

**DECRETO MINISTERO DELLA  
SALUTE 23 luglio 2003  
Recepimento della direttiva  
2002/69/CE della Commissione del  
30 luglio 2002 relativa ai metodi di  
campionamento e d'analisi per il  
controllo ufficiale di diossine e la  
determinazione di PCB diossina-  
simili nei prodotti alimentari.**

in G.U. n. 240 del 15-10-2003

**sommario**

Art. 1..... 1

**Allegato 1 METODI DI CAMPIONAMENTO  
PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEI  
LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E LA  
DETERMINAZIONE DI PCB DIOSSINA-  
SIMILI IN TALUNI PRODOTTI  
ALIMENTARI..... 1**

1. Oggetto e campo d'applicazione ..... 2
2. Definizioni..... 2
3. Disposizioni generali ..... 2
  - 3.1. Personale. .... 2
  - 3.2. Prodotto da campionare..... 2
  - 3.3. Precauzioni da prendere..... 2
  - 3.4. Preparazione dei campioni elementari. 3
  - 3.5. Preparazione del campione globale. .... 3
  - 3.6. Preparazione del campione di laboratorio. .... 3
  - 3.7. Preparazione delle aliquote..... 3
  - 3.8. Sigillatura ed etichettatura delle aliquote. .... 3
4. Modalità di prelievo di campioni..... 3
  - 4.1. Numero dei campioni elementari..... 3
5. Conformità della partita o sottopartita alle specifiche..... 3

**Allegato II PREPARAZIONE DEI CAMPIONI  
E SPECIFICHE PER I METODI D'ANALISI  
IMPIEGATI NEL CONTROLLO UFFICIALE  
DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E  
NELLA DETERMINAZIONE DI PCB  
DIOSSINA-SIMILI IN TALUNI PRODOTTI  
ALIMENTARI..... 4**

1. Oggetto e campo d'applicazione ..... 4
2. Contesto..... 4
3. Requisiti per la garanzia della qualità da applicarsi nella preparazione dei campioni..... 4
4. Requisiti applicabili ai laboratori..... 5
5. Requisiti applicabili alla procedura d'analisi ..... 5
6. Requisiti specifici applicabili ai metodi d'analisi GC/MS con finalità di screening o di conferma ..... 5
7. Metodi d'analisi di screening. .... 6

- 7.1. Introduzione..... 6
- 7.2. Requisiti per i metodi d'analisi utilizzati per lo screening. .... 7
- 7.3. Requisiti specifici per i saggi biologici in vitro. .... 7
- 7.4. Requisiti specifici per i saggi biologici effettuati con kit (1)..... 7
8. Comunicazione dei risultati ..... 7

**IL MINISTRO DELLA SALUTE**

Vista la direttiva 2002/69/CE della Commissione del 30 luglio 2002 che stabilisce i metodi di campionamento e d'analisi per il controllo ufficiale di diossine e la determinazione di PCB diossina-simili nei prodotti alimentari;

Visto il regolamento CE n. 466/2001 della Commissione dell'8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari;

Visto il regolamento CE n. 2375/2001 del Consiglio del 29 novembre 2001 recante modifica del regolamento CE n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari;

Visto l'art. 21 della legge 30 aprile 1962, n. 283;

Visto il decreto del Presidente della Repubblica 26 marzo 1980, n. 327, ed in particolare l'art. 9;

Visto il parere della Commissione per la determinazione dei metodi ufficiali di analisi di cui all'art. 21 della legge 30 aprile 1962, n. 283, espresso nella seduta del 5 giugno 2003;

Decreta:

**Art. 1.**

1. Il controllo ufficiale di diossine e la determinazione di PCB diossina-simili nei prodotti alimentari deve essere effettuato secondo i metodi di campionamento e di analisi riportati negli allegati.

Il presente decreto sarà trasmesso alla Corte dei conti per la registrazione e sarà pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana.

Roma, 23 luglio 2003

Il Ministro: Sirchia

Registrato alla Corte dei conti l'11 settembre 2003  
Ufficio di controllo preventivo sui Ministeri dei servizi alla persona e dei beni culturali, registro n. 4, foglio n. 325

***Allegato 1 METODI DI  
CAMPIONAMENTO PER IL  
CONTROLLO UFFICIALE DEI  
LIVELLI DI DIOSSINE  
(PCDD/PCDF) E LA  
DETERMINAZIONE DI PCB***

## **DIOSSINA-SIMILI IN TALUNI PRODOTTI ALIMENTARI**

### **1. Oggetto e campo d'applicazione**

I campioni destinati al controllo ufficiale del tenore di diossine (PCDD/PCDF) e PCB diossina-simili (1) nei prodotti alimentari devono essere prelevati secondo le modalità di seguito indicate. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi delle partite o sottopartite da cui sono stati prelevati. La conformità al tenore massimo stabilito dal regolamento (CE) n. 466/2001 e successive modifiche è determinata in base ai valori riscontrati nelle aliquote.

### **2. Definizioni**

2.1. Partita: quantitativo di prodotto alimentare identificabile, consegnato in un'unica volta, per il quale è stata accertata, dall'addetto al controllo ufficiale, la presenza di caratteristiche comuni, quali l'origine, la varietà, il tipo di imballaggio, il confezionatore, lo spedizioniere o la marcatura. Nel caso di partite di prodotti della pesca si deve tenere conto anche della dimensione del pesce stesso.

2.2. Sottopartita: porzione di una partita designata per l'applicazione delle modalità di prelievo. Ciascuna sottopartita deve essere fisicamente separata e identificabile.

2.3. Campione elementare: quantitativo di materiale prelevato in un solo punto della partita o della sottopartita.

2.4. Campione globale: campione ottenuto riunendo tutti i campioni elementari prelevati dalla partita o dalla sottopartita.

2.5. Campione di laboratorio: campione destinato al laboratorio da suddividere in cinque aliquote da destinare alle analisi.

2.6. Aliquota: porzione ottenuta dal campione di laboratorio e corrispondente ad un quinto del campione di laboratorio.

-----

(1) Si riporta la tabella TEF del rischio stabilita dall'OMS sulla base delle conclusioni dell'incontro di Stoccolma del 15-18 giugno 1997 [Van den Berg et al., 1998, «Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife», *Environmental Health Perspectives*, 106 (12) pag. 775].

#### **Tabella TEF**

Congenere	Valore TEF
-----	
Policlorodibenzodiossine (PCDD)	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1

1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0001
Dibenzofurani (PCDF)	
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,0001
PCB diossina-simili Non orto PCB + Mono orto PCB	
Non orto PCB	
PCB 77	0,0001
PCB 81	0,0001
PCB 126	0,1
PCB 169	0,01
Mono orto PCB	
PCB 105	0,0001
PCB 114	0,0005
PCB 118	0,0001
PCB 123	0,0001
PCB 156	0,0005
PCB 157	0,0005
PCB 167	0,00001
PCB 189	0,0001

#### Abbreviazioni:

T = tetra;

Pe = penta;

Hx = esa;

Hp = epta;

O = octa;

CDD = clorodibenzodiossina;

CDF = clorodibenzofurano;

CB = clorobifenile.

### **3. Disposizioni generali**

#### **3.1. Personale.**

Il prelievo dei campioni deve essere effettuato da personale qualificato che deve operare secondo le modalità del presente allegato.

#### **3.2. Prodotto da campionare.**

Ciascuna partita da controllare è oggetto di campionamento separato.

#### **3.3. Precauzioni da prendere.**

Durante il campionamento e la preparazione dei campioni di laboratorio è necessario evitare qualsiasi alterazione che possa modificare il tenore di diossine e di PCB diossina-simili e

compromettere l'analisi o la rappresentatività del campione globale.

### **3.4. Preparazione dei campioni elementari.**

I campioni elementari devono essere prelevati, per quanto possibile, in vari punti distribuiti nella partita o sottopartita.

Qualsiasi deroga a tale norma deve essere segnalata nel verbale di cui al punto 3.8.

### **3.5. Preparazione del campione globale.**

Il campione globale deve avere il peso di almeno un chilo, a meno che ciò non sia possibile, come nel caso di campionamento di prodotti alimentari in confezioni singole. In quest'ultimo caso si applicano le disposizioni della tabella 2.

### **3.6. Preparazione del campione di laboratorio.**

Il campione di laboratorio, rappresentativo del campione globale, deve essere suddiviso in aliquote uguali conformemente alle disposizioni di cui ai punti 3.7 e 3.8 del presente allegato.

### **3.7. Preparazione delle aliquote.**

Le dimensioni di ciascuna aliquota devono essere tali da consentire almeno lo svolgimento di analisi in duplicato.

Ogni aliquota deve essere collocata in un recipiente pulito, di materiale inerte, che la protegga adeguatamente contro qualsiasi fattore di contaminazione, da perdita di analiti per assorbimento nella parete interna del recipiente e dai danni che potrebbero essere causati dal trasporto.

### **3.8. Sigillatura ed etichettatura delle aliquote.**

Ogni aliquota viene sigillata sul luogo del prelievo e identificata secondo le modalità del decreto del Presidente della Repubblica n. 327/1980. Per ciascun prelievo di campione, si redige un verbale di campionamento che consenta di identificare con certezza la partita campionata, la data e il luogo di campionamento, nonché qualsiasi informazione supplementare che possa essere utile all'analista.

## **4. Modalità di prelievo di campioni**

Il metodo di prelievo applicato deve assicurare che il campione globale sia rappresentativo della partita che deve essere controllata.

### **4.1. Numero dei campioni elementari.**

Nel caso del latte e degli oli per i quali è lecito presumere che i contaminanti siano distribuiti in modo omogeneo nelle partite, è sufficiente prelevare tre campioni elementari per partita che costituiscono il campione globale di ogni partita.

Per gli altri prodotti alimentari, il numero minimo di campioni elementari da prelevare per partita è indicato alla tabella 1.

Il peso del campione globale che raggruppa tutti i campioni elementari deve essere almeno di 1 kg (cfr. punto 3.5). I campioni elementari devono

avere un peso analogo. Il peso di un campione elementare deve essere almeno 100 grammi e dipende dalle dimensioni dei componenti della partita. Qualsiasi deroga a tale norma va segnalata nel verbale di cui al punto 3.8. Secondo quanto disposto dalla decisione 97/747/CE della Commissione, del 27 ottobre 1997, che fissa i livelli e le frequenze di prelievo di campioni, previsti dalla direttiva 96/23/CE recepita con il decreto legislativo 4 agosto 1999, n. 336.

Un campione di uova di gallina è costituito da almeno 12 uova.

Nel caso di partite sfuse e di partite formate da confezioni singole, si vedano le tabelle 1 e 2.

**Tabella 1: Numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita**

Peso della partita (in kg)	Numero minimo di campioni elementari da prelevare
< 60	3
da 50 a 500	5
> 500	10

Se la partita è costituita da confezioni singole, il numero di confezioni che va prelevato per formare un campione globale è indicato nella tabella 2.

**Tabella 2: Numero di confezioni (campioni elementari) da prelevare per formare un campione globale se la partita consiste in confezioni singole.**

Numero di confezioni o unità della partita	Numero minimo di confezioni o unità da prelevare per aliquota
da 1 a 25	1 confezione o unità
da 26 a 100	Circa il 5%, almeno due confezioni o unità
> 100	Circa il 5%, fino ad un massimo di 10 confezioni o unità

## **5. Conformità della partita o sottopartita alle specifiche.**

La partita è conforme se il risultato dell'analisi cade al di sotto del 20% del tenore massimo stabilito dal regolamento (CE) n. 466/2001, e successive modifiche; viceversa la partita non è conforme se tale risultato cade al di sopra del 20%.

Nel caso in cui il risultato dell'analisi sia compreso tra  $\pm 20\%$  del tenore massimo ammissibile, il laboratorio del controllo ufficiale deve ripetere l'analisi sull'aliquota e calcolare la media dei risultati così ottenuti. La partita è conforme se il valore della media è uguale o inferiore al livello massimo ammissibile fissato dal regolamento (CE) n. 466/2001 e successive modifiche.

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

**1. Oggetto e campo d'applicazione**

Queste specifiche si applicano all'analisi di prodotti alimentari nell'ambito del controllo ufficiale del tenore di diossine [policlorodibenzodiossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF)] e della determinazione di PCB diossina-simili.

Il controllo della presenza di diossine nei prodotti alimentari può essere effettuato mediante una strategia che preveda un metodo di screening per selezionare quei campioni i cui livelli di diossine e di PCB diossina-simili siano superiori ai tenori massimi consentiti dal regolamento n. 466/2001 e successive modifiche o inferiori non oltre il 30-40% di tali tenori. Occorre poi determinare/confermare la concentrazione di diossine in tali campioni tramite un metodo di conferma.

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

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

**2. Contesto**

Poiché i campioni ambientali e biologici (inclusi i campioni di prodotti alimentari) generalmente contengono miscele complesse di diversi congeneri di diossine, per agevolare la valutazione dei rischi è stato elaborato il concetto di fattori di tossicità equivalente (TEF). Tali TEF consentono di esprimere concentrazioni di miscele di PCDD e

PCDF sostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e, di recente, alcune forme di PCB non orto e orto clorosostituiti aventi proprietà simili a quelle delle diossine in equivalenti tossici (TE) di 2,3,7,8-TCDD (cfr. nota 1, allegato I).

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

Per il calcolo del «valore superiore», si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non qualificato sia uguale alla soglia di determinazione.

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

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

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

Occorre adottare tutte le precauzioni possibili per evitare qualsiasi contaminazione durante ogni fase del campionamento e dell'analisi.

I campioni devono essere conservati e trasportati in appositi contenitori di vetro, alluminio, polipropilene o polietilene, dopo avere rimosso eventuali tracce di polvere di carta dal contenitore.

Gli strumenti in vetro devono essere risciacquati con solventi sottoposti a un controllo volto a determinare la presenza di diossine. In generale i contenitori devono essere preferibilmente «monouso».

La conservazione e il trasporto devono svolgersi in modo da preservare l'integrità del campione alimentare.

Se necessario, tritare e mescolare bene ogni aliquota ricorrendo a un metodo che garantisca una completa omogeneizzazione (ad esempio, la triturazione deve consentire al materiale di passare attraverso un setaccio a maglie di 1 mm); prima della triturazione, i campioni devono essere essiccati, nel caso il livello di umidità sia troppo elevato.

Il peso del campione utilizzato per l'estrazione deve essere tale da rispondere ai requisiti relativi alla sensibilità del metodo.

Esistono numerose procedure specifiche per la preparazione dei campioni, che possono essere impiegate in modo soddisfacente per i prodotti considerati. Le procedure devono essere convalidate in base a orientamenti riconosciuti sul piano internazionale.

Occorre fare un'analisi del bianco, ovvero effettuare l'intera procedura analitica senza il campione.

#### 4. Requisiti applicabili ai laboratori

I laboratori devono dimostrare la validità del metodo nell'intervallo di tolleranza del livello considerato, ad esempio, 0,5x, 1x e 2x il livello considerato, con un coefficiente di variazione accettabile per analisi ripetute. Per ulteriori informazioni su criteri di validità, cfr. il punto 5.

Il limite di quantificazione per un metodo di conferma non deve essere superiore a un quinto del livello considerato, per garantire coefficienti di variazione accettabili nell'intervallo summenzionato.

Si devono costantemente effettuare controlli in bianco ed esperimenti o analisi dei campioni di controllo con l'aggiunta di indicatori (di preferenza, se disponibile, materiale di riferimento certificato), quali misure interne di garanzia della qualità.

La riuscita partecipazione a studi condotti in collaborazione con altri laboratori che valutano la competenza del laboratorio è il modo migliore per dimostrarne la perizia nell'ambito di analisi specifiche. Tuttavia, il buon esito della partecipazione a studi condotti con altri laboratori, ad esempio, su campioni di terreno o di acque residue, non dimostra necessariamente che il laboratorio sia altrettanto competente a trattare campioni di prodotti alimentari o mangimi, caratterizzati da livelli di contaminazione minore. E' pertanto requisito imprescindibile la partecipazione regolare a studi condotti in collaborazione con altri laboratori sulla determinazione di diossina e di PCB diossina-simili nelle corrispondenti matrici di prodotti alimentari/mangimi.

In conformità con quanto prescritto dal decreto legislativo 26 maggio 1997, n. 156 i laboratori devono essere accreditati da un organismo riconosciuto, che certifichi l'applicazione della garanzia della qualità relativamente ai metodi d'analisi. I laboratori devono essere accreditati in base alla norma ISO/IEC/17025:1999.

#### 5. Requisiti applicabili alla procedura d'analisi

Requisiti di base di validità delle procedure d'analisi:

elevata sensibilità e limiti di rilevabilità bassi. Per quanto concerne le PCDD e i PCDF, le quantità rilevabili devono essere dell'ordine del picogrammo di TE (10-12 g), data l'estrema tossicità di alcuni di questi composti. E' noto che i PCB si presentano in quantità più elevate rispetto alle PCDD e ai PCDF.

Per quanto concerne la maggior parte dei congeneri di PCB, una sensibilità dell'ordine del nanogrammo (10-9 g) è sufficiente.

Tuttavia, per la determinazione dei congeneri più tossici di PCB diossina-simili (in particolare i congeneri non orto sostituiti) si deve ottenere la stessa sensibilità delle PCDD e dei PCDF;

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

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

I metodi di screening possono comprendere saggi biologici e metodi GC/MS, mentre i metodi di conferma sono costituiti dalla gascromatografia ad alta risoluzione e dalla spettrometria ad alta risoluzione (HRGC/HRMS).

Si devono osservare i seguenti criteri per il valore totale in TE:

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

#### 6. Requisiti specifici applicabili ai metodi d'analisi GC/MS con finalità di screening o di conferma.

Quale primo passo dell'analisi, da effettuare, ad esempio prima dell'estrazione per convalidare la procedura d'analisi, occorre aggiungere standard interni di PCDD/F clorosostituiti alla posizione 2,3,7,8 e marcati con <sup>13</sup>C (e standard interni di PCB diossina-simile marcati con <sup>13</sup>C, se si devono

determinare PCB diossina-simili). Va aggiunto almeno un congenere per ciascun gruppo omologo di PCDD/F da tetra a octaclorati (e almeno un congenere per ciascun gruppo omologo di PCB diossina-simile, se si devono determinare PCB diossina-simili) (in alternativa, è possibile aggiungere almeno un congenere per ciascuna funzione di registrazione di ioni selezionati tramite spettrografia di massa utilizzata per il controllo di PCDD/F e PCB diossina-simile. Si consiglia vivamente, soprattutto per i metodi di conferma, di utilizzare l'insieme dei 17 standard interni di PCDD/F clorosostituiti alle posizioni 2,3,7,8 marcati con <sup>13</sup>C, nonché la totalità dei dodici standard interni di PCB diossina-simile marcati con <sup>13</sup>C (nel caso si debbano determinare PCB diossina-simili).

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

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

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

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

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

La separazione gascromatografica degli isomeri deve essere adeguata (overlapping &60; 25% tra 1,2,3,4,7,8-HxCDD e 1,2,3,6,7,8-HxCDD).

Per la determinazione, si consiglia di fare riferimento al metodo «EPA Method 1613, Revision B: Tetra-trough Octachlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC-HRMS», o

ad un altro metodo con criteri di rendimento equivalenti.

La differenza tra il livello massimo e il livello minimo non deve essere superiore al 20% per i prodotti alimentari con una contaminazione da diossina di circa 1 pg. WHO/TE/g di base lipidica (tenendo conto unicamente di PCDD/PCDF). La stessa prescrizione si applica ai prodotti alimentari a basso contenuto di grasso che presentano livelli di contaminazione dell'ordine di circa 1 pg. WHO/TE/g di prodotto. Per livelli di contaminazione inferiori, ad esempio 0,50 pg. TE/g di prodotto, la differenza tra il livello massimo e il livello minimo può essere dell'ordine del 25-40%.

## **7. Metodi d'analisi di screening.**

### **7.1. Introduzione.**

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

#### **Approccio di screening.**

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

#### **Requisiti.**

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

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

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

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

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

#### **Approccio quantitativo.**

L'approccio quantitativo comprende obbligatoriamente una serie di diluizioni-tipo, un processo di purificazione e di misurazione doppio o

triplo, nonché analisi in bianco e controlli di recupero. Il risultato può essere espresso in TE, dando per scontato che i composti responsabili del segnale soddisfano il principio di TE. A tal fine, si può impiegare la TCDD (o una miscela-tipo di diossine/furani) per elaborare una curva di taratura che consenta di calcolare il livello di TE nell'estratto e, di conseguenza, nel campione. Tale risultato è poi corretto con il livello di TE calcolato per un campione in bianco (per tenere conto di impurezze derivanti dai solventi e dalle sostanze chimiche utilizzate) e per il recupero (quest'ultima quantità è calcolata a partire dal livello di TE in un campione di controllo qualità la cui concentrazione è equivalente a quella del livello massimo considerato). E' fondamentale tenere conto che una parte della perdita apparente del recupero può essere dovuta agli effetti della matrice e/o alle differenze tra i valori dei TEF nei biotest e i valori dei TEF ufficiali stabiliti dall'OMS.

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

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

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

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

### **7.3. Requisiti specifici per i saggi biologici in vitro.**

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

Per i risultati del saggio biologico in un intervallo di tempo costante, è opportuno usare una concentrazione di riferimento di TCDD (circa 3x il limite di determinazione) su un modulo di controllo

della qualità. In alternativa, si può utilizzare la risposta relativa di un campione di riferimento paragonata a una curva di taratura di TCDD, dato che la risposta delle cellule può dipendere da molteplici fattori.

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

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

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

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

### **7.4. Requisiti specifici per i saggi biologici effettuati con kit (1).**

Occorre seguire le istruzioni del fabbricante relative alla preparazione dei campioni e alle analisi.

Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza indicata.

Non si devono utilizzare materiali o componenti previsti per altri kit.

I kit vanno conservati e utilizzati alle condizioni di temperatura di conservazione e di impiego indicate.

Il limite di rilevazione per gli immunodosaggi è pari alla somma della media e 3x lo scarto tipo, basandosi su 10 analisi ripetute del bianco, diviso per il valore della pendenza dell'equazione di regressione lineare.

E' opportuno impiegare standard di riferimento per le prove di laboratorio, al fine di garantire che la risposta allo standard rientri in un intervallo di valori accettabile.

## **8. Comunicazione dei risultati.**

A condizione che il metodo d'analisi impiegato lo consenta, i risultati dell'analisi devono contenere i livelli dei singoli congeneri di PCDD/F e PCB,

nonché essere indicati come limite inferiore, limite superiore e valore intermedio, onde fornire la maggiore quantità di dati possibile e permettere così di interpretare i risultati in base alle prescrizioni specifiche.

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

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

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

---

**note**

---

***Id.1.669***