UREDBA KOMISIJE (EU) št. 519/2014

z dne 16. maja 2014

o spremembi Uredbe (ES) št. 401/2006 glede metod vzorčenja za velike lote, začimbe in prehranska dopolnila, izvedbenih meril za toksina T-2 in HT-2 ter citrinin in presejalnih analitskih metod

(Besedilo velja za EGP)

EVROPSKA KOMISIJA JE –

ob upoštevanju Pogodbe o delovanju Evropske unije,

ob upoštevanju Uredbe (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o izvajanju uradnega nadzora, da se zagotovi preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščiti živali ([1]) ter zlasti člena 11(4) Uredbe,

ob upoštevanju naslednjega:

(1) Uredba Komisije (ES) št. 1881/2006 ([2]) določa mejne vrednosti nekaterih mikotoksinov v nekaterih živilih.

(2) Vzorčenje je odločilno za natančnost določanja vsebnosti mikotoksinov, ki so heterogeno porazdeljeni v lotu. Zato je treba določiti merila, ki jih morajo izpolnjevati metode vzorčenja.

(3) Uredba Komisije (ES) št. 401/2006 ([3]) določa merila vzorčenja za nadzor ravni mikotoksinov.

(4) Spremeniti je treba pravila glede vzorčenja za začimbe, da se upoštevajo razlike v velikosti kosov, ki povzročajo heterogeno porazdelitev onesnaženosti začimb z mikotoksini. Nadalje je primerno uvesti pravila vzorčenja velikih lotov, da se zagotovi pristop enotnega izvrševanja po vsej Uniji. Hkrati je primerno tudi, da se pojasni, katero metodo vzorčenja je treba uporabljati za vzorčenje jabolčnega soka.

(5) Izvedbena merila za toksina T-2 in HT-2 je treba posodobiti, da se upošteva znanstveni in tehnološki napredek. Uvesti je treba izvedbena merila za citrinin, ker so bile določene mejne vrednosti citrinina v prehranskih dopolnilih na podlagi riža, fermentiranega z rdečimi kvasovkami *Monascus purpureus*.

(6) Za analizo mikotoksinov se vedno več uporabljajo presejalne metodologije. Primerno je določiti merila, ki jih morajo izpolnjevati presejalne metode, ki se uporabljajo za regulativne namene.

(7) Ukrepi iz te uredbe so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravje živali –

SPREJELA NASLEDNJO UREDBO:

Člen 1

Uredba (ES) št. 401/2006 se spremeni:

1. Priloga I se spremeni:

   (a) v delu B se opomba 1 nadomesti z naslednjim:

   „(1) Vzorčenje takšnih lotov se izvede v skladu s pravili, določenimi v delu L. Napotki za vzorčenje velikih lotov se zagotovijo v navodilih, ki so na voljo na: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf.

([1]) UL L 165, 30.4.2004, str. 1.
([2]) Uredba Komisije (ES) št. 1881/2006 z dne 19. decembra 2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih (UL L 364, 20.12.2006, str. 5).
([3]) Uredba Komisije (ES) št. 401/2006 z dne 23. februarja 2006 o določitvi metod vzorčenja in analiz za uradni nadzor vsebnosti mikotoksinov v živilih (UL L 70, 9.3.2006, str. 12).

Uporaba pravil vzorčenja v skladu z EN ISO 24333:2009 ali Pravil vzorčenja GAFTA 124, ki jih uporabljajo nosilci živilske dejavnosti za zagotovitev skladnosti z zakonskimi določbami, je enakovredna pravilom vzorčenja, določenim v delu L.

Za vzorčenje lotov za ugotavljanje toksinov iz rodu *Fusarium* je uporaba pravil vzorčenja v skladu z EN ISO 24333:2009 ali Pravil vzorčenja GAFTA 124, ki jih uporabljajo nosilci živilske dejavnosti za zagotovitev skladnosti z zakonskimi določbami, enakovredna pravilom vzorčenja, določenim v delu B;";

(b) v delu B.2 se preglednica 1 nadomesti z naslednjo preglednico:

„Preglednica 1

Razdelitev lotov na sublote, odvisno od proizvoda in mase lota

Blago	Masa lota (tone)	Masa ali število sublotov	Število primarnih vzorcev	Masa sestavljenega vzorca (kg)
Žita in žitni proizvodi	> 300 in < 1 500	3 subloti	100	10
	≥ 50 in ≤ 300	100 ton	100	10
	< 50	—	3–100 (*)	1–10

(*) Odvisno od mase lota – glej preglednico 2.";

(c) v delu B.3 se na koncu prve alinee doda naslednji stavek:

„Za lote > 500 ton je število primernih vzorcev navedeno v delu L.2 v Prilogi I.";

(d) v delu D.2 se za prvim stavkom doda naslednji stavek:

„Ta metoda vzorčenja se uporablja tudi za uradni nadzor mejnih vrednosti, določenih za ohratoksin A, aflatoksin B1 in skupne aflatoksine v začimbah z relativno velikimi kosi (velikost, primerljiva z arašidi ali večjimi kosi, npr. muškatnimi oreščki).";

(e) v delu E se prvi stavek nadomesti z naslednjim:

„Ta metoda vzorčenja se uporablja za uradni nadzor mejnih vrednosti, določenih za ohratoksin A, aflatoksin B1 in skupne aflatoksine v začimbah, razen v začimbah z relativno velikimi kosi (heterogena porazdelitev onesnaženosti z mikotoksini).";

(f) v delu I se naslov in prvi stavek nadomestita z naslednjim:

„I. METODA VZORČENJA ZA TRDNE PROIZVODE IZ JABOLK

Ta metoda vzorčenja se uporablja za uradni nadzor mejnih vrednosti, določenih za patulin v trdnih proizvodih iz jabolk, vključno s trdnimi proizvodi iz jabolk za dojenčke in male otroke.";

(g) v drugem odstavku dela I.1 se črtajo naslednji stavki:

„V primeru tekočih proizvodov se lot čim bolj temeljito ročno ali mehansko premeša neposredno pred vzorčenjem. V tem primeru se lahko sklepa na homogeno porazdelitev patulina v danem lotu. Zato zadošča, da se iz lota odvzamejo trije primarni vzorci za sestavo sestavljenega vzorca.";

(h) dodata se nova dela L in M, kot je določeno v Prilogi I k tej uredbi.

2. V Prilogi II se točke 4.2 „Splošne zahteve", 4.3 „Posebne zahteve" in 4.4 „Ocena merilne negotovosti, izračun izkoristka in poročanje rezultatov" nadomestijo z besedilom, navedenim v Prilogi II k tej uredbi.

Člen 2

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Uporablja se od 1. julija 2014.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.

V Bruslju, 16. maja 2014

Za Komisijo

Predsednik

José Manuel BARROSO

PRILOGA I

„L. METODA VZORČENJA ZA ZELO VELIKE LOTE ALI LOTE, KI SE SKLADIŠČIJO ALI PREVAŽAJO TAKO, DA NI MOGOČE VZORČENJE PO CELOTNEM LOTU.

L.1 **Splošna načela**

Če način prevoza ali skladiščenja lota ne omogoča odvzema primarnih vzorcev po celotnem lotu, se vzorčenje takih lotov po možnosti opravi ob pretoku lota (dinamično vzorčenje).

V primeru velikih skladišč, namenjenih skladiščenju hrane, je treba nosilce dejavnosti spodbujati, da v skladišče vgradijo opremo, ki omogoča (avtomatsko) vzorčenje celotnega skladiščenega lota.

Če se uporabljajo postopki vzorčenja, določeni v tem delu L, je treba nosilca živilske dejavnosti ali njegovega predstavnika obvestiti o postopku vzorčenja. Če nosilec živilske dejavnosti ali njegov predstavnik izrazi dvom o postopku vzorčenja, pristojnemu organu omogoči, da na njegove stroške vzorči celoten lot.

Vzorčenje dela lota je dovoljeno pod pogojem, da količina vzorčenega dela predstavlja vsaj 10 % vzorčenega lota. Če se po vzorčenju dela lota živil istega razreda ali opisa ugotovi, da ne izpolnjuje zahtev Unije, se predpostavi, da je prizadet celoten lot, razen če se v nadaljnji podrobni oceni ne pridobi nobenih dokazov, da je preostanek lota nezadovoljiv.

Za vzorčenje zelo velikih lotov, ki se skladiščijo ali prevažajo tako, da ni mogoče vzorčenje po celotni seriji, se uporabljajo ustrezne določbe iz drugih delov te Priloge, na primer glede mase primarnega vzorca.

L.2 **Število primarnih vzorcev, ki jih je treba odvzeti v primeru zelo velikih lotov**

V primeru velikih vzorčenih deležev (vzorčeni deleži > 500 ton) je treba odvzeti 100 primarnih vzorcev + $\sqrt{\text{ton}}$. V primeru, da lot tehta manj kot 1 500 ton in se lahko razdeli na sublote v skladu s preglednico 1 iz dela B ter pod pogojem, da se sublote lahko fizično loči, pa je treba odvzeti število primarnih vzorcev, določeno v delu B.

L.3 **Veliki loti, ki se prevažajo z ladjo**

L.3.1 *Dinamično vzorčenje velikih lotov, ki se prevažajo z ladjo*

Vzorčenje velikih lotov na ladjah se po možnosti izvaja med samim pretokom proizvoda (dinamično vzorčenje).

Vzorčenje se izvaja po posameznih ladijskih skladiščih (fizično ločenih enotah). Ladijska skladišča se sicer praznijo drugo za drugo tako, da po prenosu v skladiščne prostore prvotne fizične ločitve ni več. Vzorčenje se zato lahko izvede na podlagi začetne fizične ločitve ali na podlagi ločitve po prenosu v skladiščne prostore.

Raztovarjanje ladje lahko traja več dni. Običajno je treba vzorčenje izvesti v rednih presledkih med celotnim trajanjem raztovarjanja. Vendar ni vedno mogoče ali primerno, da je uradni inšpektor prisoten pri vzorčenju med celotnim trajanjem raztovarjanja. Zato je dopustno, da se vzorčenje opravi za del (vzorčeni delež) lota. Število primarnih vzorcev se določi ob upoštevanju velikosti vzorčenega deleža.

Inšpektor mora biti prisoten tudi, če se avtomatsko odvzame uradni vzorec. Pri avtomatskem vzorčenju s prednastavljenimi parametri, ki jih ni mogoče spremeniti med vzorčenjem, in če se primarni vzorci zbirajo v zapečateni zbiralni posodi, da se preprečijo morebitne goljufije, mora biti inšpektor prisoten le na začetku vzorčenja, vsakokrat, ko je treba zamenjati posodo za zbiranje vzorcev, in na koncu vzorčenja.

L.3.2 *Statično vzorčenje lotov, ki se prevažajo z ladjo*

Če se izvaja statično vzorčenje, je treba uporabiti enak postopek, kot je določen za skladiščne prostore (silose), ki so dostopni od zgoraj (glej točko L.5.1).

Vzorčenje je treba izvajati na dostopnem delu (od zgoraj) lota/ladijskega skladišča. Število primarnih vzorcev se določi ob upoštevanju velikosti vzorčenega deleža.

L.4 **Vzorčenje velikih lotov, ki se skladiščijo v skladiščih**

Vzorčenje je treba izvajati na dostopnem delu lota. Število primarnih vzorcev se določi ob upoštevanju velikosti vzorčenega deleža.

L.5 **Vzorčenje skladiščnih prostorov (silosov)**

L.5.1 *Vzorčenje silosov, (zlahka) dostopnih od zgoraj*

Vzorčenje je treba izvajati na dostopnem delu lota. Število primarnih vzorcev se določi ob upoštevanju velikosti vzorčenega deleža.

L.5.2 *Vzorčenje silosov, ki niso dostopni od zgoraj (zaprti silosi)*

L.5.2.1 Silosi, ki niso dostopni od zgoraj (zaprti silosi), posameznih velikosti > 100 ton

Živil, ki se skladiščijo v takih silosih, ni mogoče statično vzorčiti. Če je treba živila v silosu vzorčiti in pošiljke ni mogoče premakniti, se je treba zato z nosilcem dejavnosti dogovoriti, da inšpektorja obvesti, kdaj se bo silos delno ali v celoti raztovoril, da se omogoči vzorčenje med pretokom živil.

L.5.2.2 Silosi, ki niso dostopni od zgoraj (zaprti silosi), posameznih velikosti < 100 ton

V nasprotju z določbo v točki L.1 (vsaj 10-odstotni vzorčeni del) postopek vzorčenja vključuje prenos količine od 50 do 100 kg v zbiralno posodo in odvzem vzorca iz nje. Velikost sestavljenega vzorca ustreza celotnemu lotu, število primarnih vzorcev pa je povezano s količino živil iz silosa, preneseno v zbiralno posodo za vzorčenje.

L.6 **Vzorčenje razsutih živil v velikih zaprtih zabojnikih**

Taki loti se pogosto lahko vzorčijo šele, ko se raztovorijo. V nekaterih primerih ni mogoče opraviti raztovarjanja na točki uvoza ali kontrolni točki, zato se mora vzorčenje izvesti, ko se taki zabojniki raztovorijo. Nosilec dejavnosti mora inšpektorja obvestiti o kraju in uri raztovarjanja.

M. METODA VZORČENJA ZA PREHRANSKA DOPOLNILA NA PODLAGI RIŽA, FERMENTIRANEGA Z RDEČIMI KVASOVKAMI *MONASCUS PURPUREUS*

Ta metoda vzorčenja se uporablja za uradni nadzor mejnih vrednosti, določenih za citrinin v prehranskih dopolnilih na podlagi riža, fermentiranega z rdečimi kvasovkami *Monascus purpureus*.

Postopek vzorčenja in velikost vzorca

Predpostavka za postopek vzorčenja je, da se prehranska dopolnila na podlagi riža, fermentiranega z rdečimi kvasovkami *Monascus purpureus*, tržijo v enotah pakiranja za maloprodajo, pri čemer posamezna enota običajno vsebuje od 30 do 120 kapsul.

Velikost lota (število enot pakiranja za maloprodajo)	Število enot pakiranja za maloprodajo, ki jih je treba vzeti za vzorec	Velikost vzorca
1–50	1	Vse kapsule
51–250	2	Vse kapsule
251–1 000	4	Polovica kapsul iz vsake enote pakiranja za maloprodajo, vzete za vzorec
> 1 000	4 + 1 enota pakiranja za maloprodajo na 1 000 enot pakiranja za maloprodajo, vendar največ 25 enot pakiranja za maloprodajo	≤ 10 enot pakiranja za maloprodajo: polovica kapsul iz vsake enote pakiranja za maloprodajo > 10 enot pakiranja za maloprodajo: iz vsake enote pakiranja za maloprodajo se vzame enako število kapsul, da nastane vzorec z enakovredno vsebino 5 enot pakiranja za maloprodajo“

PRILOGA II

„4.2 **Splošne zahteve**

Potrditvene metode analize, uporabljene za nadzor živil, so v skladu z določbami iz točk 1 in 2 Priloge III k Uredbi (ES) št. 882/2004.

4.3 **Posebne zahteve**

4.3.1 *Posebne zahteve za potrditvene metode*

4.3.1.1 Izvedbena merila

Priporočljivo je, da se popolnoma validirane potrditvene metode (tj. metode, ki so validirane z medlaboratorijskimi primerjalnimi preskusi ustreznih matric) uporabljajo, kadar je to primerno in dostopno. Uporabijo se lahko tudi druge primerne validirane potrditvene metode (npr. interno validirane metode za ustrezne matrice, ki spadajo v izbrano skupino proizvodov), če izpolnjujejo izvedbena merila, določena v naslednjih preglednicah.

Kadar je to mogoče, validacija interno validiranih metod vključuje certificirani referenčni material.

(a) Izvedbena merila za aflatoksine

Merilo	Obseg koncentracije	Priporočena vrednost	Največja dovoljena vrednost
Pribor	Vse	Zanemarljiva	—
Izkoristek – aflatoksin M1	0,01–0,05 µg/kg	60 do 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 do 110 %	
Izkoristek – aflatoksini 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 %	
Obnovljivost RSDR	Vse	Dobljena s Horwitzovo enačbe (*), (**)	2 × vrednost, dobljena s Horwitzovo enačbo (*), (**)

Ponovljivost RSD_r se lahko izračuna kot 0,66-krat obnovljivost RSD_R pri izbrani koncentraciji.

Opomba:

— vrednosti, ki veljajo za B_1 in vsoto $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$,

— če je treba poročati o vsoti posameznih aflatoksinov $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$, mora biti znan odziv posameznega aflatoksina na analitski sistem ali mora biti znana njegova protivrednost.

(b) Izvedbena merila za ohratoksin A

Vsebnost µg/kg	Ohratoksin A		
	RSD_r %	RSD_R %	Izkoristek %
< 1	≤ 40	≤ 60	50 do 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	70 do 110

(c) Izvedbena merila za patulin

Vsebnost µg/kg	Patulin		
	RSD_r %	RSD_R %	Izkoristek %
< 20	≤ 30	≤ 40	50 do 120
20–50	≤ 20	≤ 30	70 do 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 do 105

(d) Izvedbena merila za deoksinivalenol

Vsebnost µg/kg	Deoksinivalenol		
	RSD_r %	RSD_R %	Izkoristek %
> 100 – ≤ 500	≤ 20	≤ 40	60 do 110
> 500	≤ 20	≤ 40	70 do 120

(e) Izvedbena merila za zearalenon

Vsebnost µg/kg	Zearalenon		
	RSD_r %	RSD_R %	Izkoristek %
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 do 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 do 120

(f) Izvedbena merila za fumonizina B_1 in B_2 posamezno

Vsebnost µg/kg	Fumonizina B_1 in B_2 posamezno		
	RSD_r %	RSD_R %	Izkoristek %
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 do 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 do 110

(g) Izvedbena merila za toksina T-2 in HT-2 posamezno

Vsebnost µg/kg	Toksina T-2 in HT-2 posamezno		
	RSD_r %	RSD_R %	Izkoristek %
15–250	≤ 30	≤ 50	60 do 130
> 250	≤ 25	≤ 40	60 do 130

(h) Izvedbena merila za citrinin

Vsebnost µg/kg	Citrinin			
	RSD_r %	Priporočena vrednost RSD_R %	Največja dovoljeno vrednost RSD_R %	Izkoristek %
Vse	0,66 × RSD_R	Dobljena s Horwitzovo enačbo (*) (**)	2 × vrednost, dobljena s Horwitzovo enačbo (*) (**)	70 do 120

(i) Opombe k izvedbenim merilom za mikotoksine

— Meje zaznavnosti uporabljenih metod niso navedene, ker so vrednosti za natančnost dane pri izbranih koncentracijah.

— Vrednosti za natančnost se izračunajo s Horwitzovo enačbo, zlasti izvirno Horwitzovo enačbo (za koncentracije $1{,}2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0{,}138$) (*) in spremenjeno Horwitzovo enačbo (za koncentracije $C < 1{,}2 \times 10^{-7}$) (**).

(*) Horwitzova enačba za koncentracije $1{,}2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0{,}138$:

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

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

(**) Spremenjena Horwitzova enačba (*) za koncentracije $C < 1{,}2 \times 10^{-7}$:

$RSD_R = 22\ \%$

(sklic: *M. Thompson, Analyst, 2000, 125, str. 385–386)*

pri čemer je:

— RSD_R relativni standardni odklon, izračunan iz rezultatov, dobljenih pri pogojih obnovljivosti [(sR/) × 100], in

— C razmerje koncentracije (tj. 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

To je posplošena enačba za natančnost, ki je neodvisna od analita in matrice ter je za vse običajne metode analize odvisna izključno od koncentracije.

4.3.1.2 Pristop ‚ustreznost namenu‘

Za interno validirane metode je lahko pristop ‚ustreznost namenu‘ (***) nadomestni način za ocenjevanje njihove primernosti za uradni nadzor. Metode, primerne za uradni nadzor, morajo dati rezultate, ki predstavljajo standardno merilno negotovost (u), in sicer manjšo od najvišje standardne merilne negotovosti, izračunane z uporabo naslednje formule:

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

pri čemer je:

— *Uf* najvišja standardna merilna negotovost (µg/kg),

— LOD meja zaznavnosti metode (µg/kg),

— α konstanten, numerični faktor, ki se uporabi glede na vrednost C. Vrednosti, ki se uporabljajo, so določene v preglednici v nadaljevanju,

— C izbrana koncentracija (µg/kg).

Če analitska metoda daje rezultate z merilnimi negotovostmi, nižjimi od najvišje standardne negotovosti, je ta metoda enako primerna kot metoda, ki izpolnjuje izvedbena merila iz točke 4.3.1.1.

Preglednica

Numerične vrednosti, ki se uporabljajo za α kot konstanto v formuli iz te točke, glede na izbrano koncentracijo

C (µg/kg)	α
≤ 50	0,2
51–500	0,18
501–1 000	0,15
1 001–10 000	0,12
> 10 000	0,1

(***) Sklic: M. Thompson in R. Wood, Accred. Qual. Assur., 2006, 10, str 471–478.

4.3.2 *Posebne zahteve za delno kvantitativne presejalne metode*

4.3.2.1 Področje uporabe

Področje uporabe se nanaša na bioanalitske metode, ki temeljijo na imunološkem prepoznavanju ali vezavi na receptorje (kot so ELISA, merilne palice, naprave za lateralni vlek, imunski senzorji) in fizikalno-kemijske metode, ki temeljijo na kromatografiji ali neposrednem zaznavanju z masno spektrometrijo (npr. ambientalna masna spektrometrija). Druge metode (npr. tankoplastna kromatografija) niso izključene, če se ustvarjeni signali neposredno nanašajo na izbrane mikotoksine in omogočajo uporabo načela, opisanega v nadaljevanju.

Za metode, pri katerih je rezultat meritev numerična vrednost, na primer (relativni) odziv merilne palice, signal tekočinske kromatografije z masnim spektrometrom itd., se uporabljajo posebne zahteve in običajna statistika.

Zahteve se ne uporabljajo za metode, ki ne dajo numeričnih vrednosti (npr. samo prisotnost oziroma odsotnost črte). Zanje so potrebni drugačni pristopi validacije. Posebne zahteve za te metode so navedene v točki 4.3.3.

Ta dokument opisuje postopke za validacijo presejalnih metod z medlaboratorijsko validacijo, preverjanje učinkovitosti metode, validirane z medlaboratorijsko dejavnostjo, in validacijo presejalne metode v posameznem laboratoriju.

4.3.2.2 Terminologija

Ciljna presejalna koncentracija (STC): izbrana koncentracija za zaznavanje mikotoksina v vzorcu. Če se namerava preskusiti skladnost z regulativnimi omejitvami, je STC enaka veljavni mejni vrednosti. Za ostale namene in v primerih, da mejna vrednost ni določena, STC vnaprej opredeli laboratorij.

Presejalna metoda: pomeni metodo, ki se uporablja za izbor vzorcev, v katerih vrednosti mikotoksinov presegajo ciljno presejalno koncentracijo (STC) z določeno zanesljivostjo. Za namen presejevanja mikotoksinov velja, da je namenu ustrezna 95-odstotna zanesljivost. Rezultat presejalne analize je ‚negativen' ali ‚sumljiv'. Presejalne metode omogočajo stroškovno učinkovito veliko prepustnost vzorcev in tako povečujejo možnosti za odkrivanje novih incidentov z veliko izpostavljenostjo in nevarnostjo za zdravje potrošnikov. Te metode temeljijo na metodah bioanalize, tekočinske kromatografije z masnim spektrometrom ali tekočinske kromatografije z visoko ločljivostjo. Rezultati vzorcev nad izločitveno vrednostjo se preverijo s popolno ponovno analizo izvirnega vzorca s potrditveno metodo.

‚Negativen vzorec' pomeni, da je vsebnost mikotoksina v vzorcu s 95-odstotno zanesljivostjo < STC (to pomeni, da obstaja 5-odstotna verjetnost, da se vzorce nepravilno sporoči kot negativne).

‚Lažen negativen vzorec' pomeni, da je vsebnost mikotoksina v vzorcu > STC, vendar je bil identificiran za negativnega.

‚Sumljiv vzorec' (pozitivno presejanje) pomeni, da vzorec presega izločilno vrednost (glej spodaj) in lahko vsebuje mikotoksin, katerega raven je višja od STC. Vsak sumljiv rezultat sproži potrditveno analizo za nedvoumno identifikacijo in kvantifikacijo mikotoksina.

‚Lažen sumljiv vzorec' je negativen vzorec, ki je bil identificiran za sumljivega.

‚Potrditvene metode' pomenijo metode, ki dajejo celovite ali dodatne informacije, ki omogočajo, da se mikotoksin identificira in po potrebi nedvoumno kvantificira glede na iskano raven.

Izločilna vrednost: odziv, signal ali koncentracija, pridobljena s presejalno metodo, nad katero se vzorec opredeli kot ‚sumljiv'. Izločitev se določi med validacijo in upošteva variabilnost meritev.

Negativen kontrolni vzorec (slepa matrica): vzorec, za katerega je znano, da ne vsebuje ([1]) mikotoksina, ki se ga ugotavlja, npr. na podlagi predhodne določitve z uporabo dovolj zanesljive potrditvene metode. Če praznih vzorcev ni mogoče pridobiti, se lahko uporabi material z najnižjo pridobljivo vrednostjo, če vrednost omogoča ugotovitev, da je presejalna metoda ustrezna namenu.

Pozitiven kontrolni vzorec: vzorec, ki vsebuje ciljno presejalno koncentracijo mikotoksina, npr. certificirani referenčni material, material z znano vsebnostjo (npr. preskusni material iz strokovnega preskušanja) ali na drug način zadostno določen s potrditveno metodo. Če navedeno ne obstaja, se lahko uporabi mešanica vzorcev z različnimi vrednostmi onesnaženja ali primešani vzorec, pripravljen v laboratoriju in zadostno določen, če se lahko dokaže, da je bila potrjena raven onesnaženja.

4.3.2.3 Postopek validacije

Namen validacije je dokazati, da je presejalna metoda ustrezna namenu. Izvede se jo z določitvijo izločitvene vrednosti in določitvijo stopnje lažne negativnosti in lažne sumljivosti. Ta dva parametra zajemata značilnosti učinkovitosti, kot so občutljivost, selektivnost in natančnost.

Presejalne metode se lahko validirajo z medlaboratorijsko validacijo ali validacijo posameznega laboratorija. Če so za določeno kombinacijo mikotoksina/matrice/STC podatki o medlaboratorijski validaciji že na voljo, zadostuje preverjanje učinkovitosti metode v laboratoriju, ki jo izvaja.

4.3.2.3.1 Začetna validacija z validacijo posameznega laboratorija

Mikotoksini:

Validacijo se izvede za vsak posamezni mikotoksin v področju uporabe. V primeru bioanalitskih metod, ki za določeno skupino mikotoksinov dajo kombinirani odziv (npr. aflatoksini B_1, B_2, G_1 in G_2; fumonizina B_1 in B_2), je treba dokazati uporabnost in navesti omejitve navedenega preskusa v okviru področja uporabe metode. Neželena navzkrižna reaktivnost (npr. DON-3-glikozid, 3- ali 15-acetil-DON za imunološke metode za DON) ne velja za povzročiteljico povečanja stopnje lažne negativnosti ciljnih mikotoksinov, lahko pa poveča stopnjo lažne sumljivosti. To neželeno povečanje bo zmanjšano s potrditveno analizo za nedvoumno identifikacijo in kvantifikacijo mikotoksinov.

Matrice:

Začetno validacijo bi bilo treba izvesti za vsak proizvod oz. za vsako skupino proizvodov, če je znano, da se metoda lahko uporabi za več proizvodov. V slednjem primeru se iz te skupine izbere en reprezentativen in ustrezen proizvod (glej preglednico A).

Niz vzorcev:

Za validacijo je potrebnih najmanj 20 homogenih negativnih kontrolnih vzorcev in 20 homogenih pozitivnih kontrolnih vzorcev, ki vsebujejo mikotoksin v koncentraciji STC, analiziranih v pogojih srednje natančnosti (RSD_{Ri}), razporejenih na 5 različnih dni. Neobvezno se lahko k validacijskemu nizu dodajo dodatni nizi 20 vzorcev, ki vsebujejo druge ravni mikotoksina, da se pridobi vpogled v obseg, do katerega lahko metoda razlikuje med posameznimi koncentracijami mikotoksinov.

Koncentracija:

Validacijo je treba izvesti za vsako STC, ki se bo rutinsko uporabljala.

4.3.2.3.2 Začetna validacija z medlaboratorijskim preskušanjem

Validacija z medlaboratorijskim preskušanjem se izvaja v skladu z mednarodno priznanim protokolom o medlaboratorijskem preskušanju (npr. ISO 5725:1994 ali Mednarodnim usklajenim protokolom IUPAC), ki zahteva vključitev veljavnih podatkov iz vsaj osmih različnih laboratorijev. Poleg navedenega je edina razlika v primerjavi z validacijami posameznih laboratorijev v tem, da se lahko ≥ 20 vzorcev na proizvod/vrednost enakomerno razporedi med udeležene laboratorije, vendar najmanj dva vzorca na laboratorij.

([1]) Za vzorce se šteje, da v njih ni analita, če količina, prisotna v vzorcu, ne presega več kot 1/5 STC. Če se vrednost lahko kvantificira s potrditveno metodo, je treba vrednost upoštevati pri oceni validacije.

4.3.2.4 Določitev izločilne vrednosti in stopnje lažnih sumljivih rezultatov praznih vzorcev

(Relativni) odzivi za negativne kontrolne in pozitivne kontrole vzorce se upoštevajo kot podlaga za izračun zahtevanih parametrov.

Presejalne metode, katerih odziv je sorazmeren s koncentracijo mikotoksina

Za presejalne metode, katerih odziv je sorazmeren s koncentracijo mikotoksina, se uporablja naslednje:

$$Izločitev = R_{STC} - t\text{-}vrednost_{0,05} * SD_{STC}$$

R_{STC} = povprečni odziv pozitivnih kontrolnih vzorcev (pri STC)

t-vrednost: enostranska t-vrednost za 5-odstotno stopnjo lažnih negativnih rezultatov (glej preglednico B)

SD_{STC} = standardni odmikPresejalne metode, katerih odziv je obratno sorazmeren s koncentracijo mikotoksina

Podobno se za presejalne metode, katerih odziv je obratno sorazmeren s koncentracijo mikotoksina, izločitev določi kot:

$$Izločitev = R_{STC} + t\text{-}vrednost_{0,05} * SD_{STC}$$

Z uporabo te določene t-vrednosti za določitev izločitvene vrednosti se privzeto določi 5-odstotna stopnja lažnih negativnih rezultatov.

Ocena ustreznosti namenu

Rezultati negativnih kontrolnih vzorcev se uporabijo za oceno ustrezne stopnje lažnih sumljivih rezultatov. T-vrednost se izračuna v skladu z dogodkom, da je rezultat negativnega kontrolnega vzorca nad izločitveno vrednostjo, zaradi česar se napačno opredeli kot sumljiv.

t-vrednost = (izločitev – $povprečje_{prazen}$)/SD_{prazen}za presejalne metode, katerih odziv je sorazmeren s koncentracijo mikotoksina

ali

t-vrednost = ($povprečje_{prazen}$ – izločitev)/SD_{prazen}za presejalne metode, katerih odziv je obratno sorazmeren s koncentracijo mikotoksina

Iz pridobljene t-vrednosti se na osnovi prostostnih stopenj, izračunanih iz števila poskusov, lahko izračuna verjetnost lažnih sumljivih vzorcev za enostransko porazdelitev (npr. funkcija razpredelnice ‚TDIST'), ali pa se vzame iz preglednice za t-porazdelitev.

Ustrezna vrednost enostranske t-porazdelitve določa stopnjo lažnih sumljivih rezultatov.

Ta koncept je podrobno opisan v primeru v Analitski in bioanalitski kemiji DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

4.3.2.5 Razširitev področja uporabe metode

4.3.2.5.1 Razširitev področja uporabe na druge mikotoksine:

Ko se v področje uporabe obstoječe presejalne metode dodajo novi mikotoksini, je potrebna popolna validacija, s katero se dokaže ustreznost metode.

4.3.2.5.2 Razširitev na druge proizvode:

Če je znano ali pričakovano, da je presejalna metoda uporabna za druge proizvode, je treba preveriti njeno veljavnost za te druge proizvode. Če nov proizvod spada v skupino proizvodov (glej preglednico A), za katero je bila že izvedena začetna validacija, zadostuje omejena dodatna validacija. To se izvede z analizo najmanj 10 homogenih negativnih kontrolnih in 10 homogenih pozitivnih kontrolnih (pri STC) vzorcev v pogojih srednje natančnosti. Pozitivni kontrolni vzorci morajo biti nad izločitveno vrednostjo. Če to merilo ni izpolnjeno, je potrebna popolna validacija.

4.3.2.6 Preverjanje metod, ki so bile že validirane z medlaboratorijskim preskušanjem

Za presejalne metode, ki so bile že uspešno validirane z medlaboratorijskim preskušanjem, se preveri učinkovitost metod. To se izvede z analizo najmanj 6 negativnih kontrolnih in 6 pozitivnih kontrolnih (pri STC) vzorcev. Pozitivni kontrolni vzorci morajo biti nad izločitveno vrednostjo. Če to merilo ni izpolnjeno, mora laboratorij izvesti analizo izvornega vzroka, s katero ugotovi, kaj preprečuje skladnost s specifikacijo, pridobljeno v medlaboratorijskem preskušanju. Šele po izvedbi popravnega ukrepa ponovno preveri učinkovitost metode v svojem laboratoriju. Če laboratorij ne more zagotoviti rezultatov medlaboratorijskega preskušanja, mora s popolno validacijo posameznega laboratorija določiti svojo lastno izločitveno vrednost.

4.3.2.7 Stalno preverjanje metode/tekoča validacija metode

Po začetni validaciji se pridobijo dodatni validacijski podatki z vključitvijo vsaj dveh pozitivnih kontrolnih vzorcev v vsako serijo presejanih vzorcev. En pozitivni kontrolni vzorec je znan vzorec (ki je bil npr. uporabljen med začetno validacijo), drugi pa je različen proizvod iz iste skupine proizvodov (če se analizira samo en proizvod, se namesto tega uporabi drugačen vzorec tega proizvoda). Vključitev negativnega kontrolnega vzorca ni obvezna. Rezultati, pridobljeni za navedena dva pozitivna kontrolna vzorca, se dodajo v obstoječi validacijski niz.

Vsaj enkrat na leto se ponovno določi izločitvena vrednost in ponovno oceni veljavnost metode. Stalno preverjanje metode ima več namenov:

— kontrola kakovosti serije presejanih vzorcev,

— zagotavljanje informacij o ponovljivosti metode v pogojih v laboratoriju, ki uporablja metodo,

— utemeljitev uporabnosti metode za različne proizvode,

— omogočanje prilagajanja izločitvene vrednosti v primeru postopnih zdrsov skozi čas.

4.3.2.8 Validacijsko poročilo

Validacijsko poročilo vsebuje:

— izjavo o STC,

— izjavo o pridobljeni izločitveni vrednosti,

Opomba: Izločitvena vrednost mora imeti isto število pomembnih številk kot STC. V numeričnih vrednostih, ki se uporabljajo za izračun izločitvene vrednosti, je potrebna vsaj ena pomembna številka več kot pri STC.

— izjavo o izračunani stopnji lažne sumljivosti,

— izjavo o načinu ustvarjanja stopnje lažne sumljivosti.

Opomba: Izjava o izračunani stopnji lažne sumljivosti kaže, ali metoda ustreza namenu, saj kaže število praznih (ali nizko onesnaženih) vzorcev, ki bodo predmet preverjanja.

Preglednica A

Skupine proizvodov za validacijo presejalnih metod

Skupine proizvodov	Kategorije proizvodov	Tipični reprezentativni vzorci, vključeni v kategoriji
Visoka vsebnost vode	Sadni sokovi	Jabolčni sok, grozdni sok
	Alkoholne pijače	Vino, pivo, jabolčnik
	Koreninasta in gomoljasta zelenjava	Svež ingver
	Žitne ali sadne kaše	Kaše za dojenčke in majhne otroke

Skupine proizvodov	Kategorije proizvodov	Tipični reprezentativni vzorci, vključeni v kategoriji
Visoka vsebnost olja	Drevesni oreški	Orehi, lešniki, kostanji
	Oljna semena in proizvodi iz njih	Oljna repica, sončnice, bombažno seme, soja, arašidi, sezam itd.
	Oljni sadeži in proizvodi iz njih	Olja in paste (npr. arašidovo maslo, tahina)
Visoka vsebnost škroba in/ali beljakovin ter nizka vsebnost vode in maščobe	Žitno zrnje in proizvodi iz njega	Pšenica, rž, ječmen, koruza, riž, oves, polnozrnat kruh, bel kruh, krekerji, žitni kosmiči, testenine
	Dietetični proizvodi	Posušeni prah za pripravo hrane za dojenčke in majhne otroke
Visoka vsebnost kisline in visoka vsebnost vode (*)	Proizvodi iz agrumov	
‚Težavni ali edinstveni proizvodi' (**)		Kakav v zrnu in proizvodi iz njega, kopra in proizvodi iz nje, kava, čaj Začimbe, sladki koren
Visoka vsebnost sladkorja in nizka vsebnost vode	Suho sadje	Fige, rozine, korinte, sultanine
Mleko in mlečni proizvodi	Mleko	Kravje, kozje in bivolje mleko
	Sir	Kravji, kozji sir
	Mlečni proizvodi (npr. mleko v prahu)	Jogurt, smetana

(*) Če se v koraku ekstrakcije uporabi pufer za stabilizacijo sprememb pH, se ta skupina proizvodov lahko združi v eno skupino proizvodov ‚Visoka vsebnost vode'.

(**) ‚Težavni ali edinstveni proizvodi' bi se morali popolnoma validirati le, če se pogosto analizirajo. Če se analizirajo le občasno, se lahko validacija zmanjša zgolj na preverjanje ravni poročanja z uporabo primešanih praznih ekstraktov.

Preglednica B

Enostranska t-vrednost za 5-odstotno stopnjo lažne negativnosti

Prostostne stopnje	Število dvojnikov	t-vrednost (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

Prostostne stopnje	Število dvojnikov	t-vrednost (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 *Zahteve za kvalitativne presejalne metode (metode, ki ne dajo numeričnih vrednosti)*

Za razvoj validacijskih smernic za metode binarnih preskusov so trenutno pristojni razni organi za standardizacijo (npr. AOAC, ISO). AOAC je pred kratkim pripravil smernico v zvezi s to zadevo. Ta dokument se lahko upošteva kot trenutno stanje tehničnega razvoja na tem področju. Zato bi se morale metode, ki dajo binarne rezultate (npr. vizualni pregled preskusov z merilno palico), validirati v skladu s to smernico.

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

4.4 **Ocena merilne negotovosti, izračun izkoristka in poročanje rezultatov** [1]

4.4.1 *Potrditvene metode*

O rezultatih analize je treba poročati na naslednji način:

(a) s popravkom za izkoristek, pri čemer se navede raven popravka. Popravka za izkoristek ni potrebno uporabiti, če je 90–110-odstoten;

(b) kot x +/– U, pri čemer je x rezultat analize in U razširjena nezanesljivost meritve, ob uporabi faktorja za zajetje 2, zaradi katerega je stopnja zanesljivosti približno 95-odstotna.

Za hrano živalskega izvora se lahko merilna negotovost upošteva tudi z določitvijo mejne vrednosti (CCα) v skladu z Odločbo Komisije 2002/657/ES [2] (točka 3.1.2.5 Priloge I – če gre za snovi z določeno dovoljeno mejno vrednostjo).

Vendar če je rezultat analize bistveno (> 50 %) nižji od mejne vrednosti ali bistveno višji od mejne vrednosti (tj. večji od 5-kratnika mejne vrednosti) in je bil uporabljen ustrezen postopek kakovosti ter je namen analize le preverjanje skladnosti z zakonodajnimi določbami, se lahko o rezultatu analize poroča brez popravka za izkoristek, popravek za izkoristek in merilna negotovost pa se lahko v teh primerih izpustita.

[1] Več podrobnosti o oceni merilne negotovosti in postopkih za ocenjevanje izkoristka je v ‚Poročilu o razmerju med rezultati analize, merilno negotovostjo, faktorji izkoristka in določbami zakonodaje EU o hrani in krmi' – http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf.

[2] Odločba Komisije 2002/657/ES z dne 14. avgusta 2002 o izvajanju Direktive Sveta 96/23/ES glede opravljanja analitskih metod in razlage rezultatov (UL L 221, 17.8.2002, str. 8).

Ta pravila o razlagi rezultata analize glede na sprejemljivost ali zavrnitev lota se nanašajo na rezultate analize vzorca, pridobljenega za uradni nadzor. V primeru analize, ki se opravlja za namene pritožbe ali razsojanja, veljajo nacionalna pravila.

4.4.2 *Presejalne metode*

Rezultat presejanja se navede kot skladen ali s sumom na neskladnost.

‚S sumom na neskladnost' pomeni, da vzorec presega izločilno vrednost in lahko vsebuje mikotoksin, katerega raven je višja od STC. Vsak sumljiv rezultat sproži potrditveno analizo za nedvoumno identifikacijo in kvantifikacijo mikotoksina.

‚Skladen' pomeni, da je vsebnost mikotoksina v vzorcu s 95-odstotno zanesljivostjo < STC (to pomeni, da obstaja 5-odstotna verjetnost, da se vzorce nepravilno sporoči kot negativne). Rezultat analize se sporoči kot ‚< raven STC' pri določeni ravni STC."