

La Decisione 2002/657/CE in materia di residui

L.Palleschi, C.Ferranti
Istituto Superiore di Sanità

Corso

**Le disposizioni in materia di sicurezza alimentare applicate ai
Laboratori Accreditati**

15-16 novembre 2011

organizzato da

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

E

ACCREDIA

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

del 12 agosto 2002

che attua la Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati

OBIETTIVI:

- **Garantire l'attuazione armonizzata della Direttiva 96/23/CE concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti**
- **Assicurare la qualità e comparabilità dei risultati analitici prodotti dai laboratori di controllo ufficiale per i residui**



- ✓ **Metodi validati in accordo a procedure e criteri di rendimento comuni**
 - ✓ **Criteri comuni per l'interpretazione dei risultati**
 - ✓ **Limiti minimi di rendimento richiesti (LMRR) dei metodi analitici**
 - ✓ **Assicurazione della qualità dei risultati delle prove**

COMMISSION DECISIONE 2002/657/EC

Article 1 SUBJECT MATTER AND SCOPE

This Decision provides rules for the analytical methods to be used in the testing of official samples taken pursuant to Article 15, second sentence, of Directive 96/23/EC and specifies common criteria for the interpretation of analytical results of official control laboratories for such samples.

This Decision shall not apply to substances for which more specific rules have been laid down in other Community legislation

SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008

GUIDELINES FOR THE IMPLEMENTATION OF DECISION 2002/657/EC REGARDING SOME CONTAMINANTS

(MYCOTOXINS, DIOXINS AND DIOXIN-LIKE PCBS AND HEAVY METALS)

Reg.(CE) 401/2006 relativo ai metodi di campionamento ed analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari (modificato dal Reg.(CE) 178/2010).

Reg.(CE) 1883/2006 che stabilisce metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei livelli di diossine e di PCB diossina-simili in alcuni prodotti alimentari.

Reg.(CE) 333/2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari (modificato dal Reg.(CE) 836/2011).

Direttiva 96/23/CE

del Consiglio del 29 aprile 1996

concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti

ALLEGATO I

CATEGORIA A :

Sostanze ad effetto anabolizzante e non autorizzate

A1 stilbeni

A2 tireostatici

A3 steroidi (ormoni naturali, sintetici e cortisonici)

A4 lattoni dell'acido resorcilico (zeranolo)

A5 β -agonisti

A6 sostanze incluse nell'allegato IV del Reg. (CEE) 2377/90 (abrogato dal Reg. (CE) 470/2009, gli allegati sono rimasti immodificati fino all'entrata in vigore del Reg. (UE) 37/2010).

CATEGORIA B:

Medicinali veterinari e agenti contaminanti

B1 sostanze antibatteriche

B2a antielmintici

B2b coccidiostatici

B2c carbammati e piretroidi

B2d tranquillanti

B2e antinfiammatori non steroidei

B2f altre sostanze farmacologicamente attive

B3a organoclorurati e PCB

B3b organofosforati

B3c elementi chimici

B3d micotossine

B3e coloranti (*verde malachite in A6*)

LMR (LIMITE MASSIMO DI RESIDUO)

concentrazione massima del residuo di una sostanza farmacologicamente attiva che può essere autorizzata negli alimenti di origine animale

SOSTANZE CON LMR

(sostanze elencate nella Tabella 1 dell'Allegato al Reg. (UE) 37/2010).

SOSTANZE SENZA LMR

- **Sostanze per le quali non possono essere fissati livelli massimi in quanto i residui di tali sostanze costituiscono un rischio per la salute umana indipendentemente dal limite fissato (sostanze elencate nella Tabella 2 dell'Allegato al Reg.(UE) 37/2010).**
 - **Sostanze proibite dalla Direttiva 96/22/CE modificata dalla Direttiva 2003/74/CE (“DIRETTIVA ORMONI”).**
 - **Sostanze mai valutate/mai autorizzate nell'Unione Europea.**

REGOLAMENTO (UE) N. 37/2010 DELLA COMMISSIONE

del 22 dicembre 2009

concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale.

ALLEGATO

Elenco delle sostanze farmacologicamente attive e loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui (LMR).

Tabella 1

SOSTANZE CONSENTITE

Tabella 2

SOSTANZE VIETATE

Nella Tabella 1 sono contenute le sostanze consentite elencate negli allegati I, II, III del Reg. (CEE) 2377/90 (non sono tuttavia inclusi i limiti massimi di residuo provvisori stabiliti nell'allegato III di detto Regolamento per i quali il periodo di validità è scaduto).

Nella Tabella 2 sono contenute le sostanze vietate elencate nell'allegato IV del Reg. (CEE) 2377/90.

COMMISSION DECISION 2002/657/EC

Article 3

ANALYTICAL METHODS

The Member States shall ensure that official samples taken pursuant to Directive 96/23/EC are analysed using methods that:

- a) are documented in test instructions, preferably according to ISO 78-2;
- b) comply with Part 2 of the Annex to this Decision;
- c) have been validated according to the procedures described in Part 3 of the Annex;
- d) comply with the relevant minimum required performance limits (MRPL) to be established in accordance with Article 4.

COMMISSION DECISIONE 2002/657/EC

Article 4

MINIMUM REQUIRED PERFORMANCE LIMITS

The present Decision shall be reviewed to progressively establish the minimum required performance limits (MRPL) of analytical methods to be used for substances for which no permitted limit has been established.

LMRR

(LIMITE MINIMO DI RENDIMENTO RICHIESTO)

contenuto minimo di analita in un campione che deve essere rilevato e confermato.

Tale limite è volto ad armonizzare il rendimento analitico dei metodi per le sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito.

Decisioni 2003/181/CE e 2004/25/CE

Cloramfenicolo: 0,3 ppb (ng/g)

(carni, uova, latte, urina, prodotti dell'acquacoltura, miele)

Metaboliti di nitrofurani: 1 ppb (ng/g)

(carni di pollame, prodotti dell'acquacoltura)

Medrossiprogesterone acetato: 1 ppb (ng/g)

(grasso surrenale suino)

Somma di verde malachite e di verde leucobase: 2 ppb (ng/g)

(carni dei prodotti dell'acquacoltura)

Decisione 2005/34/CE (da limite minimo di rendimento richiesto a valore di riferimento per l'azione) stabilisce norme armonizzate per i test di rilevamento di taluni residui nei prodotti di origine animale importati dai paesi terzi.

COMMISSION DECISIONE 2002/657/EC

Article 5

QUALITY CONTROL

The Member States shall ensure the quality of the results of the analysis of samples taken pursuant to Directive 96/23/EC, in particular by monitoring tests and/or calibration results according to Chapter 5.9 of ISO 17025.



**ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ DEI RISULTATI DI PROVA E
DI TARATURA**

COMMISSION DECISION 2002/657/EC

Article 6 INTERPRETATION OF RESULTS

1. The result of an analysis shall be considered non compliant if the decision limit of the confirmatory method for the analyte is exceeded.
2. If a permitted limit has been established for a substance, the decision limit is the concentration above which it can be decided with a statistical certainty of $1 - \alpha$ that the permitted limit has been truly exceeded.
3. If no permitted limit has been established for a substance, the decision limit is the lowest concentration level at which a method can discriminate with a statistical certainty of $1 - \alpha$ that the particular analyte is present.
4. For substances listed in Group A of Annex I to Directive 96/23/EC, the α error shall be 1 % or lower. For all other substances, the α error shall be 5 % or lower.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

ALLEGATO

CRITERI DI RENDIMENTO, ALTRE PRESCRIZIONI E PROCEDURE PER I METODI ANALITICI

1. DEFINIZIONI

CARATTERISTICA DI RENDIMENTO: qualità funzionale che può essere attribuita ad un metodo analitico. Può riguardare ad esempio la specificità, l'accuratezza, l'esattezza, la precisione, la ripetibilità, la riproducibilità, il recupero, la capacità di rilevazione e la robustezza.

CRITERIO DI RENDIMENTO: prescrizione per una caratteristica di rendimento in base alla quale è possibile stabilire che il metodo analitico è adeguato e che genera risultati affidabili.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

PARTE 2 “CRITERI DI RENDIMENTO E ALTRE PRESCRIZIONI PER I METODI ANALITICI”

**È possibile utilizzare metodi analitici o
combinazioni di metodi diversi
da quelli descritti ai fini di screening o di
conferma solo nel caso in cui sia
possibile dimostrare il rispetto delle
prescrizioni pertinenti stabilite nella
decisione.**

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

2.1 PRESCRIZIONI GENERALI

2.1.2.1 RECUPERO

Se viene impiegato un fattore fisso di correzione del recupero, il recupero deve essere determinato durante l'analisi dei campioni per ciascun lotto di campioni. Se il recupero è entro i limiti potrà essere impiegato il fattore di correzione fisso; in caso contrario si impiega il fattore di recupero ottenuto per quel lotto specifico, a meno che non si debba applicare il fattore di recupero specifico dell'analita nel campione, nel qual caso è utilizzato il metodo di addizione standard o uno standard interno per la determinazione quantitativa di un analita in un campione.

SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008
GUIDELINES FOR THE IMPLEMENTATION OF DECISION 2002/657/EC
La correzione dei dati per il recupero deve essere applicata a tutti i risultati sia durante la validazione che nell'applicazione del metodo. Questa prescrizione non si applica ai metodi qualitativi.

TRANNE NEL CASO IN CUI

STANDARD INTERNO ADEGUATO (forme stabili dell'analita marcate con isotopi oppure composti correlati in modo strutturale all'analita) e CURVA DI TARATURA IN MATRICE oppure
METODO DI ADDIZIONE STANDARD.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

2.2 METODI DI SCREENING

METODO DI SCREENING: metodo utilizzato per rilevare la presenza di una sostanza o di una classe di sostanze al livello di interesse (elevato numero di campioni in tempi brevi, basso tasso di falsi conformi).

Per finalità di screening possono essere utilizzate solo quelle tecniche la cui validazione possa essere dimostrata e che al livello di interesse presentino un tasso di falsi conformi inferiore al 5 % (errore $\beta < 5 \%$).

Nel caso di un sospetto risultato non conforme, tale risultato è confermato per mezzo di un metodo di conferma.

La decisione non riporta istruzioni dettagliate su come validare i metodi di screening



**GUIDELINES FOR THE VALIDATION OF SCREENING METHODS FOR
RESIDUE OF VETERINARY MEDICINES**

(INITIAL VALIDATION AND TRASFER)

COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES RESIDUES (CRLS)

20.01.2010

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

2.3 METODI DI CONFERMA PER RESIDUI E CONTAMINANTI ORGANICI

METODO DI CONFERMA: fornisce informazioni sulla struttura chimica dell'analita, al fine di identificare l'analita in modo univoco e, se necessario, quantificarlo al livello di interesse.

I metodi basati esclusivamente sull'analisi cromatografica senza l'uso della rilevazione spettrometrica non sono adeguati all'impiego come metodi di conferma senza il ricorso ad altri metodi.

Per i metodi di conferma per i residui ed i contaminanti organici vengono stabilite le tecniche di misurazione per le categorie di sostanza e le relative limitazioni nell'applicazione.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

TAB. 1 “METODI DI CONFERMA ADEGUATI PER RESIDUI E CONTAMINANTI ORGANICI”

Tecnica di misurazione	Sostanze allegato I 96/23/CE	Limitazioni
LC o GC con rilevazione attraverso spettrometria di massa	Gruppo A e B	Solo in seguito a una separazione cromatografica on-line o off-line Solo se vengono impiegate tecniche a scansione completa o si utilizzano almeno 3 (per il gruppo B) o 4 (per il gruppo A) punti di identificazione per le tecniche che non registrano gli spettri completi della massa
LC o GC con rilevazione attraverso spettrometria a infrarossi	Gruppo A e B	Nella spettrometria a infrarossi è necessario rispettare le prescrizioni specifiche per l'assorbimento
LC a scansione totale (DAD)	Gruppo B	Nella spettrometria a raggi ultravioletti è necessario rispettare requisiti specifici per l'assorbimento
LC-fluorescenza	Gruppo B	Solo per le molecole che presentano una fluorescenza nativa e le molecole che presentano fluorescenza dopo trasformazione o derivazione
2-D TLC-UV/VIS a scansione completa	Gruppo B	La HPTLC bidimensionale e la co-cromatografia sono obbligatorie
GC con rilevamento della cattura degli elettroni	Gruppo B	Solo se vengono utilizzate colonne di polarità differente
LC-immunogramma	Gruppo B	Solo se vengono impiegati almeno due sistemi cromatografici differenti oppure un secondo metodo di rilevazione indipendente
LC-UV/VIS (lunghezza d'onda unica)	Gruppo B	Solo se vengono impiegati almeno due sistemi cromatografici differenti oppure un secondo metodo di rilevazione indipendente

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

E

SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008

GUIDELINES FOR THE IMPLEMENTATION OF DECISION 2002/657/EC

2.3.1 CRITERI DI RENDIMENTO COMUNI E PRESCRIZIONI

Al fine di garantire il **controllo di qualità** del risultato analitico si raccomanda di introdurre in ogni serie analitica un campione di controllo fortificato ad una concentrazione prossima all'LMRR o all'LMR o per sostanze vietate o non autorizzate al CC β (campione non conforme)

nonché un campione conforme e un bianco reagente

(ordine suggerito di inserimento degli estratti nello strumento di analisi: reagente bianco, campione di controllo conforme, campione/i sottoposto/i a conferma, campione di controllo conforme e campione di controllo non conforme).

Standard interno (in alternativa co-cromatografia).

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

2.3.2.1 ESATTEZZA PER I METODI DI ANALISI QUANTITATIVI

L'esattezza dei metodi quantitativi viene calcolata mediante analisi ripetute di un materiale di riferimento certificato (MRC) o in sua assenza, in termini di recupero, di un materiale bianco fortificato con l'analita/gli analiti di interesse.

La deviazione del valore medio, ottenuto sperimentalmente e corretto per il recupero, dal valore di riferimento è accettabile se rientra negli intervalli stabiliti.

TABELLA 2 "ESATTEZZA MINIMA DEI METODI QUANTITATIVI"

Frazione di massa	Intervallo
$\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	-50 % a +20 %
$> 1 \mu\text{g}/\text{kg} \div 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	-30 % a +10 %
$\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	-20 % a +10 %

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

2.3.2.2 PRECISIONE PER I METODI DI ANALISI QUANTITATIVI

Per l'analisi ripetuta di un materiale di riferimento o fortificato, il coefficiente di variazione (CV) inter-laboratorio non deve superare il CV di riproducibilità calcolato con l'equazione di Horwitz. In condizioni di ripetibilità il CV intra-laboratorio sarà compreso tra la metà e i due terzi dei valori riportati in tabella; in condizioni di ripetibilità intermedia il CV intra-laboratorio non deve superare i valori tabulati.

TABELLA 3. ESEMPI DI CV DI RIPRODUCIBILITÀ

Frazione di massa	CV di riproducibilità
1 µg/kg	*
10 µg/kg	*
100 µg/kg	23
1000 µg/kg	16
* i CV per concentrazioni inferiori a 100 µg/kg sono i più bassi possibili	

Per sostanze per le quali sia stato stabilito un limite consentito la ripetibilità intermedia non deve superare il corrispondente CV di riproducibilità ad una concentrazione pari a $0,5 \times$ il limite consentito.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

2.3.3 CRITERI DI RENDIMENTO E ALTRE PRESCRIZIONI PER LA RILEVAZIONE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA

2.3.3.1 SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Tempo di ritenzione minimo accettabile per l'analita in studio pari a due volte il tempo di ritenzione corrispondente al volume vuoto della colonna. **Tempo di ritenzione relativo** dell'analita nell'aliquota da analizzare corrispondente a quello della soluzione standard con una tolleranza del $\pm 0,5 \%$ per la GC e del $\pm 2,5 \%$ per la LC.

2.3.3.2 RILEVAZIONE CON TECNICHE DI SPETTROMETRIA DI MASSA

Le intensità relative degli ioni diagnostici misurati, espresse in percentuale rispetto all'intensità dello ione o della transizione più intensa, corrispondono a quelle dell'analita in soluzione o in matrice fortificata, a concentrazioni paragonabili, entro tolleranze definite

TABELLA 4. TOLLERANZE MASSIME CONSENTITE PER INTENSITÀ DI IONI RELATIVE UTILIZZANDO UNA GAMMA DI TECNICHE DI SPETTROMETRIA DI MASSA

Intensità relativa (% del picco di base)	EI-GC-MS (relativa)	CI-GC-MS, GC-MS ^a LC-MS, LC-MS ^a (relativa)
> 50 %	$\pm 10 \%$	$\pm 20 \%$
> 20 % – 50 %	$\pm 15 \%$	$\pm 25 \%$
> 10 % – 20 %	$\pm 20 \%$	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$	$\pm 50 \%$

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

2.3.3 CRITERI DI RENDIMENTO E ALTRE PRESCRIZIONI PER LA RILEVAZIONE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA

SISTEMA DI PUNTI DI IDENTIFICAZIONE

per la conferma delle sostanze elencate nel gruppo A (4 punti di identificazione) e nel gruppo B (3 punti di identificazione) dell'allegato I alla Direttiva 96/23/CE, quando per la misura dei frammenti di massa si utilizzino tecniche diverse dalla scansione totale.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

PARTE 3 “VALIDAZIONE”

Lo scopo della validazione è quello di dimostrare che il metodo analitico è conforme ai criteri applicabili per le caratteristiche di rendimento pertinenti.

Finalità di controllo differenti richiedono categorie di metodi differenti.

CLASSIFICAZIONE DEI METODI ANALITICI

IN BASE ALLE CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO CHE DEVONO ESSERE DETERMINATE

		CCb	CCa	Esattezza Recupero	Precisione	Selettività Specificità	Applicabilità Robustezza Stabilità
Metodi qualitativi	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Metodi quantitativi	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = screening; C = conferma; + = determinazione obbligatoria

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

3.1 “PROCEDURE DI VALIDAZIONE”

La Decisione riporta esempi e/o riferimenti per le procedure di validazione dei metodi analitici, ma

non esclude

la possibilità di utilizzare altri approcci per dimostrare che il metodo analitico è conforme ai criteri di rendimento per le caratteristiche di rendimento

purché

questi forniscano informazioni di pari livello e qualità.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

SPECIFICITÀ analisi di un numero adeguato di campioni bianchi rappresentativi (≥ 20) per verificare la presenza di eventuali interferenze (isomeri, metaboliti, prodotti di degradazione, sostanze endogene, componenti della matrice).

STABILITÀ dell'analita in soluzione e in matrice valutata attraverso un MRC oppure mediante materiale bianco fortificato con l'analita/gli analiti di interesse.

SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008

GUIDELINES FOR THE IMPLEMENTATION OF DECISION 2002/657/EC

La stabilità non deve necessariamente essere calcolata in ogni singolo laboratorio, ma può essere desunta da altre fonti quali dati pubblicati nella letteratura scientifica o informazioni fornite dal Laboratorio Comunitario di Riferimento per la sostanza in studio.

CURVA DI TARATURA (almeno 5 livelli compreso il bianco) si deve definire la formula matematica che descrive la curva di taratura, valutare la bontà dell'adattamento dei dati sulla curva e stabilire intervalli di accettabilità per i parametri della curva.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

ESATTEZZA

L'esattezza può essere stabilita solo per mezzo di un materiale di riferimento certificato (MRC). Un MRC deve essere utilizzato ogniqualvolta sia disponibile. La procedura è descritta dettagliatamente nella ISO 5725-4.

Di seguito ne viene riportato un esempio:

- Analizzare sei duplicati dell'MRC in base alle istruzioni di test per il metodo.
- Determinare la concentrazione dell'analita presente in ciascun campione dei duplicati.
- Calcolare la media, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione (%) per tali concentrazioni.
- Calcolare l'esattezza dividendo la concentrazione media rilevata per il valore certificato (misurato come concentrazione) e moltiplicarlo per 100, per esprimere il risultato come una percentuale:

$$\text{Esattezza (\%)} = \frac{\text{concentrazione media rilevata corretta per il recupero} \times 100}{\text{valore certificato}}$$

Se non è disponibile alcun MRC, anziché l'esattezza, viene determinato il recupero.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

RECUPERO

Se non esiste alcun MRC, il recupero deve essere determinato per mezzo di esperimenti che impiegano una matrice bianca fortificata ricorrendo, ad esempio, al seguente schema:

- selezionare 18 aliquote di un materiale bianco e fortificare 6 aliquote a 1, 1,5 e 2 volte ciascuna il limite di rendimento minimo richiesto oppure a 0,5, 1 e 1,5 volte il limite consentito,
- analizzare i campioni e calcolare la concentrazione presente in ciascun campione,
- utilizzando l'equazione che segue, calcolare il recupero per ciascun campione,
- calcolare il recupero medio e il CV derivante dai 6 risultati a ciascun livello,
recupero % = $100 \times \text{Contenuto misurato} / \text{Livello di fortificazione}$.

Questo metodo convenzionale per la determinazione del recupero è una variante del metodo di aggiunta dello standard.

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

PRECISIONE

in termini di ripetibilità, ripetibilità intermedia e riproducibilità (valutabile mediante la partecipazione a studi collaborativi ISO 5725-2). La precisione in termini di ripetibilità e ripetibilità intermedia per sostanze per le quali è stato stabilito un LMRR o un LMR viene calcolata fortificando un materiale bianco rispettivamente a 1, 1,5 e 2 volte il valore del LMRR o a 0,5, 1 e 1,5 il valore dell'LMR.

SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008

GUIDELINES FOR THE IMPLEMENTATION OF DECISION 2002/657/EC

Per sostanze vietate o non autorizzate si utilizza 1, 1,5 e 2 volte il valore del $CC\beta$.

ROBUSTEZZA/APPLICABILITÀ (approccio di Youden)

Per ridurre il carico di lavoro è consigliabile combinare per quanto possibile gli esperimenti!!

DECISIONE DELLA COMMISSIONE 2002/657/CE

3.1.3. VALIDAZIONE IN BASE A MODELLI ALTERNATIVI

Qualora si applichino procedure di validazione alternative, nel protocollo di validazione devono essere definiti il modello e la strategia di base con i rispettivi requisiti, ipotesi, e formule.

Deve essere redatto un piano sperimentale per la validazione.

Talvolta lo schema classico di validazione descritto nella Decisione risultata di difficile implementazione soprattutto nel caso della validazione di metodi di analisi multiresiduo!!

A.Kaufmann "Validation of multiresidue methods for veterinary drug residues; related problems and possible solutions"

Analytica Chimica Acta 637 (2009) 144-155

Corso
*"Le disposizioni in materia di sicurezza alimentare
applicate ai Laboratori Accreditati"*

La Decisione CE 657/2002 in materia di residui

Luca Palleschi, Carolina Ferranti

Istituto Superiore di Sanità - Roma

Istituto Superiore Antincendi - Roma, 15-16 novembre 2011

L'incertezza di misura non è esplicitamente menzionata nella Dec. 2002/657/CE, tuttavia...



EUROPEAN COMMISSION
HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL
Directorate E – Safety of the Food Chain

SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008¹

GUIDELINES FOR THE IMPLEMENTATION OF DECISION 2002/657/EC²

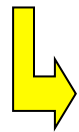
“For the control of compliance the measurement uncertainty is already taken into account by applying the CC α as decision limit”

“For the calculation of the extended uncertainty a certain safety factor is needed. When determining the CC α the factor of the Gaussian distribution for 99% (group A substances) or 95% (group B substances) certainty was used respectively, i. e. a factor of 2.33 in the first and of 1.64 in the latter case. Consequently these factors are also to be used for the calculation of the extended uncertainty at any concentration under validation”

**VARIABILITÀ ASSOCIATA
AL SEGNALE REGISTRATO**

STRUMENTALE

Rumore di fondo



Effetto matrice
(Specificità)

$CC\alpha$

MISURAZIONE

Sensibilità
Ripetibilità

$CC\beta$

Acronimi per indicare Concentrazioni Critiche caratterizzate da valori definiti di probabilità di errore α o β (associati al rischio statistico di prendere decisioni errate)

INTERPRETAZIONE DEL LIMITE DI DECISIONE (CC_{α}) E DELLA CAPACITA' DI RIVELAZIONE (CC_{β})

A fronte del risultato di una misurazione eseguita da un laboratorio per la determinazione della concentrazione di uno specifico analita in un campione, si presenta la necessità di dichiarare la conformità/non conformità del campione a seconda se il valore misurato è al di sotto o al di sopra il limite di non conformità.

Poiché il valore misurato è affetto da un errore analitico, possono essere prese decisioni errate.



RISCHIO STATISTICO DI PRENDERE UN DECISIONE ERRATA *1° Caso*

Limite di non conformità → - - - - -
A

**errore α \Rightarrow Se il valore di concentrazione *misurato* per A è al di sopra del limite di non conformità, il campione può essere erroneamente considerato come non-conforme.
 α indica la probabilità che si verifichi questo errore**

Il Limite di Decisione ($CC\alpha$) è il limite al quale e oltre il quale è possibile concludere con una probabilità di errore pari ad α (falsa non conformità) che un campione è non conforme.

Per le sostanze del Gruppo A in allegato I della Direttiva 96/23/EC, l'errore $\alpha \leq 1 \%$. Per tutte le altre sostanze errore $\alpha \leq 5 \%$.

Parametro rilevante per decisioni positivo/negativo
(carattere legale)

Decisione falsa positiva o decisione di falsa non-
conformità

Probabilità che un campione, risultato positivo all'analisi,
non contenga di fatto l'analita



“Rischio economico” (produttori)

LIMITE DI DECISIONE (CC_{α})

- **Sostanze vietate (gruppo A):** è la più bassa concentrazione di una sostanza alla quale il metodo è in grado di stabilire che la sostanza è effettivamente presente con una certezza statistica di $[1 - \alpha]$ ($\alpha = 1\%$)
- **Sostanze con LMR (altre sostanze diverse da A):** è la concentrazione al di sopra della quale il contenuto di analita è considerato superiore al valore di LMR, con una certezza statistica $[1 - \alpha]$ ($\alpha = 5\%$)

RISCHIO STATISTICO DI PRENDERE UN DECISIONE ERRATA

2° Caso

Limite di non conformità → ----- **B**

errore β \Rightarrow Se il valore di concentrazione *misurato* per B è al di sotto del limite di non conformità, il campione può essere erroneamente considerato come conforme. β indica la probabilità che si verifichi questo errore

La Capacità di Rivelazione ($CC\beta$) rappresenta il contenuto più piccolo della sostanza che è possibile rivelare, identificare e/o quantificare in un campione con una probabilità di errore β ($\leq 5\%$)

Parametro caratteristico della performance del metodo (carattere analitico)

Probabilità che un campione, risultato negativo all'analisi, contenga di fatto l'analita



“Rischio sanitario” (consumatori)

CAPACITÀ DI RIVELAZIONE ($CC\beta$)

Per sostanze vietate è la più bassa concentrazione che il metodo è capace di rivelare con la certezza statistica $1 - \beta$ (95%)

Per sostanze con LMR è la concentrazione alla quale il metodo è in grado di rivelare la concentrazione limite consentita con una certezza statistica pari a $1 - \beta$ ($\beta = 5\%$)

ESEMPIO APPLICATIVO

Calcolo del CC_{α}

Sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito



1)

- utilizzo di materiale bianco fortificato al livello minimo di rendimento richiesto e al di sopra;
- analisi dei campioni e identificazione dell'analita;
- grafico Segnale = $f(\text{Conc})$: la Conc. corrispondente al punto di intercetta dell'asse y più 2,33 volte lo scarto tipo della riproducibilità intra-laboratorio (ripetibilità intermedia) del punto di intercetta equivale al CC_{α} ($\alpha = 1\%$).

2)

- costruire curva di taratura;
- analisi di 20 materiali bianchi;
- calcolo del rapporto segnale/rumore (ad es. nell'intervallo di tempo di ritenzione previsto per ciascun analita);
- il CC_{α} è calcolato come tre rapporti segnale/rumore.

Sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito



1)

- utilizzo di materiale bianco fortificato nell'intorno del limite consentito;
- analisi dei campioni e identificazione dell'analita;
- grafico Segnale = $f(\text{Conc})$: la Conc. corrispondente al limite consentito più 1,64 volte lo scarto tipo della riproducibilità intra-laboratorio (ripetibilità intermedia) equivale al CC_{α} ($\alpha = 5\%$).

2)

- costruire curva di taratura;
- analisi di 20 materiali bianchi fortificati con l'analita/gli analiti al limite consentito;
- la concentrazione al limite consentito più 1,64 volte lo scarto tipo corrispondente, equivale al CC_{α} .

ESEMPIO APPLICATIVO

Calcolo del $CC\beta$

Sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito



- 1)
 - utilizzo di materiale bianco rappresentativo, fortificato al livello di rendimento minimo richiesto;
 - analisi dei campioni e identificazione dell'analita;
 - grafico Segnale = $f(\text{Conc})$: la Conc. corrispondente al limite di decisione più 1,64 volte lo scarto tipo della riproducibilità intra-laboratorio (ripetibilità intermedia) del contenuto medio misurato al limite di decisione equivale alla capacità di rivelazione ($\beta = 5\%$).
- 2)
 - costruire curva di taratura;
 - analisi di 20 materiali bianchi fortificati con gli analiti al limite di decisione;
 - analisi dei campioni e identificazione dell'analita;
 - il $CC\beta$ equivale al valore del $CC\alpha$ più 1,64 volte lo scarto tipo della riproducibilità intra-laboratorio (ripetibilità intermedia).

Sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito



- 1)
 - utilizzo di materiale bianco rappresentativo, fortificato nell'intorno del limite consentito;
 - analisi dei campioni e identificazione dell'analita;
 - calcolo dello scarto tipo del contenuto medio misurato al limite di decisione;
 - La Conc. corrispondente al valore del limite di decisione più 1,64 volte lo scarto tipo della riproducibilità intra-laboratorio (ripetibilità intermedia) equivale alla capacità di rivelazione ($\beta = 5\%$).
- 2)
 - costruire curva di taratura;
 - analisi di 20 materiali bianchi fortificati con gli analiti al limite di decisione;
 - analisi dei campioni e identificazione dell'analita;
 - il valore del limite di decisione più 1,64 volte lo scarto tipo della riproducibilità intra-laboratorio (ripetibilità intermedia) equivale alla capacità di rivelazione.

- LMRR → Autorità competente
- CC α e CC β → Caratteristiche di performance (Lab)
- Applicabilità → Gruppo A All.1 Dir.96/23

Documento SANCO/2004/2726-rev 4-December 2008
Guidelines for the implementation of Decision
2002/657/EC

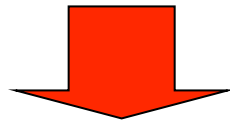
Correlazione: $CC\alpha < CC\beta \leq LMRR$

Si raccomanda di garantire un CC α e un CC β verificati sperimentalmente, mediante fortificazione di 20 bianchi rappresentativi a queste concentrazioni. Il metodo di analisi deve essere in grado di rivelare/identificare l'analita al CC α e al CC β nel 50% e nel 95% dei casi rispettivamente. Laddove le percentuali ottenute siano inferiori a tali valori, si può concludere che i valori di CC α e CC β calcolati siano troppo bassi, richiedendo pertanto ulteriori studi.

Articolo 6

Interpretazione dei risultati

1. Il risultato di un'analisi sarà considerato non conforme se viene superato il limite di decisione ($CC\alpha$) del metodo di conferma per l'analita.



REGOLE DI DECISIONE

Guida EURACHEM/CITAC "Use of uncertainty information in compliance assessment" - First Edition 2007

Dichiarazione di conformità/non conformità \longleftrightarrow Incertezza di misura

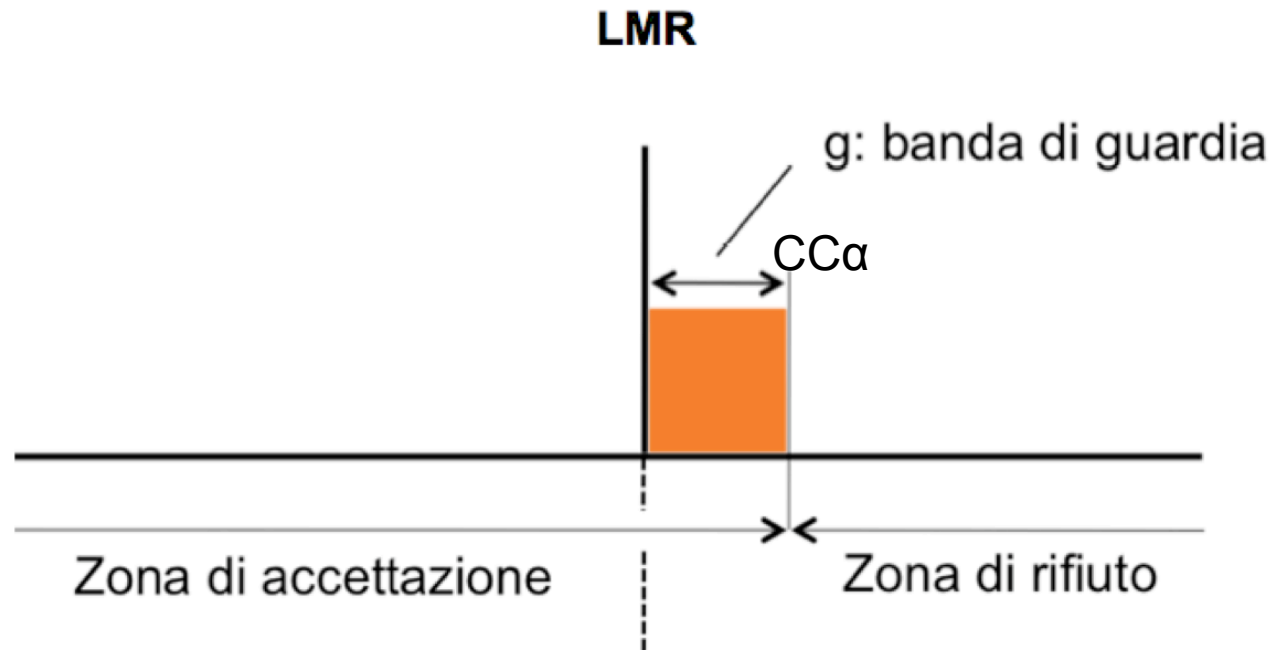
Accettazione/Rifiuto del campione in base a:

- risultato della misurazione;
- incertezza associata;
- limite di specifica;
- livello di accettabilità della probabilità di prendere una decisione errata.

REGOLE DI DECISIONE

Es: Regola di decisione per non conformità (rifiuto), con bassa probabilità di falsa non conformità ($CC\alpha$ per sostanze con LMR)

- $g = f(u)$
- valore del multiplo da utilizzare stabilito dalla regola di decisione

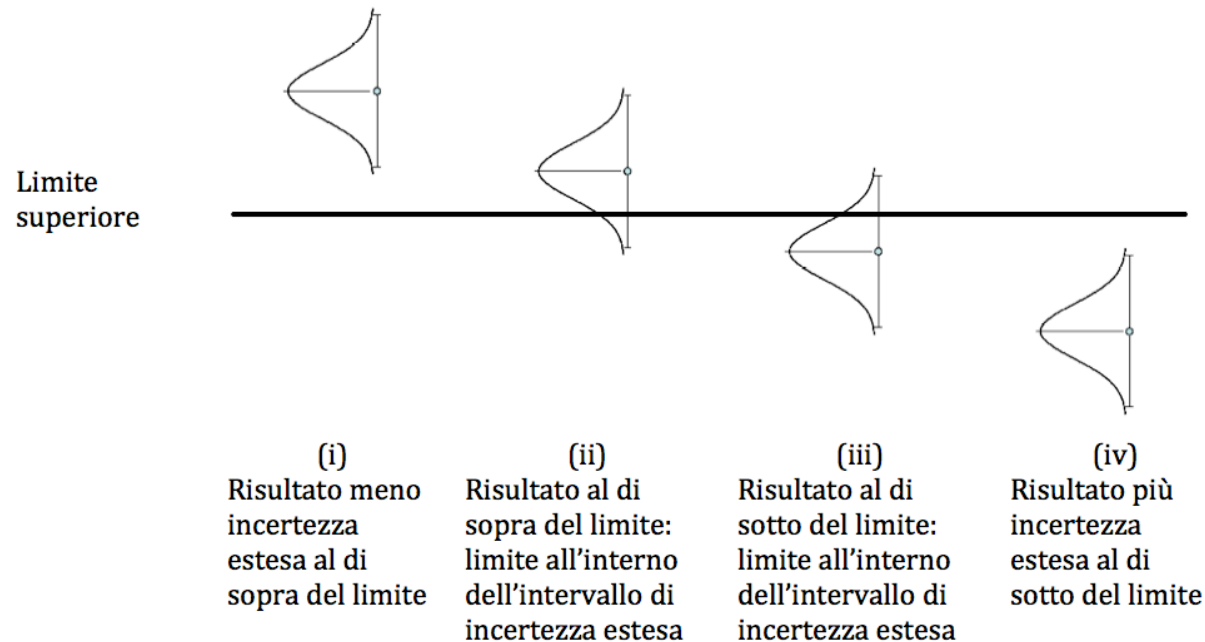


Per sostanze con MRL, il $CC\alpha$ è la concentrazione misurata più bassa alla quale è certo, con una data probabilità, che la concentrazione vera è al di sopra del livello permesso. Pertanto il $CC\alpha$, equivalente a $LMR+g$, è un limite di decisione



- probabilità di falsa non conformità $\leq \alpha$;
- bassa probabilità che il limite consentito non sia stato effettivamente superato

Conformità ad un limite superiore di specifica



- Casi (i) e (iv): valore misurato associato alla propria incertezza ben al di sopra o al di sotto del limite, rispettivamente;
- Casi (ii) e (iii): in relazione ai rischi associati ad una decisione errata, la probabilità di una decisione non corretta può essere o meno sufficientemente piccola per poter giustificare una decisione di non-conformità o di conformità rispettivamente; pertanto senza ulteriori informazioni, non sarà possibile utilizzare questi due risultati ai fini di una decisione circa la non conformità/conformità. Per questi casi:



Regole di decisione: il livello di accettabilità della probabilità di prendere una decisione errata, i risultati della misurazione, l'incertezza ad essi associata e il limite stabilito consentono di dichiarare un campione non conforme/conforme qualora sia superato/o meno/ il limite di decisione, CC_a , del metodo.

La validazione è un processo sperimentale che permette di determinare le caratteristiche di performance e di stimare l'incertezza di misura del metodo così come applicato in uno specifico laboratorio (ad es., CC_{α} e CC_{β} , funzione di: range di taratura, accuratezza, interferenze, estrazione). Tuttavia...

TRASFERIBILITÀ METODI NON NORMATI, SVILUPPATI E VALIDATI DA LABORATORI DI RIFERIMENTO NAZIONALI O COMUNITARI ACCREDITATI AD ALTRI LABORATORI SENZA ULTERIORE VALIDAZIONE

purché:

- Verifica dei metodi da parte del laboratorio utilizzatore, in riferimento al campo di accreditamento;
- Metodi in vigore recanti limiti di ripetibilità e riproducibilità (intermedia) e messi a disposizione dal laboratorio di riferimento sul web, corredati dalla dichiarazione di validazione (data di emissione non superiore a 3 anni);
- Verifica sui metodi validati e trasferiti, in riferimento al limite di ripetibilità dichiarato (...ma anche al CC_{α} e al CC_{β} !)



Grazie per l'attenzione