

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 519/2014**zo 16. mája 2014,****ktorým sa mení nariadenie (ES) č. 401/2006, pokiaľ ide o metódy odberu vzoriek z veľkých dávok, korenia a výživových doplnkov, kritéria účinnosti pre toxíny T-2 a HT-2 a citrinín a skriningové metódy analýzy****(Text s významom pre EHP)**

EURÓPSKA KOMISIA,

so zreteľom na Zmluvu o fungovaní Európskej únie,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004 z 29. apríla 2004 o úradných kontrolách uskutočňovaných s cieľom zabezpečiť overenie dodržiavania potravinového a krmivového práva a predpisov o zdraví zvierat a o starostlivosti o zvieratá ⁽¹⁾, a najmä na jeho článok 11 ods. 4,

keďže:

- (1) V nariadení Komisie (ES) č. 1881/2006 ⁽²⁾ sa stanovujú maximálne limity niektorých mykotoxínov v určitých potravinách.
- (2) Odber vzoriek zohráva rozhodujúcu úlohu, pokiaľ ide o presnosť stanovenia hodnôt mykotoxínov, ktoré sú v dávke rozložené heterogénne. Je preto nutné stanoviť kritériá, ktoré by mali spĺňať metódy odberu vzoriek.
- (3) V nariadení Komisie (ES) č. 401/2006 ⁽³⁾ sa stanovujú kritériá odberu vzoriek na kontrolu hodnôt mykotoxínov.
- (4) Je potrebné zmeniť pravidlá týkajúce sa odberu vzoriek z korenia s cieľom zohľadniť rozdiely vo veľkosti častíc, ktoré vedú k heterogénnemu rozloženiu kontaminácie mykotoxínmi v korení. Okrem toho je vhodné stanoviť pravidlá pre odber vzoriek z veľkých dávok s cieľom zabezpečiť jednotné uplatňovanie postupov v rámci Únie. Takisto je vhodné objasniť, ktorá metóda odberu vzoriek sa musí uplatňovať pri odbere vzoriek z jablkovej šťavy.
- (5) Kritériá účinnosti pre toxíny T-2 a HT-2 sa musia aktualizovať s cieľom zohľadniť vedecký a technologický pokrok. Je potrebné stanoviť kritériá účinnosti pre citrinín vzhľadom na maximálne množstvo stanovené pre citrinín vo výživových doplnkoch na báze ryže fermentovanej červenými kvasinkami *Monascus purpureus*.
- (6) Na analýzu mykotoxínov sa čoraz viac používajú skriningové metodiky. Je vhodné stanoviť kritériá, ktoré tieto skriningové metódy musia spĺňať, aby sa mohli používať na regulačné účely.
- (7) Opatrenia stanovené v tomto nariadení sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Nariadenie (ES) č. 401/2006 sa mení takto:

1. Príloha I sa mení takto:

a) v časti B sa poznámka pod čiarou č. 1 nahrádza takto:

„1. Odber vzoriek z takýchto dávok sa vykonáva v súlade s pravidlami stanovenými v časti L. Usmernenie k odberu vzoriek z veľkých dávok je poskytnuté v usmerňujúcom dokumente na tejto webovej stránke: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 165, 30.4.2004, s. 1.

⁽²⁾ Nariadenie Komisie (ES) č. 1881/2006 z 19. decembra 2006, ktorým sa ustanovujú maximálne hodnoty obsahu niektorých kontaminantov v potravinách (Ú. v. EÚ L 364, 20.12.2006, s. 5).

⁽³⁾ Nariadenie Komisie (ES) č. 401/2006 z 23. februára 2006, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a analytické metódy na úradnú kontrolu hodnôt mykotoxínov v potravinách (Ú. v. EÚ L 70, 9.3.2006, s. 12).

Uplatňovanie pravidiel odberu vzoriek v súlade s normou EN ISO 24333:2009 alebo pravidlami odberu vzoriek GAFTA 124 prevádzkovateľmi potravinárskych podnikov s cieľom zabezpečiť dodržiavanie ustanovení v právnych predpisoch je rovnocenné s pravidlami odberu vzoriek stanovenými v časti L.

Pri odbere vzoriek z dávok na zistenie toxínov *Fusarium* uplatňovanie pravidiel odberu vzoriek v súlade s normou EN ISO 24333:2009 alebo pravidlami odberu vzoriek GAFTA 124 prevádzkovateľmi potravinárskych podnikov s cieľom zabezpečiť dodržiavanie ustanovení v právnych predpisoch je rovnocenné s pravidlami odberu vzoriek stanovenými v časti B.;

b) V časti B.2 sa tabuľka 1 nahrádza touto tabuľkou:

„Tabuľka 1

Rozdelenie dávok na čiastkové dávky v závislosti od produktu a hmotnosti dávky

Komodita	Hmotnosť dávky (v tonách)	Hmotnosť alebo počet čiastkových dávok	Počet prírastkových vzoriek	Hmotnosť súhrnej vzorky (v kg)
Obilniny a výrobky z obilnín	> 300 a < 1 500	3 čiastkové dávky	100	10
	≥ 50 a ≤ 300	100 ton	100	10
	< 50	–	3 – 100 (*)	1 – 10

(*) V závislosti od hmotnosti položky – pozri tabuľku 2“

c) V časti B.3 sa na koniec prvej zarážky odseku dopĺňa táto veta:

„Pri dávkach > 500 ton je počet prírastkových vzoriek stanovený v časti L.2 prílohy I;“;

d) V časti D.2 sa za prvú vetu dopĺňa táto veta:

„Táto metóda odberu vzoriek sa takisto používa pri úradnej kontrole maximálnych hodnôt stanovených pre ochratoxín A, aflatoxín B1 a celkové aflatoxíny v koreniach s pomerne veľkými časticami (veľkosť častíc je porovnateľná s arašidmi alebo väčšia, napr. ako muškátový orech).“;

e) V časti E sa prvá veta nahrádza takto:

„Táto metóda odberu vzoriek sa používa pri úradnej kontrole maximálnych hodnôt stanovených pre ochratoxín A, aflatoxín B1 a celkové aflatoxíny v koreniach okrem prípadov korenia s pomerne veľkými časticami (heterogénne rozloženie kontaminácie mykotoxínmi).“;

f) V časti I sa názov a prvá veta nahrádzajú takto:

„I. METÓDA ODBERU VZORIEK Z TUHÝCH VÝROBKOV Z JABLÍK

Táto metóda odberu vzoriek sa používa pri úradnej kontrole maximálnych hodnôt stanovených pre patulín v tuhých výrobkoch z jabĺk vrátane tuhých výrobkov z jabĺk určených pre kojencov a malé deti.“;

g) V časti I.1 sa v druhom odseku vypúšťajú tieto vety:

„V prípade tekutých výrobkov sa dávka čo najdôkladnejšie premieša buď manuálne alebo mechanickými prostriedkami bezprostredne pred odberom vzoriek. V tomto prípade možno predpokladať homogénne rozloženie patulínu v rámci danej dávky. Na vytvorenie súhrnej vzorky preto stačí z dávky odobrať tri prírastkové vzorky.“;

h) Dopĺňajú sa nové časti L a M uvedené v prílohe I k tomuto nariadeniu.

2. V prílohe II sa body „4.2 Všeobecné požiadavky, 4.3 Osobitné požiadavky a 4.4 Odhad nepresnosti merania, výpočet výťažnosti a oznamovanie výsledkov“ nahrádzajú textom uvedeným v prílohe II k tomuto nariadeniu.

Článok 2

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dvadsiatym dňom po jeho uverejnení v *Úradnom vestníku Európskej únie*.
Uplatňuje sa od 1. júla 2014.

Toto nariadenie je záväzné v celom rozsahu a priamo uplatniteľné vo všetkých členských štátoch.

V Bruseli 16. mája 2014

Za Komisiu
predseda
José Manuel BARROSO

PRÍLOHA I

„L. METÓDA ODBERU VZORIEK PRE VEĽMI VEĽKÉ DÁVKY ALEBO DÁVKY USKLADNENÉ ALEBO PREPRAVOVANÉ SPÔSOBOM, PRI KTOROM NIE JE MOŽNÝ ODBER VZORKY Z CELEJ DÁVKY

L.1. **Všeobecné zásady**

V prípade, že spôsob prepravy alebo skladovania dávky neumožňuje odobrať prírastkové vzorky z celej dávky, odber vzoriek z takýchto dávok by sa mal prednostne uskutočniť, keď je dávka v pohybe (dynamický odber vzoriek).

V prípade veľkých skladov určených na skladovanie potravín by prevádzkovatelia mali byť vyzvaní k tomu, aby v sklade nainštalovali zariadenie, ktoré umožní (automatický) odber vzoriek z celej uskladnenej dávky.

Pri uplatnení postupov odberu vzoriek stanovených v tejto časti L by prevádzkovateľ potravinárskeho podniku alebo jeho zástupca mal byť informovaný o postupe pri odbere vzoriek. V prípade, že prevádzkovateľ potravinárskeho podniku alebo jeho zástupca tento postup odberu vzoriek spochybní, prevádzkovateľ potravinárskeho podniku alebo jeho zástupca umožní príslušnému orgánu odobrať vzorku z celej dávky na vlastné náklady.

Odber vzoriek časti dávky je povolený pod podmienkou, že množstvo odobratej vzorky predstavuje aspoň 10 % dávky. Ak sa vzorky odobrli z časti dávky potravín rovnakej triedy alebo opisu a zistilo sa pri nich, že nespĺňajú požiadavky Únie, predpokladá sa, že celá dávka nespĺňa požiadavky Únie, pokiaľ sa na základe dôkladného posúdenia nepreukáže, že zvyšok dávky je uspokojivý.

Príslušné ustanovenia, ako napríklad hmotnosť prírastkovej vzorky, stanovené v iných častiach tejto prílohy sa vzťahujú na odber vzoriek pre veľmi veľké dávky alebo dávky uskladnené alebo prepravované spôsobom, pri ktorom nie je možný odber vzorky z celej dávky.

L. 2. **Počet prírastkových vzoriek, ktoré sa majú odobrať v prípade veľmi veľkých dávok**

V prípade veľkých častí vzorky (časti vzorky > 500 ton) sa počet prírastkových vzoriek, ktoré sa majú odobrať = 100 prírastkových vzoriek + $\sqrt{\text{ton}}$. Avšak v prípade, že hmotnosť dávky je menej ako 1 500 ton a možno ju ďalej rozdeliť na čiastkové dávky podľa tabuľky 1 časti B, a za podmienky, že čiastkové dávky možno fyzicky oddeliť, má sa odobrať počet prírastkových vzoriek, ako je stanovené v časti B.

L. 3. **Veľké dávky prepravované loďou**

L. 3.1. *Dynamický odber vzoriek z veľkých dávok prepravovaných loďou*

Odber vzoriek z veľkých dávok na lodiach sa prednostne vykonáva, kým je produkt v pohybe (dynamický odber vzoriek).

Odber vzoriek sa má uskutočňovať podľa jednotlivých buniek (jednotky nákladného priestoru, ktoré možno fyzicky oddeliť). Bunky sa však vyprázdňujú čiastočne jedna po druhej, takže pôvodné fyzické oddelenie už po preprave do skladovacích zariadení neexistuje. Odber vzoriek preto možno uskutočniť na základe pôvodného fyzického oddelenia alebo na základe oddelenia po preprave do skladovacích zariadení.

Vyloženie lode môže trvať niekoľko dní. Odber vzoriek sa spravidla musí vykonávať v pravidelných intervaloch počas celého trvania vykladania. Nie je však vždy možné ani vhodné, aby bol pri odbere vzoriek počas celej vykládky prítomný úradný inšpektor. Preto je povolené odobrať vzorku z časti dávky (časť vzorky). Počet prírastkových vzoriek sa stanoví podľa veľkosti vzorkovanej partie.

Prítomnosť inšpektora je nevyhnutná aj vtedy, keď sa úradná vzorka odoberá automaticky. V prípade, že sa automatický odber vzoriek vykonáva podľa vopred stanovených parametrov, ktoré počas odberu vzoriek nie je možné zmeniť, a prírastkové vzorky sa zhromažďujú v zapečatenej nádobe, aby sa predišlo prípadnému podvodu, prítomnosť inšpektora sa vyžaduje len na začiatku odberu vzoriek, pri každej potrebnej výmene nádoby so vzorkami a na konci odberu vzoriek.

L. 3.2. *Odber vzoriek z dávok prepravovaných loďou formou statického odberu vzoriek*

V prípade, že sa odber vzoriek vykonáva staticky, musí sa použiť rovnaký postup ako pre skladovacie zariadenia (silá) prístupné zhora (pozri bod L.5.1).

Odber vzoriek sa musí vykonávať v prístupnej časti (zhora) dávky/bunky. Počet prírastkových vzoriek sa stanoví podľa veľkosti vzorkovanej partie.

L. 4. Odber vzoriek z veľkých dávok uskladnených v skladoch

Odber vzoriek sa musí vykonávať v prístupnej časti dávky. Počet prírastkových vzoriek sa stanoví podľa veľkosti vzorkovanej partie.

L.5. Odber vzoriek zo skladovacích zariadení (síl)**L.5.1. Odber vzoriek zo síl (lahko prístupných zhora)**

Odber vzoriek sa musí vykonávať v prístupnej časti dávky. Počet prírastkových vzoriek sa stanoví podľa veľkosti časti vzorky.

L.5.2. Odber vzoriek zo síl, ktoré nie sú prístupné zhora (uzatvorené silá)**L.5.2.1. Silá, ktoré nie sú prístupné zhora (uzatvorené silá), s veľkosťou jednotlivých síl > 100 ton**

Z potravín skladovaných v takýchto silách sa nemôžu odoberať vzorky statickým spôsobom. Preto v prípade, keď sa musí odobrať vzorka potravín v sile a neexistuje žiadna možnosť presunutia zásielky, musí sa s prevádzkovateľom uzatvoriť dohoda o tom, že bude inšpektora informovať, keď bude silo čiastočne alebo úplne vyprázdnené, aby sa umožnil odber vzorky z potravín v pohybe.

L.5.2.2. Silá, ktoré nie sú prístupné zhora (uzatvorené silá), s veľkosťou jednotlivých síl < 100 ton

V rozpore s ustanovením v bode L.1 (časť, z ktorej sa podoberá vzorka aspoň 10 %) postup odberu vzoriek zahŕňa uvoľnenie množstva 50 – 100 kg do nádoby, z ktorého sa odoberie vzorka. Veľkosť súhrnnej vzorky zodpovedá celej dávke a počet prírastkových vzoriek sa vzťahuje na množstvo potravín zo sila uvoľnených do nádoby na odber vzorky.

L.6. Odber vzoriek z voľne uložených potravín vo veľkých uzavretých kontajneroch

Z takýchto dávok možno často odobrať vzorky len pri vykladaní. V niektorých prípadoch nie je možné vykladanie v čase dovozu alebo kontroly, a preto by sa mala vzorka odobrať pri vykladaní takýchto kontajnerov. Prevádzkovateľ musí informovať inšpektora o mieste a čase vykladania kontajnerov.

M. METÓDA ODBERU VZORIEK Z VÝŽIVOVÝCH DOPLNKOV NA BÁZE RYŽE FERMENTOVANEJ ČERVENÝMI KVASINKAMI MONASCUS PURPUREUS

Táto metóda odberu vzoriek sa uplatňuje na úradnú kontrolu maximálnej hodnoty stanovenej pre citrinín vo výživových doplnkoch na báze ryže fermentovanej červenými kvasinkami *Monascus purpureus*.

Postup odberu vzoriek a veľkosť vzorky

Postup odberu vzoriek je za predpokladu, že výživové doplnky na báze ryže fermentovanej červenými kvasinkami *Monascus purpureus* sa uvádzajú na trh v maloobchodných baleniach, z ktorých každé zvyčajne obsahuje 30 až 120 kapsúl.

Veľkosti dávky (počet maloobchodných balení)	Počet maloobchodných balení, z ktorých sa majú odobrať vzorky	Veľkosť vzoriek
1 – 50	1	všetky kapsule
51 – 250	2	všetky kapsule
251 – 1 000	4	z každého maloobchodného balenia vybraného na odber vzorky polovica kapsúl
> 1 000	4 + 1 maloobchodné balenia na 1 000 maloobchodných balení s maximálnym počtom 25 maloobchodných balení	≤ 10 maloobchodných balení: z každého maloobchodného balenia polovica kapsúl > 10 maloobchodných balení: z každého maloobchodného balenia sa odoberie rovnaký počet kapsúl s cieľom dosiahnuť vzorku s ekvivalentným obsahom 5 maloobchodných balení.“

PRÍLOHA II

„4.2. Všeobecné požiadavky

Konfirmačné metódy analýzy použité na účely kontroly potravín sú v súlade s ustanoveniami položiek 1 a 2 prílohy III k nariadeniu (ES) č. 882/2004.

4.3. Osobitné požiadavky

4.3.1. Osobitné požiadavky pre konfirmačné metódy

4.3.1.1. Kritériá účinnosti

Odporúča sa, aby sa používali vhodné a dostupné úplne validované konfirmačné metódy (t. j. metódy validované spoločnými skúškami pre príslušné matrice). Takisto sa môžu použiť iné vhodné konfirmačné validované metódy (napr. vnútrolaboratórne validované metódy na relevantných matriciach, ktoré patria do predmetnej skupiny komodít) za predpokladu, že spĺňajú kritériá účinnosti, ktoré sú uvedené v nasledujúcich tabuľkách.

Validácia interne validovaných metód zahŕňa, pokiaľ možno, certifikovaný referenčný materiál.

a) Kritériá účinnosti pre aflatoxíny

Kritérium	Rozsah koncentrácie	Odporúčaná hodnota	Maximálna povolená hodnota
Slepé pokusy	všetky	Zanedbateľná	—
Výťažnosť – aflatoxín M1	0,01 – 0,05 µg/kg	60 až 120 %	
	> 0,05 µg/kg	70 až 110 %	
Výťažnosť – aflatoxíny B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 µg/kg	50 až 120 %	
	1 – 10 µg/kg	70 až 110 %	
	> 10 µg/kg	80 až 110 %	
Reprodukovateľnosť RSD _R	všetky	odvodená z Horwitzovej rovnice ^(*) ^(**)	2 × hodnota odvodená z Horwitzovej rovnice ^(*) ^(**)

Opakovateľnosť RSD_r sa môže vypočítať ako 0,66-násobok reprodukovateľnosti RSD_R pri príslušnej koncentrácii.

Poznámka:

- hodnoty sa vzťahujú na B₁ aj na sumu B₁ + B₂ + G₁ + G₂
- ak sa má oznamovať súčet jednotlivých aflatoxínov B₁ + B₂ + G₁ + G₂, potom musí byť reakcia každého aflatoxínu na analytický systém známa alebo rovnaká.

b) Kritériá účinnosti pre ochratoxín A

Hladina µg/kg	Ochratoxín A		
	RSD _r %	RSD _R %	Výťažnosť %
< 1	≤ 40	≤ 60	50 až 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	70 až 110

c) Kritériá účinnosti pre patulín

Hladina µg/kg	Patulín		
	RSD _r %	RSD _R %	Výťažnosť %
< 20	≤ 30	≤ 40	50 až 120
20 – 50	≤ 20	≤ 30	70 až 105
> 50	≤ 15	≤ 25	75 až 105

d) Kritériá účinnosti pre deoxynivalenol

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

e) Kritériá účinnosti pre zearalenón

Hladina µg/kg	Zearalenón		
	RSD _r %	RSD _R %	Výťažnosť %
≤ 50	≤ 40	≤ 50	60 až 120
> 50	≤ 25	≤ 40	70 až 120

f) Kritériá účinnosti zvlášť pre fumonisín B₁ a B₂

Hladina µg/kg	Fumonisin B ₁ a B ₂ samostatne		
	RSD _r %	RSD _R %	Výťažnosť %
≤ 500	≤ 30	≤ 60	60 až 120
> 500	≤ 20	≤ 30	70 až 110

g) Kritériá účinnosti pre toxíny T-2 a HT-2

Hladina µg/kg	Toxín T-2 a HT-2 samostatne		
	RSD _r %	RSD _R %	Výťažnosť %
15 – 250	≤ 30	≤ 50	60 až 130
> 250	≤ 25	≤ 40	60 až 130

h) Kritériá účinnosti pre citrinín

Hladina µg/kg	Citrinín			
	RSD _r %	Odporúčaná RSD _R %	Maximálna povolená RSD _R %	Výťažnosť %
Všetky	0,66 × RSD _R	odvodená z Horwitzovej rovnice (*)(**)	2 × hodnota odvodená z Horwitzovej rovnice (*)(**)	70 až 120

i) Poznámky ku kritériám účinnosti pre mykotoxíny

- Detekčné limity použitých metód nie sú uvedené, keďže presné hodnoty sú uvedené pri príslušných koncentráciách.
- Presné hodnoty sa vypočítajú z Horwitzovej rovnice, najmä pôvodnej Horwitzovej rovnice (pre koncentrácie $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$) (*) a upravenej Horwitzovej rovnice (pre koncentrácie $C < 1,2 \times 10^{-7}$) (**).

(*) Horwitzova rovnica pre koncentrácie $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$:

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

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

(**) Upravená Horwitzova rovnica (*) pre koncentrácie $C < 1,2 \times 10^{-7}$:

$$RSD_R = 22 \%$$

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

kde:

— RSD_R je relatívna štandardná odchýlka vypočítaná z výsledkov získaných za podmienok reprodukovateľnosti [$(s_R/l) \times 100$]

— C je pomer koncentrácie (t. j. $1 = 100 \text{ g}/100 \text{ g}$, $0,001 = 1 \text{ 000 mg}/\text{kg}$)

Toto je zovšeobecnená rovnica presnosti, ktorá sa považuje za nezávislú od analytu a matrice, ale pri najbežnejších analytických metódach závisí výlučne od koncentrácie.

4.3.1.2. Prístup pod názvom ‚vhodnosť na daný účel‘

V prípade vnútrolaboratórne validovaných metód možno na posúdenie ich vhodnosti na úradnú kontrolu alternatívne použiť prístup ‚vhodnosť na daný účel‘ (***). Metódy vhodné na úradnú kontrolu musia zabezpečiť výsledky so štandardnou neistotou merania u) nižšou ako maximálna štandardná neistota merania, ktorá sa vypočíta pomocou tohto vzorca:

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

kde:

- U_f je maximálna štandardná neistota merania ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- LOD je detekčný limit metódy ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- α je konštantný číselný faktor, ktorý sa má používať v závislosti od hodnoty C, hodnoty, ktoré sa majú používať, sú uvedené ďalej v tabuľke,
- C je príslušná koncentrácia ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Ak analytická metóda poskytuje výsledky s neistotou merania menšou ako maximálna štandardná neistota, táto metóda sa považuje za rovnako vhodnú ako metóda, ktorá spĺňa kritériá účinnosti uvedené v bode 4.3.1.1

Tabuľka

Číselné hodnoty, ktoré sa majú použiť pre α ako konštantu vo vzorci uvedenom v tomto bode v závislosti od príslušnej koncentrácie.

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

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

4.3.2. Osobitné požiadavky na semikvantitatívne skriningové metódy

4.3.2.1. Rozsah pôsobnosti

Rozsah sa vzťahuje na bioanalytické metódy založené na imunitnom rozpoznávaní alebo receptorovom viazaní (napr. test ELISA, testovacie prúžky, zariadenie s vedľajším tokom, imunosenzory) a fyzikálno-chemické metódy založené na chromatografii alebo priamej detekcii napr. pomocou hmotnostnej spektrometrie (hmotnostná spektrometria za štandardných podmienok). Iné metódy (napr. chromatografia na tenkej vrstve) nie sú vylúčené za predpokladu, že vzniknuté signály sa priamo vzťahujú na predmetné mykotoxíny a umožňujú, aby bola uplatniteľná zásada opísaná ďalej v texte.

Osobitné požiadavky sa vzťahujú na metódy, ktorých výsledok merania je číselná hodnota, napríklad (relatívna) odozva z testovacích prúžkov, signál z LC-MS, atď., a uplatňujú sa bežné štatistiky.

Požiadavky sa nevzťahujú na metódy, ktoré neposkytujú číselné hodnoty (napr. iba odozvy prítomnosti alebo neprítomnosti), ktoré si vyžadujú rôzne validačné prístupy. Osobitné požiadavky pre tieto metódy sú uvedené v bode 4.3.3

Tento dokument opisuje postupy validácie skriningových metód prostredníctvom medzilaboratórnej validácie, overenia účinnosti metódy validovanej prostredníctvom medzilaboratórneho výkonu a jednotnej laboratórnej validácie skriningovej metódy.

4.3.2.2. Terminológia

Výsledná koncentrácia skriningu (screening target concentration, STC): koncentrácia na zistenie mykotoxínu vo vzorke. Ak je cieľom overiť dodržiavanie regulačných limitov, STC sa rovná uplatniteľnej maximálnej úrovni. Na iné účely alebo v prípade, že maximálna úroveň nebola stanovená, STC sa vopred vymedzí v laboratóriu.

Skriningová metóda: znamená metódu používanú pri výbere tých vzoriek s hodnotami mykotoxínov, ktoré prekračujú výslednú koncentráciu skriningu (STC) s danou presnosťou. Na účely skriningu mykotoxínov sa za vhodnú na tento účel považuje presnosť 95 %. Výsledok skriningovej analýzy je buď ‚negatívny‘ alebo ‚podozrivý‘. Skriningové metódy umožňujú vysoký počet vzoriek pri priaznivom pomere efektivity a nákladov, čím sa zvyšuje šanca objaviť nové prípady vysokého vystavenia a zdravotných rizík spotrebiteľov. Tieto metódy sú založené na bioanalytických metódach, metódach LC-MS alebo HPLC. Výsledky vzoriek prekračujúcich medznú hodnotu sa overia úplnou opätovnou analýzou pôvodnej vzorky pomocou konfirmačnej metódy.

‚Negatívna vzorka‘ znamená, že obsah mykotoxínov vo vzorke je < STC s presnosťou 95 % (t. j. existuje 5 % pravdepodobnosť, že vzorky budú nesprávne ohlásené ako negatívne).

‚Falošne negatívna vzorka‘ znamená, že obsah mykotoxínov vo vzorke je > STC, no bola označená ako negatívna.

‚Podozrivá vzorka‘ (pozitívny skrining) znamená, že vzorka prekračuje medznú hodnotu (pozri nižšie) a môže obsahovať mykotoxíny na vyššej úrovni ako STC. Každý podozrivý výsledok je impulzom pre konfirmačnú analýzu na jednoznačnú identifikáciu a kvantifikáciu mykotoxínov.

‚Falošne podozrivá vzorka‘ je negatívna vzorka, ktorá bola označená ako podozrivá.

‚Konfirmačné metódy‘ sú metódy, ktoré poskytujú úplné alebo doplňujúce informácie umožňujúce mykotoxín jednoznačne identifikovať a kvantifikovať na príslušnej úrovni.

Medzná hodnota: odpoveď, signál alebo koncentrácia získaná skriningovou metódou, nad ktorou sa vzorka klasifikuje ako ‚podozrivá‘. Medzná hodnota sa určuje v priebehu validácie a zohľadňuje sa variabilita merania.

Negatívna kontrolná vzorka (slepá matrica): vzorka bez ⁽¹⁾ mykotoxínov, kvôli ktorým sa má podrobiť skríningu, napr. pomocou predchádzajúceho určenia s použitím konfirmačnej metódy dostatočnej citlivosti. Ak nie je možné získať slepé vzorky, mohol by sa použiť materiál s najnižšou úrovňou, ktorú možno získať, pokiaľ daná úroveň umožňuje konštatovanie, že skrínigová metóda je vhodná na daný účel.

Positívna kontrolná vzorka: vzorka obsahujúca mykotoxín v STC, napr. certifikovaný referenčný materiál, materiál známeho obsahu (napr. testovací materiál skúšok spôsobilosti) alebo inak dostatočne charakterizovaný konfirmačnou metódou. Ak nie sú dostupné žiadne takéto materiály, môže sa použiť zmes vzoriek s rozdielnymi úrovňami kontaminácie alebo obohatená vzorka pripravená v rámci laboratória a dostatočne charakterizovaná, pokiaľ možno preukázať, že bola overená úroveň kontaminácie.

4.3.2.3. Postup validácie

Cieľom validácie je preukázať vhodnosť účelu skrínigovej metódy. Vykonáva sa určením medznej hodnoty a stanovením miery falošne negatívnych a falošne podozrivých vzoriek. V týchto dvoch parametroch sú zohľadnené vlastnosti spôsobilosti ako napríklad citlivosť, selektívnosť a presnosť.

Skrínigové metódy môžu byť validované pomocou medzilaboratórnej validácie alebo jednotnej laboratórnej validácie. Ak sú k dispozícii údaje o medzilaboratórnej validácii pre určitú kombináciu mykotoxínov/matricu/STC, overenie metódy výkonnosti je v laboratóriu uplatňujúcim metódu dostatočné.

4.3.2.3.1. Počítačová validácia pomocou vnútrolaboratórnej validácie

Mykotoxíny:

Validácia sa musí vykonať pre každý samostatný mykotoxín v rámci rozsahu. V prípade bioanalytických metód, ktoré poskytujú kombinovanú odpoveď pre určitú mykotoxínovú skupinu (napr. aflatoxíny B₁, B₂, G₁ a G₂; fumonizíny B₁ a B₂), sa musí dokázať uplatniteľnosť a obmedzenia skúšky uvedenej v rozsahu pôsobnosti metódy. Nežiaduca krížová reaktivita (napr. DON-3-glykozid, 3- alebo 15-acetyl-DON pre metódy založené na imunite DON) sa nepovažuje za dôvod zvýšenia miery falošných negatívnych vzoriek cieľových mykotoxínov, no môže zvýšiť mieru falošných podozrivých vzoriek. Toto neželané zvýšenie sa zníži pomocou konfirmačnej analýzy pre jednoznačnú identifikáciu a kvantifikáciu mykotoxínov.

Matrice:

Počítačová validácia by sa mala vykonať pre každú komoditu, alebo, v prípade, že je o metóde známe, že je uplatniteľná na viaceré komodity, pre každú skupinu komodity. V druhom prípade sa z uvedenej skupiny vyberie jeden zástupca a príslušná komodita (pozri tabuľku A).

Skupina vzoriek:

Minimálny počet rôznych vzoriek vyžadovaných na validáciu je 20 homogénnych negatívnych kontrolných vzoriek a 20 homogénnych pozitívnych kontrolných vzoriek, ktoré obsahujú mykotoxín so STC, analyzovaných na vnútrolaboratórnu presnosť (RSD_{Ri}) počas 5 rôznych dní. Prípadne sa môže k validačnej skupine pridať 20 vzoriek obsahujúcich mykotoxín na iných úrovniach, aby sa zistilo, do akej miery metóda môže rozlíšiť jednotlivé koncentrácie mykotoxínov.

Koncentrácia:

Pre každú STC, ktorá sa má používať pri bežnej aplikácii, sa musí vykonať validácia.

4.3.2.3.2. Počítačová validácia prostredníctvom spoločných skúšok

Validácia pomocou spoločných skúšok sa vykonáva v súlade s medzinárodne uznaným protokolom o spoločných skúškach (napr. ISO 5725:1994 alebo IUPAC International Harmonised Protocol), ktorý si vyžaduje zahrnutie validačných údajov z aspoň ôsmich rôznych laboratórií. Okrem toho jediný rozdiel oproti jednotnej laboratórnej validácii je, že ≥ 20 vzoriek z každej komodity/úrovne môže byť rovnomerne rozdelených medzi zúčastnené laboratóriá, s minimálnym počtom dve vzorky za laboratórium.

⁽¹⁾ Vzorky sa považujú za vzorky bez výskytu analytu, ak množstvo prítomné vo vzorke nepresahuje viac ako 1/5th STC. Ak úroveň možno kvantifikovať pomocou konfirmačnej metódy, musí sa táto úroveň zohľadniť na účely posúdenia validácie.

4.3.2.4. Stanovenie medznej úrovne a miera falošne podozrivých výsledkov slepých vzoriek

(Relatívne) odozvy pri negatívnych kontrolných a pozitívnych kontrolných vzorkách sa berú ako základ pre výpočet vyžadovaných parametrov.

Skríningové metódy s proporcionálnou odozvou s koncentráciou mykotoxínov

Pri skríningových metódach s proporcionálnou odozvou s koncentráciou mykotoxínov sa uplatňuje:

$$\text{Medzná hodnota} = R_{\text{STC}} - t\text{-hodnota}_{0,05} * SD_{\text{STC}}$$

R_{STC} = priemerná odozva pozitívnych kontrolných vzoriek (pri STC)

t-hodnota: jednostranná t-hodnota pre mieru falošne negatívnych výsledkov 5 % (pozri tabuľku B)

SD_{STC} = štandardná odchýlka skríningové metódy s inverzne proporcionálnou odozvou s koncentráciou mykotoxínov

Pri skríningových metódach s inverzne proporcionálnou odozvou s koncentráciou mykotoxínov sa medzná hodnota stanovuje ako:

$$\text{Medzná hodnota} = R_{\text{STC}} + t\text{-hodnota}_{0,05} * SD_{\text{STC}}$$

Pomocou tejto špecifickej t-hodnoty na stanovenie medznej hodnoty je miera falošne negatívnych výsledkov štandardne stanovená na 5 %.

Hodnotenie vhodnosti na daný účel

Výsledky negatívnych kontrolných vzoriek sa používajú na odhad zodpovedajúcej miery falošne podozrivých výsledkov. T-hodnota sa vypočíta podľa prípadu, keď výsledok negatívnej kontrolnej vzorky presahuje medznú hodnotu, a preto sa nesprávne klasifikuje ako podozrivá.

t-hodnota = $(\text{medzná hodnota} - \text{priemer}_{\text{slepá vzorka}}) / SD_{\text{slepá vzorka}}$ pre skríningové metódy s proporcionálnou odozvou s koncentráciou mykotoxínov

alebo

t-hodnota = $(\text{priemer}_{\text{slepá vzorka}} - \text{medzná hodnota}) / SD_{\text{slepá vzorka}}$ pre skríningové metódy s inverzne proporcionálnou odozvou s koncentráciou mykotoxínov

Zo získanej t-hodnoty, na základe stupňov voľnosti vypočítaných z počtu experimentov, môže byť pravdepodobnosť falošne podozrivých vzoriek pre jednostrannú distribúciu buď vypočítaná (napr. funkcia tabuľky ,TDIST') alebo vybraná z tabuľky na t-distribúciu.

Zodpovedajúca hodnota jednostrannej t-distribúcie špecifikuje mieru falošne podozrivých výsledkov.

Táto koncepcia je podrobne opísaná s príkladom v analytickej a bioanalytickej chémii DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

4.3.2.5. Rozšírenie rozsahu pôsobnosti metódy

4.3.2.5.1. Rozšírenie rozsahu pôsobnosti na iné mykotoxíny:

Keď sa pridávajú nové mykotoxíny do rozsahu pôsobnosti existujúcej skríningovej metódy, vyžaduje sa úplná validácia na preukázanie vhodnosti metódy.

4.3.2.5.2. Rozšírenie na iné komodity:

Ak je o skríningovej metóde známe alebo ak od nej možno očakávať, že sa bude môcť uplatňovať na iné komodity, platnosť voči týmto iným komoditám sa musí overiť. Pokiaľ nová komodita patrí do skupiny komodít (pozri tabuľku A), pre ktoré sa už uskutočnila počiatočná validácia, obmedzená dodatočná validácia je postačujúca. Na tento účel sa musí analyzovať minimálne 10 homogénnych negatívnych kontrolných vzoriek a 10 homogénnych pozitívnych kontrolných vzoriek (pri STC) podľa podmienok vnútrolaboratórnej presnosti. Pozitívne kontrolné vzorky musia mať vyššiu hodnotu ako je medzná hodnota. V prípade, že toto kritérium nie je splnené, vyžaduje sa validácia.

4.3.2.6. Validácia metód už validovaných prostredníctvom spoločných skúšok

V prípade skriningových metód, ktoré už boli úspešne validované prostredníctvom spoločnej laboratórnej skúšky, sa musí overiť účinnosť metódy. Na tento účel sa musí analyzovať minimálne 6 negatívnych kontrolných vzoriek a 6 pozitívnych kontrolných vzoriek (pri STC). Pozitívne kontrolné vzorky musia mať vyššiu hodnotu ako medzná hodnota. V prípade, že toto kritérium nie je splnené, laboratórium musí uskutočniť analýzu hlavných príčin s cieľom určiť, prečo nemôže splniť špecifikáciu získanú pri spoločnej skúške. Až po prijatí nápravných opatrení musí opätovne overiť účinnosť metódy vo svojom laboratóriu. V prípade, že laboratórium nie je schopné overiť výsledky spoločnej skúšky, bude musieť stanoviť svoju vlastnú medznú hodnotu v úplnej vnútrolaboratórnej validácii.

4.3.2.7. Nepretržitá metóda overovania/priebežná validácia metódy

Po prvotnej validácii, sa údaje z dodatočnej validácie získavajú aj minimálne pomocou dvoch pozitívnych kontrolných vzoriek v každej dávke vzoriek, ktorá sa podrobuje skriningu. Jedna pozitívna kontrolná vzorka je známa vzorka (napr. vzorka použitá počas prvotnej validácie), ďalšia je odlišná komodita z rovnakej skupiny komodít (v prípade, že sa analyzuje len jedna komodita, použije sa namiesto nej iná vzorka uvedenej komodity). Zaradenie negatívnej kontrolnej vzorky je nepovinné. Výsledky získané pre dve pozitívne kontrolné vzorky sa pridávajú k existujúcej validačnej skupine.

Aspoň raz ročne sa opätovne stanoví medzná hodnota a opätovne sa posúdi platnosť metódy. Nepretržitá metóda overovania slúži na niekoľko účelov:

- kontrola kvality pre dávku vzoriek, ktoré boli podrobené skriningu
- poskytovanie informácií o robustnosti metódy za podmienok v laboratóriu, ktoré uplatňuje metódu
- odôvodnenie použiteľnosti metódy na rôznych komoditách
- umožnenie úpravy medzných hodnôt v prípade postupných posunov v priebehu času.

4.3.2.8. Správa o validácii

Správa o validácii musí obsahovať:

- vyhlásenie o STC
- vyhlásenie o získanej medznej hodnote.

Poznámka: Medzná hodnota musí mať rovnaký počet významných hodnôt ako STC. Číselné hodnoty používané na výpočet medznej hodnoty musí mať aspoň jednu významnejšiu hodnotu ako STC.

- Vyhlásenie o vypočítanej miere falošne podozrivých vzoriek
- vyhlásenie o tom, ako vznikla miera podozrivých falošných vzoriek.

Poznámka: Vo vyhlásení o vypočítanej miere falošne podozrivých vzoriek sa uvádza, či je metóda vhodná na daný účel, a takisto sa uvádza počet slepých vzoriek (alebo s nízkou úrovňou kontaminácie), ktoré budú podrobené overeniu.

Tabuľka A

Skupiny komodít na validáciu skriningových metód

Skupiny komodít	Kategórie komodít	Typické reprezentatívne komodity zahrnuté do kategórie
Vysoký obsah vody	ovocné šťavy	jablková šťava, hroznová šťava
	alkoholické nápoje	víno, pivo, mušt
	koreňová a hľuzová zelenina	čerstvý zázvor
	pyré na báze obilnín alebo ovocia	pyré určené pre dojčatá a malé deti

Skupiny komodít	Kategórie komodít	Typické reprezentatívne komodity zahrnuté do kategórie
Vysoký obsah oleja	orechy stromové	orech kráľovský, lieskový orech, gaštan
	olejnaté semená a produkty z nich	repka olejná, slnečnica, bavlníkové semená, sójové bôby, arašidy, sezam atď.
	olejnaté plody a produkty z nich	Oleje a pasty (napr. arašidové maslo, tehina)
Vysoký obsah škrobu a/alebo bielkovín a nízky obsah vody a tukov	zrno obilnín a produkty z neho	pšenica, raž, jačmeň, kukurica, ryža, ovos, celozrnný chlieb, biely chlieb, krekery, cereálne raňajky, cestoviny
	dietetické výrobky	sušené prášky na prípravu potravín pre dojčatá a malé deti
Vysoký obsah kyselín a vysoký obsah vody (*)	citrusové produkty	
náročné alebo jedinečné komodity (**)		kakaové bôby a produkty z nich, kokosový orech a produkty z neho káva, čaj korenie, sladké drevko
Vysoký obsah cukrov nízky obsah vody	Sušené ovocie	figy, hrozienka, ríbezle, sultánky
Mlieko a mliečne výrobky	Mlieko	kravské, kozie a byvolie mlieko
	syr	kravský, kozí syr
	mliečne výrobky (napr. sušené mlieko)	jogurt, smotana

(*) Ak sa tlmivý roztok používa na stabilizáciu zmien pH počas extrakcie, potom sa táto skupina komodít môže zlučiť do jednej skupiny komodít ‚vysoký obsah vody‘.

(**) ‚Náročné alebo jedinečné komodity‘ by mali byť plne validované len vtedy, ak sú často analyzované. Ak sú analyzované len príležitostne, validácia sa môže obmedziť len na kontrolu ohlasovania hladín s použitím obohatených slepých extraktov.

Tabuľka B

Jednostranná t-hodnota pre mieru falošných negatívnych vzoriek s hodnotou 5 %

Stupne voľnosti	Počet duplikátov	t-hodnota (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

Stupne voľnosti	Počet duplikátov	t-hodnota (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. Požiadavky na kvalitatívne skríningové metódy (metódy, ktoré neposkytujú číselné hodnoty)

Rozvoj usmernení k validácii pre binárne testovacie metódy v súčasnosti podlieha rôznym normalizačným subjektom (napr. AOAC, ISO). Združenie AOAC nedávno navrhlo usmernenie k tejto problematike. Tento dokument možno považovať za aktuálny stav v tejto oblasti. Preto by metódy, ktoré poskytujú binárne výsledky (napr. vizuálna kontrola testovacích prúžkov), mali byť validované podľa tohto usmernenia

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

4.4. Odhad neistoty merania, výpočet výťažnosti a oznamovanie výsledkov ⁽¹⁾

4.4.1. Konfirmačné metódy

Analytický výsledok sa musí oznamovať ako:

- upravený vzhľadom na výťažnosť s uvedením úrovne výťažnosti. Korekcia vzhľadom na výťažnosť nie je potrebná v prípade, že miera výťažnosti sa pohybuje v rozmedzí 90 – 110 %.
- $x \pm U$, pričom x je analytický výsledok a U je rozšírená neistota merania, pričom sa použije koeficient pokrytia 2, ktorý poskytuje úroveň spoľahlivosti približne 95 %.

V prípade potravín živočíšneho pôvodu sa neistota merania môže zohľadniť takisto stanovením rozhodujúceho limitu (CCa) v súlade s rozhodnutím Komisie 2002/657/ES ⁽²⁾ (bod 3.1.2.5 prílohy I – prípad látok so stanoveným povoleným limitom).

Ak je však výsledok analýzy výrazne (> 50 %) nižší ako maximálna hodnota alebo oveľa vyšší ako maximálna hladina (t. j. viac ako päťnásobok maximálnej hladiny), a pod podmienkou, že sa použijú vhodné postupy kvality a analýzy a slúži len na účel kontroly dodržiavania právnych predpisov, môže sa analytický výsledok ohlásiť bez korekcie vzhľadom na výťažnosť a oznamovanie miery výťažnosti a neistoty merania možno vynechať.

⁽¹⁾ Podrobnejšie informácie o postupoch zameraných na odhad neistoty merania a o postupoch posudzovania výťažnosti možno nájsť v správe Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation (Správa o vzťahu medzi analytickými výsledkami, neistotou merania, faktormi výťažnosti a ustanoveniami právnych predpisov EÚ o potravinách a krmivách) http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf.

⁽²⁾ Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES zo 14. augusta 2002, ktorým sa vykonáva smernica Rady 96/23/ES týkajúca sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov (Ú. v. ES L 221, 17.8.2002, s. 8).

Súčasnú pravidlá interpretácie analytického výsledku vzhľadom na prijatie alebo odmietnutie dávky sa uplatňujú na analytický výsledok získaný pri vzorke určenej na úradnú kontrolu. V prípade analýzy na účely obrany alebo arbitráže sa uplatňujú vnútroštátne pravidlá.

4.4.2. *Skríninové metódy*

Výsledok skríningu sa vyjadruje ako vyhovujúci alebo s podozrením na nesúlad.

„S podozrením na nesúlad“ znamená, že medzná hodnota vzorky je prekročená a vzorka môže obsahovať mykotoxín na úrovni vyššej ako STC. Každý podozrivý výsledok je impulzom pre konfirmačnú analýzu na jednoznačnú identifikáciu a kvantifikáciu mykotoxínov.

„Vyhovujúca“ znamená, že obsah mykotoxínov vo vzorke je < STC s presnosťou 95 % (t. j. existuje 5 % šanca, že vzorky budú chybné oznámené ako negatívne). Analytický výsledok sa oznamuje ako „< úroveň STC“ so špecifikovanou úrovňou STC.“
