stosowanie zasad pobierania próbek zgodnie z normą ISO 24333:2009 lub zasadami pobierania próbek GAFTA 124 przez podmioty prowadzące przedsiębiorstwo spożywcze w celu zapewnienia zgodności z przepisami prawa jest równoważne z zasadami pobierania próbek określonymi w części L.

W odniesieniu do pobierania próbek toksyn *Fusarium* stosowanie zasad pobierania próbek zgodnie z normą ISO 24333:2009 lub zasadami pobierania próbek GAFTA 124 przez podmioty prowadzące przedsiębiorstwo spożywcze w celu zapewnienia zgodności z przepisami prawa jest równoważne z zasadami pobierania próbek określonymi w części B.”;

- b) w części B.2 tabelę 1 zastępuje się poniższą tabelą:

„Tabela 1

Dzielenie partii na podpartie w zależności od rodzaju produktu i masy partii

Rodzaj produktu	Masa partii (w tonach)	Masa lub liczba podpartii	Liczba próbek pierwotnych	Masa próbki zbiorczej (w kg)
Zboża i produkty zbożowe	> 300 i < 1 500	3 podpartie	100	10
	≥ 50 i ≤ 300	100 ton	100	10
	< 50	—	3–100 (*)	1–10

(*) W zależności od masy partii — zob. tabela 2.”;

- c) w części B.3 na końcu tiret pierwszego dodaje się zdanie w brzmieniu:

„W przypadku partii > 500 ton liczba próbek pierwotnych jest określona w części L.2 załącznika I.”;

- d) w części D.2 po pierwszym zdaniu dodaje się zdanie w brzmieniu:

„Niniejszą metodę pobierania próbek stosuje się również do celów urzędowej kontroli najwyższych dopuszczalnych poziomów ustanowionych dla ochratoksyny A, aflatoksyny B1 i sumy aflatoksyn w przyprawach o cząstkach stosunkowo dużej wielkości (wielkość cząstek porównywalna do orzeszków ziemnych lub większa np. gałka muszkatołowa).”;

- e) w części E zdanie pierwsze otrzymuje brzmienie:

„Niniejszą metodę pobierania próbek stosuje się do celów urzędowej kontroli najwyższych dopuszczalnych poziomów ustanowionych dla ochratoksyny A, aflatoksyny B1 i sumy aflatoksyn w przyprawach z wyjątkiem przypraw o cząstkach stosunkowo dużej wielkości (niejednorodne rozmieszczenie zanieczyszczenia mikotoksynami).”;

- f) w części I nagłówek i zdanie pierwsze otrzymują brzmienie:

„I. METODA POBIERANIA PRÓBEK PRODUKTÓW Z JABŁEK W POSTACI STAŁEJ

Niniejsza metoda pobierania próbek ma zastosowanie do celów urzędowej kontroli najwyższych dopuszczalnych poziomów ustanowionych dla patuliny w produktach z jabłek w postaci stałej oraz produktach z jabłek w postaci stałej dla niemowląt i małych dzieci.”;

- g) w części I.1 akapit drugi skreśla się następujące zdania:

„W przypadku produktów płynnych partia jest dokładnie mieszana w zakresie, w jakim jest to możliwe, ręcznie lub mechanicznie, bezpośrednio przed pobraniem próbek. W takim przypadku można założyć, że rozmieszczenie patuliny w danej partii jest jednorodne. A zatem w celu uzyskania próbki zbiorczej z takiej partii wystarczy pobrać trzy próbki pierwotne.”;

- h) dodaje się części L i M w brzmieniu określonym w załączniku I do niniejszego rozporządzenia;

- 2) w załączniku II pkt 4.2 „Wymagania ogólne”, pkt 4.3 „Wymagania szczególne” i pkt 4.4 „Szacowanie niepewności pomiaru, obliczanie odzysku i podawanie wyników” zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku II do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia 1 lipca 2014 r.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 16 maja 2014 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK I

„L. METODA POBIERANIA PRÓBEK W PRZYPADKU BARDZO DUŻYCH PARTII LUB PARTII SKŁADOWANYCH LUB TRANSPORTOWANYCH W SPOSÓB POWODUJĄCY, ŻE POBIERANIE PRÓBEK Z CAŁEJ PARTII NIE JEST MOŻLIWE

L.1. **Zasady ogólne**

Jeżeli sposób transportu lub składowania partii nie pozwala na pobieranie próbek pierwotnych z całej partii, próbki powinny w miarę możliwości być pobierane z partii będącej w ruchu (dynamiczne pobieranie próbek).

W przypadku dużych magazynów przeznaczonych do składowania żywności podmioty należy zachęcać do instalowania w takich magazynach sprzętu umożliwiającego (automatyczne) pobieranie próbek z całej składowanej partii.

Jeżeli stosuje się procedury pobierania próbek przewidziane w niniejszej części L, o procedurze pobierania próbek poinformować należy podmiot prowadzący przedsiębiorstwo spożywcze lub jego przedstawiciela. Jeżeli podmiot prowadzący przedsiębiorstwo spożywcze lub jego przedstawiciel kwestionują tę procedurę, umożliwiają oni właściwemu organowi pobieranie próbek w całej partii na koszt podmiotu lub jego przedstawiciela.

Pobieranie próbek z części partii jest dozwolone, pod warunkiem że wielkość objętej próbą części wynosi co najmniej 10 % partii, która ma zostać objęta próbą. Jeżeli pobrano próbki z części partii żywności tej samej klasy lub o takim samym opisie i stwierdzono, że część ta nie spełnia wymogów unijnych, domniemywa się, że dotyczy to całej partii, chyba że z dalszej szczegółowej oceny nie wynikają żadne dowody na to, że pozostała część partii jest niezadowolająca.

Odpowiednie przepisy, takie jak przepisy dotyczące masy próbki pierwotnej, zawarte w innych częściach niniejszego załącznika stosuje się do pobierania próbek w przypadku bardzo dużych partii lub partii składowanych lub transportowanych w sposób powodujący, że pobieranie próbek z całej partii nie jest możliwe.

L.2. **Liczba próbek pierwotnych, które należy pobrać w przypadku bardzo dużych partii**

W przypadku dużych objętych próbą części (> 500 ton) liczba próbek pierwotnych, które należy pobrać, wynosi 100 próbek pierwotnych + $\sqrt{\text{ton}}$. W przypadku partii mniejszej niż 1 500 ton, która może zostać podzielona na podpartie zgodnie z częścią B tabela 1, oraz pod warunkiem że podpartie te można oddzielić fizycznie, musi jednak zostać pobrana liczba próbek pierwotnych przewidziana w części B.

L.3. **Duże partie transportowane statkiem**

L.3.1. *Dynamiczne pobieranie próbek z dużych partii transportowanych statkiem*

Próbki z dużych partiach na statkach powinny być w miarę możliwości pobierane, gdy produkt jest w ruchu (dynamiczne pobieranie próbek).

Próbki pobiera się w podziale na ładownie (jednostki, które można fizycznie rozdzielić). Ładownie są jednak opróżniane częściowo jedna po drugiej, co powoduje, że początkowy podział fizyczny nie występuje po przeniesieniu do miejsca składowania. Próbkę można zatem pobierać na podstawie początkowego podziału fizycznego lub na podstawie podziału po przeniesieniu do miejsca składowania.

Rozładunek statku może trwać kilka dni. Próbkę należy zazwyczaj pobierać w regularnych odstępach czasu podczas całego rozładunku. Obecność urzędowego inspektora przy pobieraniu próbek nie zawsze jest jednak możliwa lub właściwa podczas całego rozładunku. Dlatego zezwala się na pobieranie próbek z części partii (część objęta próbą). Liczbę próbek pierwotnych określa się poprzez uwzględnienie wielkości części objętej próbą.

Nawet jeżeli urzędowa próbka jest pobierana automatycznie, obecność inspektora jest konieczna. Jeżeli próbki pobierane są jednak automatycznie według uprzednio ustalonych parametrów, których nie można zmienić w trakcie procesu pobierania próbek, zaś próbki pierwotne zbierane są do zapieczętowanego pojemnika, co wyklucza wszelką możliwość oszustwa, wówczas obecność inspektora jest wymagana tylko na początku pobierania próbek, przy każdej zmianie pojemnika na próbki i na końcu pobierania próbek.

L.3.2. *Statyczne pobieranie próbek z partii transportowanych statkiem*

W przypadkach gdy pobieranie próbek odbywa się w sposób statyczny, należy zastosować procedurę przewidzianą dla miejsc składowania (silosów) dostępnych od góry (zob. pkt L.5.1).

Próbki muszą być pobierane z dostępnej części partii/ładowni (od góry). Liczbę próbek pierwotnych określa się poprzez uwzględnienie wielkości części objętej próbą.

L.4. Pobieranie próbek z dużych partii składowanych w magazynach

Próbki muszą być pobierane z dostępnej części partii. Liczbę próbek pierwotnych określa się poprzez uwzględnienie wielkości części objętej próbą.

L.5. Pobieranie próbek z miejsc składowania (silosów)**L.5.1. Pobieranie próbek z silosów (łatwo) dostępnych od góry**

Próbki muszą być pobierane z dostępnej części partii. Liczbę próbek pierwotnych określa się poprzez uwzględnienie wielkości części objętej próbą.

L.5.2. Pobieranie próbek z silosów niedostępnych od góry (silosów zamkniętych)**L.5.2.1. Silosy niedostępne od góry (zamknięte) o wielkości > 100 ton**

Pobieranie próbek żywności składowanej w takich silosach nie może odbywać się w sposób statyczny. Jeżeli z paszy składowanej w silosie muszą zostać pobrane próbki i nie ma możliwości jej przeniesienia, należy uzgodnić z podmiotem, że poinformuje on inspektora o tym, kiedy będzie miał miejsce częściowy lub całkowity rozładunek silosu, aby umożliwić pobranie próbek żywności będącej w ruchu.

L.5.2.2. Silosy niedostępne od góry (zamknięte) o wielkości < 100 ton

W przeciwieństwie do przepisów w pkt L.1 (kontrolowana część równa co najmniej 10 %) procedura pobierania próbek polega na umieszczeniu 50–100 kg w pojemniku i pobraniu z niego próbki. Wielkość próbki zbiorczej odpowiada wielkości całej partii, a liczba próbek pierwotnych odpowiada ilości żywności pobranej z silosu do pojemnika w celu pobrania próbek.

L.6. Pobieranie próbek z żywności luzem w dużych zamkniętych pojemnikach

Próbki z takich partii mogą być pobierane jedynie po rozładunku. W niektórych przypadkach rozładunek w miejscu przywozu lub kontroli nie jest możliwy, w związku z czym próbki powinny zostać pobrane w momencie rozładunku takich pojemników. Podmiot musi poinformować inspektora o miejscu i czasie rozładunku pojemników.

M. METODA POBIERANIA PRÓBEK Z SUPLEMENTÓW ŻYWNOSCIOWYCH NA BAZIE RYŻU PODDANEGO FERMENTACJI GRZYBAMI *MONASCUS PURPUREUS*

Niniejszą metodę pobierania próbek stosuje się do celów urzędowej kontroli najwyższych dopuszczalnych poziomów ustanowionych dla cytryniny w suplementach żywnościowych na bazie ryżu poddanego fermentacji grzybami *Monascus purpureus*.

Procedura pobierania próbek i wielkość próbki

Procedura pobierania próbek opiera się na założeniu, że suplementy żywnościowe na bazie ryżu poddanego fermentacji grzybami *Monascus purpureus* są wprowadzane do obrotu w opakowaniach detalicznych zawierających zwykle po 30–120 kapsułek.

Wielkość partii (liczba opakowań detalicznych)	Liczba opakowań detalicznych, które mają zostać skontrolowane	Wielkość próbki
1–50	1	Wszystkie kapsułki
51–250	2	Wszystkie kapsułki
251–1 000	4	Z każdego objętego próbą opakowania detalicznego połowa kapsułek
> 1 000	4 + 1 opakowań detalicznych na 1 000 opakowań detalicznych, przy czym maksymalnie 25 opakowań detalicznych	≤ 10 opakowań detalicznych: z każdego opakowania detalicznego połowa kapsułek > 10 opakowań detalicznych: z każdego opakowania detalicznego pobiera się równą liczbę kapsułek, tak aby uzyskać próbkę równoważną zawartości 5 opakowań detalicznych”

ZAŁĄCZNIK II

„4.2. Wymagania ogólne

Potwierdzające metody analizy stosowane do celów kontroli żywności muszą być zgodne z przepisami pkt 1 i 2 załącznika III do rozporządzenia (WE) nr 882/2004.

4.3. Wymagania szczególne

4.3.1. Wymagania szczególne dotyczące metod potwierdzających

4.3.1.1. Kryteria skuteczności

Zaleca się, w miarę możliwości i dostępności, stosowanie w pełni zwalidowanych metod potwierdzających (tj. metod zwalidowanych w drodze badań międzylaboratoryjnych dla odpowiednich matryc). Dozwolone jest także stosowanie innych odpowiednich zwalidowanych metod potwierdzających (tj. metod zwalidowanych wewnętrznie na odpowiednich matrycach należących do danej grupy produktów), pod warunkiem że spełniają one kryteria skuteczności określone w poniższych tabelach.

W miarę możliwości walidacja metod zwalidowanych wewnętrznie obejmuje certyfikowany materiał odniesienia.

a) kryteria skuteczności dla aflatoksyn

Kryterium	Zakres stężenia	Wartość zalecana	Najwyższa dopuszczalna wartość
Próba ślepa	Cały	Pomijalnie mała	—
Odzysk — aflatoksyna M1	0,01–0,05 µg/kg	60 do 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 do 110 %	
Odzysk — aflatoksyny B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 µg/kg	50 do 120 %	
	1–10 µg/kg	70 do 110 %	
	> 10 µg/kg	80 do 110 %	
Odtwarzalność RSDR	Cały	Wynika z równania Horwitza (*) (**)	2 × wartość wynikająca z równania Horwitza (*) (**)

Powtarzalność RSDr można obliczyć jako $0,66 \times$ odtwarzalność RSDR dla odpowiedniego stężenia.

Uwaga:

- wartości, które mają zastosowanie zarówno w odniesieniu do aflatoksyny B₁, jak i sumy aflatoksyn B₁ + B₂ + G₁ + G₂
- jeżeli wymagane jest podanie sumy indywidualnych aflatoksyn B₁ + B₂ + G₁ + G₂, odpowiedź każdej z nich w systemie analitycznym musi być znana albo równoważna;

b) kryteria skuteczności dla ochratoksyny A

Poziom (w µg/kg)	Ochratoksyna A		
	RSD _r (w %)	RSD _R (w %)	Odzysk (w %)
< 1	≤ 40	≤ 60	50 do 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	70 do 110

c) kryteria skuteczności dla patuliny

Poziom (w µg/kg)	Patulina		
	RSD _r (w %)	RSD _R (w %)	Odzysk (w %)
< 20	≤ 30	≤ 40	50 do 120
20–50	≤ 20	≤ 30	70 do 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 do 105

d) kryteria skuteczności dla deoksyniwalenolu

Poziom (w µg/kg)	Deoksyniwalenol		
	RSD _r (w %)	RSD _R (w %)	Odzysk (w %)
> 100 — ≤ 500	≤ 20	≤ 40	60 do 110
> 500	≤ 20	≤ 40	70 do 120

e) kryteria skuteczności dla zearalenonu

Poziom (w µg/kg)	Zearalenon		
	RSD _r (w %)	RSD _R (w %)	Odzysk (w %)
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 do 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 do 120

f) kryteria skuteczności osobno dla fumonizyny B₁ i B₂

Poziom (w µg/kg)	Fumonizyna B ₁ i B ₂ osobno		
	RSD _r (w %)	RSD _R (w %)	Odzysk (w %)
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 do 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 do 110

g) kryteria skuteczności osobno dla toksyny T-2 i HT-2

Poziom (w µg/kg)	Toksyna T-2 i HT-2 osobno		
	RSD _r (w %)	RSD _R (w %)	Odzysk (w %)
15–250	≤ 30	≤ 50	60 do 130
> 250	≤ 25	≤ 40	60 do 130

h) kryteria skuteczności dla cytryniny

Poziom (w µg/kg)	Cytrynina			
	RSD _r (w %)	Zalecane RSD _R (w %)	Najwyższe dozwolone RSD _R (w %)	Odzysk (w %)
Cały	$0,66 \times RSD_R$	Wynika z równania Horwitza (*) (**)	$2 \times$ wartość wynikająca z równania Horwitza (*) (**)	70 do 120

- i) uwagi do kryteriów skuteczności dla mikotoksyn
- granica wykrywalności stosowanych metod nie jest podana jako wartość precyzji dla odpowiednich stężeń,
 - wartość precyzji jest obliczana z równania Horwitza, w szczególności pierwotnego równania Horwitza (dla stężeń $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$) (*) i zmodyfikowanego równania Horwitza (dla stężeń $C < 1,2 \times 10^{-7}$) (**).

(*) Równanie Horwitza dla stężeń $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$:

$$RSD_R = 2^{(1-0.5 \log C)}$$

(Zob. W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, *J.Assoc.Off.Analy.Chem.*, 1980, 63, 1344)

(**) Zmodyfikowane równanie Horwitza (*) dla stężeń $C < 1,2 \times 10^{-7}$:

$$RSD_R = 22 \%$$

(Zob. M. Thompson, *Analyst*, 2000, 125, s. 385–386)

gdzie:

- RSD_R jest odchyleniem standardowym względnym, obliczonym na podstawie wyników otrzymanych w warunkach odtwarzalności $[(sR/l) \times 100]$,
- C jest stężeniem wyrażonym jako stosunek (np. 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

Jest to wzór na precyzję uogólnioną, którego wynik nie zależy ani od analitu, ani od matrycy, ale w przypadku większości rutynowych metod analizy zależy wyłącznie od stężenia.

4.3.1.2. Podejście oceny adekwatności

W przypadku metod zwalidowanych wewnętrznie alternatywnie można zastosować podejście oceny adekwatności (***) aby ocenić ich przydatność do celów kontroli urzędowej. Metody nadające się do zastosowania w ramach urzędowej kontroli muszą cechować się niepewnością standardową (u) niższą od maksymalnej niepewności standardowej obliczonej przy wykorzystaniu poniższego wzoru:

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

gdzie:

- Uf jest maksymalną niepewnością standardową (w $\mu\text{g}/\text{kg}$),
- LOD jest granicą wykrywalności metody (w $\mu\text{g}/\text{kg}$),
- α jest stałą wartością liczbową, którą należy stosować w zależności od wartości C. Poszczególne wartości, które należy stosować podane są w tabeli poniżej,
- C jest stężeniem (w $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Jeżeli dana metoda analityczna umożliwia otrzymanie wyników z niepewnością pomiaru mniejszą niż maksymalna niepewność standardowa, taką metodę należy uznać za równie odpowiednią, co metoda spełniająca kryteria skuteczności określone w pkt 4.3.1.1.

Tabela

Wartości liczbowe, które należy stosować dla α jako stałej we wzorze przedstawionym w niniejszym punkcie, w zależności od stężenia

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

(***) Zob. M. Thompson i R. Wood, *Accred. Qual. Assur.*, 2006, 10, s. 471–478.

4.3.2. Wymagania szczególne dotyczące ilościowych metod przesiewowych

4.3.2.1. Zakres stosowania

Zakres stosowania odnosi się do metod bioanalitycznych opartych na rozpoznaniu immunologicznym lub wiązaniu z receptorem (np. test ELISA, testy paskowe, urządzenia »lateral flow«, immunoczuJNIKI) i metod fizykochemicznych opartych na chromatografii lub bezpośredniego wykrywania metodą spektrometrii mas (np. spektrometrii mas pod ciśnieniem atmosferycznym). Inne metody (np. chromatografia cienkowarstwowa) nie są wykluczone, pod warunkiem że generowane sygnały odnoszą się bezpośrednio do danych mikotoksyn i pozwalają na zastosowanie zasady opisanej poniżej.

Wymagania szczególne mają zastosowanie do metod, których wynikiem jest wartość numeryczna, np. (względna) odpowiedź z czytnika testu paskowego, sygnał z chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas itp., oraz przy zastosowaniu normalnych zasad statystycznych.

Wymagania te nie mają zastosowania do metod, które nie dają wartości numerycznych (np. jedynie linię, która jest obecna albo nie) i wymagają innego podejścia do walidacji. Wymagania szczególne dotyczące tych metod są określone w pkt 4.3.3.

Niniejszy dokument opisuje procedury walidacji metod przesiewowych za pomocą walidacji międzylaboratoryjnej, kontroli skuteczności metody zwalidowanej za pomocą procedury międzylaboratoryjnej oraz walidacji metod przesiewowych przez jedno laboratorium.

4.3.2.2. Terminologia

Przesiewowe stężenie docelowe (»screening target concentration« — STC): określone stężenie wykrycia mikotoksyn w próbce. Jeżeli celem jest zbadanie zgodności z przepisami, przesiewowe stężenie docelowe jest równe obowiązującemu najwyższemu dopuszczalnemu poziomowi. Do innych celów lub w przypadkach, gdy nie ustanowiono najwyższego dopuszczalnego poziomu, przesiewowe stężenie docelowe jest określane z góry przez laboratorium.

Metoda przesiewowa: oznacza metodę stosowaną do wyboru próbek o poziomach mikotoksyn z określoną pewnością przekraczających przesiewowe stężenie docelowe. Do celów badań przesiewowych mikotoksyn za adekwatną uznaje się pewność w wysokości 95 %. Wynik analizy przesiewowej jest »ujemny« lub »podejrzany«. Metody przesiewowe muszą pozwalać na oszczędną i wysoką przepustowość w zakresie badania próbek i zwiększać w ten sposób szansę wykrycia nowych incydentów o wysokim stopniu narażenia i ryzyku dla zdrowia konsumentów. Metody te opierają się na metodach bioanalitycznych, chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wyniki z próbek przekraczających wartość graniczną sprawdza się za pomocą pełnej ponownej analizy pierwotnej próbki z zastosowaniem metody potwierdzającej.

»Próbka ujemna« oznacza, że zawartość mikotoksyn w danej próbce jest < STC przy pewności wynoszącej 95 % (tj. istnieje 5 % prawdopodobieństwa, że próbki będą niewłaściwie zgłaszane jako ujemne).

»Próbka fałszywie ujemna« oznacza, że zawartość mikotoksyn w danej próbce jest > STC, ale została ona zidentyfikowana jako ujemna.

»Próbka podejrzana« (przesiew dodatni) oznacza, że próbka przekracza poziom graniczny (zob. poniżej) i może zawierać wyższy poziom mikotoksyn niż STC. Każdy podejrzany wynik powoduje zastosowanie analizy potwierdzającej w celu jednoznacznej identyfikacji i oznaczenia ilościowego mikotoksyny.

»Próbka fałszywie podejrzana« jest próbka ujemną, która została zidentyfikowana jako podejrzana.

»Metody potwierdzające« oznaczają metody, które dają pełne lub uzupełniające informacje umożliwiające identyfikację i oznaczenie ilościowe mikotoksyn w sposób jednoznaczny na poziomie zainteresowania.

Poziom graniczny: odpowiedź, sygnał lub stężenie uzyskane przy pomocy metody przesiewowej, powyżej którego próbka jest klasyfikowana jako »podejrzana«. Poziom graniczny jest określany podczas walidacji i uwzględnia zmienność pomiarów.

Próba kontrolna ujemna (matrycy zerowej): próbka, o której wiadomo, że jest wolna ⁽¹⁾ od mikotoksyny, której ma dotyczyć badanie przesiewowe, np. na podstawie uprzedniego oznaczania przy użyciu metody potwierdzającej o wystarczającej czułości. Jeśli nie można uzyskać ślepej próby, można wykorzystać materiał o najniższym możliwym do uzyskania poziomie, o ile poziom ten pozwala na wyciągnięcie wniosku, że dana metoda przesiewowa jest adekwatna.

Próba kontrolna dodatnia: próbka zawierająca mikotoksynę w przesiewowym stężeniu docelowym, np. certyfikowany materiał odniesienia, materiał o znanej zawartości (np. badany materiał badania biegłości) lub materiał w inny sposób w wystarczającym stopniu scharakteryzowany przy pomocy metody potwierdzającej. W razie braku takich materiałów można wykorzystać mieszaninę próbek o różnych poziomach zanieczyszczenia lub próbkę wzbogaconą przygotowaną w laboratorium i w wystarczającym stopniu scharakteryzowaną, pod warunkiem że można dowiedzieć, że poziom zanieczyszczenia został sprawdzony.

4.3.2.3. Procedura walidacji

Celem walidacji jest wykazanie zgodności z przeznaczeniem metody przesiewowej. Robi się to poprzez określenie wartości granicznej oraz określenie odsetka wyników fałszywie ujemnych i fałszywie podejrzanych. W tych dwóch parametrach uwzględnione są parametry skuteczności, takie jak czułość, selektywność i precyzja.

Metody przesiewowe mogą być walidowane za pomocą walidacji międzylaboratoryjnej lub walidacji przez jedno laboratorium. Jeżeli dla określonej kombinacji mikotoksyna/matryca/STC dostępne są już dane dotyczące walidacji międzylaboratoryjnej, wystarczające jest zweryfikowanie skuteczności tej metody w laboratorium ją stosującym.

4.3.2.3.1. Wstępna walidacja przez jedno laboratorium

Mikotoksyny:

Walidację przeprowadza się dla każdej indywidualnej mikotoksyny objętej zakresem. W przypadku metod bioanalitycznych, które dają łączną odpowiedź dla pewnej grupy mikotoksyn (np. aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂; fumonizyn B₁ i B₂), należy wykazać ich zastosowanie oraz wspomnieć o ograniczeniach badania w zakresie metody. Uznaje się, że niepożądana reakcja krzyżowa (np. DON-3-glikozyd, 3- lub 15-acetylo-DON przy metodach immunologicznych w odniesieniu do DON) nie zwiększa odsetka wyników fałszywie ujemnych dla docelowych mikotoksyn, ale może zwiększać odsetek wyników fałszywie podejrzanych. Ten niepożądany wzrost można zmniejszyć przy pomocy analizy potwierdzającej w celu jednoznacznej identyfikacji i oznaczenia ilościowego mikotoksyn.

Matryce:

Wstępną walidację należy przeprowadzić dla każdego produktu lub, jeżeli o danej metodzie wiadomo, że ma zastosowanie do wielu produktów, dla każdej grupy produktów. W tym drugim przypadku z danej grupy wybiera się jeden reprezentatywny i odpowiedni produkt.

Zestaw próbek:

Minimalna liczba różnych próbek wymaganych do walidacji wynosi 20 jednorodnych prób kontrolnych ujemnych i 20 jednorodnych prób kontrolnych dodatnich, które zawierają mikotoksynę w stężeniu STC, poddanych w warunkach precyzji pośredniej (RSD_{Ri}) analizie rozłożonej na 5 różnych dni. Do zestawu walidacyjnego można dodać dodatkowe zestawy 20 próbek zawierających mikotoksynę na innych poziomach, aby dowiedzieć się, do jakiego stopnia dana metoda umożliwi rozróżnienie między różnymi stężeniami mikotoksyn.

Stężenie:

Dla każdego STC, które ma być wykorzystane do rutynowego zastosowania, musi zostać przeprowadzona walidacja.

4.3.2.3.2. Wstępna walidacja w drodze badań międzylaboratoryjnych

Walidację w drodze badań międzylaboratoryjnych przeprowadza się zgodnie z uznanym na szczeblu międzynarodowym protokołem dotyczącym badań międzylaboratoryjnych (np. ISO 5725:1994 lub »IUPAC International Harmonised Protocol«), który wymaga włączenia ważnych danych z co najmniej ośmiu różnych laboratoriów. Poza tym jedyną różnicą w porównaniu do walidacji przez jedno laboratorium jest fakt, że ≥ 20 próbek na produkt/poziom musi zostać równomiernie rozdzielonych pomiędzy uczestniczące laboratoria, przy czym na jedno laboratorium przypadają przynajmniej dwie próbki.

⁽¹⁾ Próbkę uznaje się za wolną od analitu, jeśli ilość obecna w próbce nie przekracza 1/5 STC. Jeżeli poziom może zostać oznaczony ilościowo przy zastosowaniu metody potwierdzającej, poziom ten musi zostać uwzględniony przy ocenie walidacji.

- 4.3.2.4. Określanie poziomu granicznego i odsetka wyników fałszywie podejrzanych próby ślepej (Względne) odpowiedzi próby kontrolnej ujemnej i próby kontrolnej dodatniej przyjmuje się za podstawę obliczenia wymaganych parametrów.

Metody przesiewowe o odpowiedzi proporcjonalnej do stężenia mikotoksyn

Do metod przesiewowych o odpowiedzi proporcjonalnej do stężenia mikotoksyn zastosowanie ma, co następuje:

$$\text{Wartość graniczna} = R_{\text{STC}} - \text{wartość } t_{0,05} * SD_{\text{STC}}$$

R_{STC} = średnia odpowiedź próby kontrolnej dodatniej (przy STC)

wartość t: jednostronna wartość t dla odsetka wyników fałszywie ujemnych w wysokości 5 % (zob. tabela B)

SD_{STC} = odchylenie standardowe Metody przesiewowe o odpowiedzi odwrotnie proporcjonalnej do stężenia mikotoksyn

Podobnie dla metod przesiewowych o odpowiedzi odwrotnie proporcjonalnej do stężenia mikotoksyn wartość graniczną określa się jako:

$$\text{wartość graniczna} = R_{\text{STC}} + \text{wartość } t_{0,05} * SD_{\text{STC}}$$

Przy stosowaniu tej szczególnej wartości t do określenia wartości granicznej odsetek wyników fałszywie ujemnych jest domyślnie ustalony na poziomie 5 %.

Ocena adekwatności

Wyniki z próby kontrolnej ujemnej wykorzystuje się do oszacowania odpowiadającego odsetka wyników fałszywie podejrzanych. Wartość t oblicza się tak, by odpowiadała sytuacji, gdy wynik z próby kontrolnej ujemnej jest powyżej wartości granicznej, a zatem jest błędnie klasyfikowany jako podejrzany.

wartość t = (wartość graniczna — średnia_{ślepa próba})/SD_{ślepa próba} dla metod przesiewowych o odpowiedzi proporcjonalnej do stężenia mikotoksyn

lub

wartość t = (średnia_{ślepa próba} — wartość graniczna)/SD_{ślepa próba} dla metod przesiewowych o odpowiedzi odwrotnie proporcjonalnej do stężenia mikotoksyn

Z uzyskanej wartości t, na podstawie stopni swobody obliczonych z szeregu eksperymentów, prawdopodobieństwo próbek fałszywie podejrzanych przy jednostronnej dystrybucji może zostać obliczone (np. funkcja TDIST w arkuszu kalkulacyjnym) lub uzyskane z tabeli dystrybucji t.

Odpowiednia wartość jednostronnej dystrybucji t określa odsetek wyników fałszywie podejrzanych.

Koncepcja ta jest szczegółowo opisana wraz z przykładem w »Analytical and Bioanalytical Chemistry« DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

- 4.3.2.5. Rozszerzenie zakresu stosowania metody

- 4.3.2.5.1. Rozszerzenie zakresu na inne mikotoksyny:

Gdy do zakresu istniejącej metody przesiewowej dodaje się nowe mikotoksyny, wymagana jest pełna walidacja, aby wykazać przydatność danej metody.

- 4.3.2.5.2. Rozszerzenie na inne produkty:

Jeśli metoda przesiewowa ma — zgodnie z wiedzą lub oczekiwaniami — zastosowanie do innych produktów, należy zweryfikować jej trafność w odniesieniu do tych innych produktów. Jeśli nowy produkt należy do grupy produktów (zob. tabela A), dla których przeprowadzono już wstępną walidację, wystarczająca jest dodatkowa walidacja o ograniczonym zakresie. W tym celu poddaje się analizie w warunkach precyzji pośredniej co najmniej 10 jednorodnych prób kontrolnych ujemnych i 10 jednorodnych prób kontrolnych dodatnich (przy STC). Wszystkie próby kontrolne dodatnie muszą być powyżej wartości granicznej. Jeśli kryterium to nie zostało spełnione, wymagana jest pełna walidacja.

4.3.2.6. Weryfikacja metod już zwalidowanych za pomocą badań międzylaboratoryjnych

W przypadku metod przesiewowych, które zostały już pomyślnie zwalidowane w drodze badań międzylaboratoryjnych, skuteczność metody musi zostać zweryfikowana. W tym celu poddaje się analizie w warunkach precyzji pośredniej co najmniej 6 prób kontrolnych ujemnych i 6 prób kontrolnych dodatnich (przy STC). Wszystkie próby kontrolne dodatnie muszą być powyżej wartości granicznej. Jeśli kryterium to nie zostało spełnione, laboratorium musi przeprowadzić analizę przyczyn w celu określenia, dlaczego nie może spełnić specyfikacji uzyskanej w ramach badania międzylaboratoryjnego. Dopiero po podjęciu działań naprawczych przeprowadza ono ponowną weryfikację skuteczności metody w laboratorium. Jeśli laboratorium nie jest w stanie zweryfikować wyników z badań międzylaboratoryjnych, będzie musiało ustalić własną wartość graniczną w ramach pełnej walidacji w jednym laboratorium.

4.3.2.7. Ciągła weryfikacja metody/bieżąca walidacja metody

Po wstępnej walidacji uzyskuje się dodatkowe dane dotyczące walidacji poprzez włączenie przynajmniej dwóch prób kontrolnych dodatnich dla każdej partii próbek poddawanych badaniu przesiewowemu. Jedna próba kontrolna dodatnia jest próbą znaną (np. wykorzystaną podczas wstępnej walidacji), a druga jest innym produktem z tej samej grupy produktów (jeśli analizowany jest tylko jeden produkt, wykorzystuje się zamiast tego inną próbę tego produktu). Włączenie próby kontrolnej ujemnej jest fakultatywne. Wyniki uzyskane dla dwóch prób kontrolnych dodatnich dodaje się do istniejącego zestawu walidacyjnego.

Co najmniej raz do roku wartość graniczną ustala się od nowa a wiarygodność tej metody poddaje się ponownej ocenie. Ciągła weryfikacja metody ma kilka celów:

- kontrolę jakości partii próbek poddanej badaniu przesiewowemu,
- dostarczenie informacji na temat stabilności metody w warunkach laboratorium, które ją stosuje,
- uzasadnienie stosowania metody do różnych produktów,
- pozwolenie na dostosowanie wartości granicznych w przypadku stopniowych przesunięć wraz z upływem czasu.

4.3.2.8. Sprawozdanie z walidacji

Sprawozdanie z walidacji zawiera:

- wskazanie STC,
- wskazanie uzyskanej wartości granicznej.

Uwaga: Wartość graniczna musi mieć tyle samo znaczących cyfr, co STC. Wartości liczbowe wykorzystane do obliczenia wartości granicznej muszą mieć co najmniej jedną znaczącą cyfrę więcej niż STC.

- wskazanie obliczonego odsetka wyników fałszywie podejrzanych,
- wskazanie, w jaki sposób obliczono odsetek wyników fałszywie podejrzanych.

Uwaga: Wskazanie obliczonego odsetka wyników fałszywie podejrzanych pokazuje, czy metoda jest adekwatna, ponieważ określa liczbę ślepych prób (lub prób o niskim poziomie zanieczyszczenia), które będą podlegały weryfikacji.

Tabela A

Grupy produktów do walidacji metod przesiewowych

Grupy produktów	Kategorie produktów	Typowe reprezentatywne produkty włączone do tej kategorii
Wysoka zawartość wody	Soki owocowe	Sok jabłkowy, sok winogronowy
	Napoje alkoholowe	Wino, piwo, cydr
	Warzywa korzeniowe i bulwiaste	Świeży imbir
	Przeciery na bazie zbóż lub owoców	Przeciery przeznaczone dla niemowląt lub małych dzieci

Grupy produktów	Kategorie produktów	Typowe reprezentatywne produkty włączone do tej kategorii
Wysoka zawartość oleju	Orzechy z drzew orzechowych	Orzech włoski, orzech laskowy, kasztan jadalny
	Nasiona oleiste i produkty z nich	Rzepak oleisty, słonecznik, nasiona bawełny, nasiona soi, orzechy ziemne, sezam itp.
	Owoce oleiste i produkty z nich	Oleje i pasty (np. masło orzechowe, tahina)
Wysoka zawartość skrobi lub białka i niska zawartość wody i tłuszczu	Ziarna zbóż i produkty z nich	Pszenica, żyto, jęczmień; kukurydza, ryż, owies Chleb pełnoziarnisty, chleb biały, krakersy, śniadaniowe przetwory zbożowe, makarony
	Produkty dietetyczne	Suche proszki do przygotowywania żywności dla niemowląt i małych dzieci
Wysoka zawartość kwasu i wysoka zawartość wody (*)	Produkty z cytrusów	
»Trudne lub szczególnie produkty« (**)		Ziarna kakaowe i produkty z nich, kopra i produkty z niej, kawa, herbata Przyprawy, lukrecja
Wysoka zawartość cukru i niska zawartość wody	Owoce suszone	Figi, rodzynki, porzeczkki, sułtanki
Mleko i przetwory mleczne	Mleko	Mleko krowie, kozie i bawole
	Ser	Ser krowi i kozi
	Produkty mleczarskie (np. mleko w proszku)	Jogurt, śmietana

(*) Jeżeli do stabilizacji zmian pH na etapie ekstrakcji stosowany jest bufor, ta grupa produktów może zostać połączona w jedną grupę produktów »Wysoka zawartość wody«.

(**) »Trudne lub szczególnie produkty« powinny być w pełni walidowane, jedynie jeśli są często poddawane analizie. Jeśli są one jedynie okazjonalnie poddawane analizie, walidacja może zostać ograniczona do sprawdzenia poziomów zgłaszania z zastosowaniem ekstraktu ślepej próbki wzbogaconej.

Tabela B

Jednostronna wartość t dla odsetka wyników fałszywie ujemnych wynoszącego 5 %

Stopnie swobody	Liczba replikacji	Wartość 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

Stopnie swobody	Liczba replikacji	Wartość 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. Wymagania dotyczące jakościowych metod przesiewowych (metod, które nie dają wartości numerycznych)

Opracowanie wytycznych walidacyjnych dla metod testów binarnych jest obecnie przedmiotem prac różnych organów normalizacyjnych (np. AOAC, ISO). AOAC opracowało niedawno wytyczne w tej sprawie. Można uznać, że dokument ten przedstawia aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie. Zatem metody, które dają binarne wyniki (np. oględziny testów paskowych), powinny być walidowane zgodnie z tymi wytycznymi.

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

4.4. Szacowanie niepewności pomiaru, obliczanie odzysku i podawanie wyników ⁽¹⁾

4.4.1. Metody potwierdzające

Wynik analityczny musi zostać podany w następujący sposób:

- w postaci skorygowanej o wartość odzysku, przy czym poziom odzysku należy wskazać. Korekta o wartość odzysku nie jest konieczna, jeśli stopień odzysku wynosi 90–110 %;
- jako $x \pm U$, gdzie x oznacza wynik analizy, a U rozszerzoną niepewność pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia w wysokości 2, który daje wynik w przedziale ufności ok. 95 %.

W przypadku żywności pochodzenia zwierzęcego niepewność pomiaru może zostać uwzględniona poprzez ustalenie decyzyjnej wartości granicznej (CCA), zgodnie z decyzją Komisji 2002/657/WE ⁽²⁾ (pkt 3.1.2.5 załącznika I — przypadek substancji, dla których ustalono dopuszczalną wartość graniczną).

Jeżeli wynik analizy jest jednak znacznie (> 50 %) niższy niż najwyższy dopuszczalny poziom lub dużo wyższy niż najwyższy dopuszczalny poziom (tj. 5 razy wyższy niż najwyższy dopuszczalny poziom) oraz pod warunkiem że stosowane są odpowiednie procedury w zakresie jakości, a analiza wykonywana jest jedynie do celów sprawdzenia zgodności z przepisami prawa, wynik analizy można podać bez korekty na odzysk; w takim przypadku można pominąć podawanie stopnia odzysku i niepewności pomiaru.

⁽¹⁾ Więcej informacji na temat szacowania niepewności pomiaru oraz procedur oceny odzysku można znaleźć w sprawozdaniu pod tytułem «Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation» («Raport na temat relacji między wynikami analiz, niepewnością pomiaru, współczynnikami odzysku a przepisami prawodawstwa UE dotyczącego żywności i paszy») — http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf

⁽²⁾ Decyzja Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonująca dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (Dz.U. L 221 z 17.8.2002, s. 8).

Obowiązujące zasady interpretacji wyników analitycznych w świetle przyjęcia lub odrzucenia partii mają zastosowanie do wyników analitycznych otrzymanych na próbce do celów urzędowej kontroli. W przypadku analizy do celów obrony lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

4.4.2. *Metody przesiewowe*

Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako zgodny lub podejrzewany o niezgodność.

»Podejrzewany o niezgodność« oznacza, że próbka przekracza poziom graniczny i może zawierać wyższy poziom mikotoksyn niż STC. Każdy podejrzany wynik powoduje zastosowanie analizy potwierdzającej w celu jednoznacznej identyfikacji i oznaczenia ilościowego mikotoksyny.

»Zgodny« oznacza, że zawartość mikotoksyn w próbce jest < STC przy pewności wynoszącej 95 % (tj. istnieje 5 % prawdopodobieństwa, że próbki będą niewłaściwie zgłaszane jako ujemne). Wynik analizy przedstawia się jako »< poziom STC« wraz z określeniem poziomu STC.»
