

REGLAMENTO (UE) N° 519/2014 DE LA COMISIÓN**de 16 de mayo de 2014****que modifica el Reglamento (CE) n° 401/2006 en lo relativo a los métodos de muestreo de los lotes de gran tamaño, las especias y los complementos alimenticios; las normas de referencia para las toxinas T-2 y HT-2 y para la citrinina, y los métodos analíticos de cribado****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales ⁽¹⁾, y, en particular, su artículo 11, apartado 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) n° 1881/2006 de la Comisión ⁽²⁾ fija los límites máximos de determinadas micotoxinas en algunos productos alimenticios.
- (2) El muestreo desempeña un papel fundamental en la precisión de la determinación del contenido de micotoxinas, que se distribuyen de manera heterogénea en los lotes. Así pues, es necesario establecer los criterios que deben cumplir los métodos de muestreo.
- (3) El Reglamento (CE) n° 401/2006 de la Comisión ⁽³⁾ establece los criterios de muestreo a efectos del control del contenido de micotoxinas.
- (4) Es necesario modificar las normas relativas a la toma de muestras de las especias a fin de tener en cuenta las diferencias en el tamaño de las partículas que conducen a la distribución heterogénea de la contaminación por micotoxinas. Además, conviene establecer normas para la toma de muestras de lotes de gran tamaño a fin de garantizar un enfoque uniforme de la normativa en toda la Unión. También es necesario aclarar qué método de muestreo debe aplicarse para el muestreo del zumo de manzana.
- (5) Las normas de referencia para las toxinas T-2 y HT-2 deben actualizarse a fin de tener en cuenta el progreso científico y tecnológico. Las normas de referencia para la citrinina deben establecerse teniendo en cuenta el nivel máximo fijado para ella en los complementos alimenticios a base de arroz fermentado con la levadura roja *Monascus purpureus*.
- (6) Para analizar las micotoxinas se utilizan cada vez más metodologías de cribado. Conviene establecer los criterios que deben cumplir los métodos de cribado para que puedan utilizarse con fines reguladores.
- (7) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El Reglamento (CE) n° 401/2006 queda modificado como sigue:

1) El anexo I se modifica del modo siguiente:

a) en la parte B, la nota 1 a pie de página se sustituye por el texto siguiente:

«(1) La toma de muestras de estos lotes se efectuará con arreglo a lo dispuesto en la parte L. Se facilitarán orientaciones sobre la toma de muestras de lotes de gran tamaño en un documento que estará disponible en: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/guidance-sampling-final.pdf>»⁽¹⁾ DO L 165 de 30.4.2004, p. 1.⁽²⁾ Reglamento (CE) n° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (DO L 364 de 20.12.2006, p. 5).⁽³⁾ Reglamento (CE) n° 401/2006 de la Comisión, de 23 de febrero de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios (DO L 70 de 9.3.2006, p. 12).

Las reglas para la toma de muestras con arreglo a la norma EN ISO 24333:2009 o a la norma nº 124 de la Asociación de Comercio de Granos y Piensos que se aplican a la industria alimentaria para garantizar el cumplimiento de las disposiciones legislativas equivalen a las establecidas en la parte L.

Las reglas para la toma de muestras de lotes con toxinas *Fusarium* con arreglo a la norma EN ISO 24333:2009 o a la norma nº 124 de la Asociación de Comercio de Granos y Piensos que se aplican a la industria alimentaria para garantizar el cumplimiento de las disposiciones legislativas equivalen a las establecidas en la parte B.»;

- b) el cuadro 1 del punto B.2 se sustituye por el siguiente:

«Cuadro 1

Subdivisión de los lotes en sublotos, en función del producto y del peso del lote

Producto	Peso del lote (t)	Peso o número de sublotos	Número de muestras elementales	Peso de la muestra global (kg)
Cereales y productos a base de cereales	> 300 y < 1 500	3 sublotos	100	10
	≥ 50 y ≤ 300	100 t	100	10
	< 50	—	3-100 (*)	1-10

(*) Según el peso del lote: véase el cuadro 2.»;

- c) en el punto B.3, al final del primer guion se añade la frase siguiente:

«Para los lotes > 500 t, el número de muestras elementales se prevé en el punto L. 2 del anexo I.»;

- d) en el punto D.2, al final de la primera frase se añade la frase siguiente:

«Este método de muestreo es también aplicable al control oficial del contenido máximo establecido de ocratoxina A, aflatoxina B₁ y aflatoxinas totales en las especias con un tamaño de partícula relativamente grande (comparable a los cacahuetes o mayor, como a la nuez moscada).»;

- e) en la parte E, la primera frase se sustituye por el texto siguiente:

«Este método de muestreo es aplicable al control oficial del contenido máximo establecido de ocratoxina A, aflatoxina B₁ y aflatoxinas totales en las especias, excepto las de un tamaño de partícula relativamente grande (distribución heterogénea de la contaminación por micotoxinas).»;

- f) en la parte I, el título y primera frase se sustituyen por el texto siguiente:

I. MÉTODO DE MUESTREO PARA LOS PRODUCTOS SÓLIDOS A BASE DE MANZANA

Este método de muestreo es aplicable al control oficial de los contenidos máximos establecidos para la patulina en los productos sólidos a base de manzana, incluidos los destinados a lactantes y niños de corta edad.»;

- g) en el punto I.1, párrafo segundo, se suprimen las frases siguientes:

«Cuando se trate de productos líquidos, el lote se mezclará lo más posible por medios manuales o mecánicos inmediatamente antes de procederse al muestreo. En este caso se supone una distribución homogénea de la patulina en un lote determinado; por tanto, bastará con tomar tres muestras elementales por lote para formar la muestra global.»;

- h) se añaden las nuevas partes L y M, de acuerdo con lo dispuesto en el anexo I del presente Reglamento.

- 2) En el anexo II, los puntos 4.2 («Requisitos generales»), 4.3 «Requisitos específicos» y 4.4 («Estimación de la incertidumbre de medición, cálculo de la tasa de recuperación y registro de los resultados») se sustituyen por el texto que figura en el anexo II del presente Reglamento.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 1 de julio de 2014.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 16 de mayo de 2014.

Por la Comisión
El Presidente
José Manuel BARROSO

ANEXO I

«L. MÉTODO DE MUESTREO DE LOTES MUY GRANDES, O TRANSPORTADOS O ALMACENADOS DE MODO QUE NO PUEDAN MUESTREARSE EN SU TOTALIDAD

L.1. **Principios generales**

Cuando el medio de transporte o almacenamiento de un lote no permita tomar muestras elementales de su totalidad, el muestreo se realizará de preferencia con el lote en movimiento (muestreo dinámico).

Los operadores de almacenes de alimentos de grandes dimensiones deben instalar equipos que posibiliten el muestreo (automático) del conjunto del lote almacenado.

Cuando se apliquen los procedimientos de muestreo previstos en esta parte L, el explotador de la empresa alimentaria o su representante deben ser informados del procedimiento de muestreo. Si el explotador de la empresa alimentaria o su representante cuestionan dicho procedimiento de muestreo, deberán permitir que la autoridad competente proceda al muestreo de la totalidad del lote, y correrán con los costes.

Se permite el muestreo de una parte del lote a condición de que la cantidad de la parte de la muestra sea de al menos el 10 % de los lotes objeto de muestreo. Si una parte de un lote de alimentos de la misma clase o descripción ha sido muestreado y se considera que incumple los requisitos de la Unión, se presumirá que la totalidad del lote también está afectada, a menos que una nueva evaluación detallada demuestre que el resto del lote es satisfactorio.

Las disposiciones pertinentes, como el peso de la muestra elemental, previstas en las demás partes del presente anexo son aplicables al muestreo de grandes lotes o lotes almacenados o transportados en un medio para el que el muestreo de todo el lote no sea viable.

L.2. **Número de muestras elementales que deben tomarse en el caso de grandes lotes**

En el caso de grandes lotes objeto de muestreo (lotes > 500 t), el número de muestras elementales que deben tomarse será igual a $100 + \sqrt{t}$. No obstante, en caso de que el lote sea inferior a 1 500 t, que pueda subdividirse en sublotes según el cuadro 1 de la parte B y que los sublotes puedan separarse físicamente, se tomará el número de muestras elementales previsto en la parte B.

L.3. **Lotes grandes transportados en buque**

L.3.1. *Muestreo dinámico de lotes grandes transportados en buque*

El muestreo de lotes grandes transportados en buque se realiza de preferencia con el lote en movimiento (muestreo dinámico).

El muestreo se realiza por bodega (espacio separable físicamente), pero las bodegas se vacían parcialmente una tras otra, con lo cual la separación inicial ya no existe una vez transferido el contenido al almacén. Por ello, el muestreo puede hacerse según la separación inicial o según la separación después de transferido el contenido al almacén.

La descarga de un buque puede durar varios días. Normalmente, el muestreo se realiza a intervalos regulares durante toda la duración de la descarga. Sin embargo, no siempre es factible o adecuado que un inspector oficial esté presente para hacer el muestreo durante toda la operación de descarga. Así pues, puede realizarse el muestreo de una parte del lote (lote de muestra). El número de muestras elementales se determina en función del tamaño del lote de muestra.

Aunque el muestreo oficial sea automático, tiene que estar presente un inspector. No obstante, si el muestreo automático se realiza con parámetros predeterminados que no pueden modificarse durante el mismo y las muestras elementales se recogen en un recipiente precintado, lo que impide todo posible fraude, el inspector solo tiene que estar presente al comienzo del muestreo, cada vez que se cambia el recipiente y al final del muestreo.

L.3.2. *Muestreo estático de lotes transportados en buque*

El muestreo estático seguirá el mismo procedimiento establecido para los almacenes (silos) de carga superior (véase el punto L.5.1).

El muestreo se realizará en la parte accesible (superior) del lote o la bodega. El número de muestras elementales se determinará en función del tamaño del lote de muestra.

L.4. Muestreo de lotes grandes almacenados en depósitos

El muestreo se realizará en la parte accesible del lote. El número de muestras elementales se determinará en función del tamaño del lote de muestra.

L.5. Muestreo en almacenes (silos)**L.5.1. Muestreo de silos (fácilmente) accesibles por su parte superior**

El muestreo se realizará en la parte accesible del lote. El número de muestras elementales se determinará en función del tamaño del lote de muestra.

L.5.2. Muestreo de silos no accesibles por su parte superior (silos cerrados)**L.5.2.1. Silos no accesibles por su parte superior (silos cerrados) > 100 t**

Los alimentos almacenados en este tipo de silos no pueden someterse a un muestreo estático. Por tanto, si hay que tomar una muestra del alimento de este silo y no es posible desplazarlo, hay que llegar a un acuerdo con el operador para que comunique al inspector cuándo se descargará parcial o completamente el silo, de modo que se proceda entonces a un muestreo dinámico de los alimentos.

L.5.2.2. Silos no accesibles por su parte superior (silos cerrados) < 100 t

Contrariamente al muestreo de una parte previsto en el punto L.1 (parte de al menos el 10 %), el procedimiento de muestreo implica poner en un recipiente una cantidad de 50 a 100 kg y tomar la muestra de él. El tamaño de la muestra global corresponde a la totalidad del lote y el número de muestras elementales corresponde a la cantidad de alimento que se ha trasladado del silo al recipiente para el muestreo.

L.6. Muestreo de alimentos a granel en grandes contenedores cerrados

Estos lotes solo suelen poder muestrearse cuando se descargan. En algunos casos no es posible descargar en el punto de importación o control, por lo que hay que proceder al muestreo al descargar los contenedores. El operador debe informar a los inspectores sobre el lugar y el momento de la descarga de los contenedores.

M. MÉTODO DE MUESTREO DE COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS A BASE DE ARROZ FERMENTADO CON LEVADURA ROJA *MONASCUS PURPUREUS*

Este método de muestreo es aplicable al control oficial de los contenidos máximos establecidos para la citrinitina en complementos alimenticios a base de arroz fermentado con levadura roja *Monascus purpureus*.

Procedimiento de muestreo y tamaño de la muestra

El procedimiento de muestreo parte del supuesto de que los complementos alimenticios a base de arroz fermentado con levadura roja *Monascus purpureus* se comercializan en envases para la venta al por menor que contienen generalmente de 30 a 120 cápsulas por paquete.

Tamaño del lote (envases para la venta al por menor)	Paquetes que deben formar la muestra	Tamaño de la muestra
1-50	1	Todas las cápsulas.
51-250	2	Todas las cápsulas.
251-1 000	4	La mitad de las cápsulas de cada paquete.
> 1 000	4 + 1 por cada 1 000 envases para la venta al por menor, con un máximo de 25 paquetes	Si el número de paquetes no es superior a 10: la mitad de las cápsulas de cada paquete. Si el número de paquetes es superior a 10: un número igual de cápsulas de cada paquete hasta constituir una muestra equivalente al contenido de 5 paquetes».

ANEXO II

«4.2. Requisitos generales

Los métodos de confirmación de análisis utilizados para el control de los alimentos se ajustarán a lo dispuesto en los puntos 1 y 2 del anexo III del Reglamento (CE) n° 882/2004.

4.3. Requisitos específicos

4.3.1. Requisitos específicos para métodos de confirmación

4.3.1.1. Criterios de funcionamiento

Se recomienda la utilización de métodos de confirmación plenamente validados (es decir, validados por ensayos colectivos para las matrices correspondientes) cuando resulte oportuno y posible. También pueden utilizarse otros métodos de confirmación validados adecuados (como métodos validados internamente con las matrices correspondientes del grupo de productos pertinente), siempre que cumplan los criterios de funcionamiento establecidos en los cuadros siguientes.

Cuando sea posible, la validación de los métodos validados internamente incluirá material de referencia certificado.

a) Criterios de funcionamiento para las aflatoxinas

Criterio	Intervalo de concentración	Valor recomendado	Valor máximo autorizado
Blancos	Todos	Desdeñable	—
Recuperación — Aflatoxina M1	0,01-0,05 mg/kg	de 60 a 120 %	
	> 0,05 mg/kg	de 70 a 110 %	
Recuperación — Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	< 1,0 mg/kg	de 50 a 120 %	
	1-10 mg/kg	de 70 a 110 %	
	> 10 mg/kg	de 80 a 110 %	
Reproducibilidad (RSD _R)	Todos	Derivada de la ecuación de Horwitz (*) (**)	Dos veces el valor derivado de la ecuación de Horwitz (*) (**)

La precisión puede calcularse como 0,66 veces la reproducibilidad RSD_R a la concentración que interese.

Nota:

- Valores aplicables tanto a B₁ como a la suma de B₁ + B₂ + G₁ + G₂.
- Si debe notificarse la suma de cada aflatoxina B₁ + B₂ + G₁ + G₂, la respuesta de cada una al sistema analítico tiene que ser conocida o equivalente.

b) Criterios de funcionamiento para la ocratoxina A

Contenido (µg/kg)	Ocratoxina A		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperación %
< 1	≤ 40	≤ 60	de 50 a 120
≥ 1	≤ 20	≤ 30	de 70 a 110

c) Criterios de funcionamiento para la patulina

Contenido (µg/kg)	Patulina		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperación %
< 20	≤ 30	≤ 40	de 50 a 120
20–50	≤ 20	≤ 30	de 70 a 105
> 50	≤ 15	≤ 25	de 75 a 105

d) Criterios de funcionamiento para el deoxinivalenol

Contenido (µg/kg)	Deoxinivalenol		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperación %
> 100 y ≤ 500	≤ 20	≤ 40	de 60 a 110
> 500	≤ 20	≤ 40	de 70 a 120

e) Criterios de funcionamiento para la zearalenona

Contenido (µg/kg)	Zearalenona		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperación %
≤ 50	≤ 40	≤ 50	de 60 a 120
> 50	≤ 25	≤ 40	de 70 a 120

f) Criterios de funcionamiento para las fumonisinas B₁ o B₂ por separado

Contenido (µg/kg)	Fumonisinas B ₁ o B ₂		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperación %
≤ 500	≤ 30	≤ 60	de 60 a 120
> 500	≤ 20	≤ 30	de 70 a 110

g) Criterios de funcionamiento para las toxinas T-2 o HT-2 por separado

Contenido (µg/kg)	Toxinas T-2 o HT-2		
	RSD _r %	RSD _R %	Recuperación %
15-250	≤ 30	≤ 50	de 60 a 130
> 250	≤ 25	≤ 40	de 60 a 130

h) Criterios de funcionamiento para la citrinina

Contenido (µg/kg)	Citrinina			Recuperación %
	RSD _r %	RSD _R % recomendado	RSD _R % máximo autorizado	
Todos	$0,66 \times \text{RSD}_R$	Derivada de la ecuación de Horwitz (*) (**)	Dos veces el valor derivado de la ecuación de Horwitz (*) (**)	de 70 a 120

- i) Observaciones sobre los criterios de funcionamiento para las micotoxinas:
- No se indican los límites de detección de los métodos utilizados, puesto que se dan los valores de precisión para las concentraciones que presentan interés.
 - Los valores de precisión se calculan a partir de la ecuación de Horwitz: la original para concentraciones $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$ (*) y la modificada para concentraciones $C < (1,2 \times 10^{-7})$ (**).

(*) Ecuación de Horwitz para concentraciones $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$:

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

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

(**) Ecuación de Horwitz (*) modificada para concentraciones $C < 1,2 \times 10^{-7}$:

$$RSD_R = 22 \%$$

(ref.: M. Thompson, Analyst, 2000, 125, pp. 385-386)

donde:

- RSD_R es la desviación estándar relativa calculada a partir de los resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad $[(sR) \times 100]$;
- C es el cociente de concentración (a saber, $1 = 100 \text{ g}/100 \text{ g}$, $0,001 = 1 \text{ 000 mg}/\text{kg}$).

Se trata de una ecuación de precisión generalizada, independiente del análisis y de la matriz, y dependiente únicamente de la concentración en la mayoría de los métodos habituales de análisis.

4.3.1.2. Enfoque de la adecuación a los objetivos

Para los métodos validados internamente puede utilizarse como alternativa el enfoque de la adecuación a los objetivos (***) a fin de evaluar su adecuación al control oficial. Los métodos adecuados para el control oficial deben arrojar resultados con una incertidumbre estándar de medida (U) inferior a la incertidumbre estándar máxima de medida calculada con la siguiente fórmula:

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

donde:

- Uf es la incertidumbre estándar máxima de medida ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- LOD es el límite de detección del método ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
- α es una constante numérica que se utilizará en función del valor de C ; los valores que se utilizarán se establecen en el cuadro siguiente,
- C es la concentración de interés ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Si el método analítico proporciona resultados con mediciones de la incertidumbre inferiores a la incertidumbre estándar máxima, el método se considerará igual de adecuado que uno que se ajuste a los criterios de funcionamiento señalados en el punto 4.3.1.1.

Cuadro

Valores numéricos que deben darse a α como constante de la fórmula establecida en el presente punto, en función de la concentración de interés

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.: M. Thompson and R. Wood, Accred. Qual. Assur., 2006, 10, pp. 471-478.

4.3.2. Requisitos específicos para métodos semicuantitativos de cribado

4.3.2.1. Ámbito de aplicación

Estos requisitos se aplican a los métodos bioanalíticos basados en el inmunorreconocimiento o en la unión a los receptores (por ejemplo, ELISA, medidas de nivel, dispositivos de flujo lateral, inmunosensores) y a los métodos fisicoquímicos basados en la cromatografía o en la detección directa por espectrometría de masas (por ejemplo, espectrografía de masas ambiente). No se excluyen otros métodos (por ejemplo, cromatografía de capa fina), siempre que las señales generadas se refieran directamente a las micotoxinas de interés y permitan aplicar el principio descrito a continuación.

Los requisitos específicos se aplican a los métodos cuyo resultado de medición es un valor numérico, por ejemplo una respuesta (relativa) de un lector de nivel, una señal de cromatografía líquida acoplada a espectrografía de masas, etc., y que se someten a las estadísticas normales.

Los requisitos no se aplican a los métodos que no dan valores numéricos (por ejemplo, únicamente una línea presente o ausente), que requieren diferentes planteamientos de validación. Los requisitos específicos para estos métodos figuran en el punto 4.3.3.

El presente documento describe los procedimientos de validación de los métodos de cribado mediante una validación interlaboratorios, la verificación de la eficacia de un método validado mediante un ejercicio interlaboratorios y la validación por un solo laboratorio de un método de cribado.

4.3.2.2. Terminología

“Concentración para cribado selectivo (CCS)”: la concentración de interés para detectar la micotoxina en una muestra. Cuando el objetivo es comprobar que se cumplen los límites reglamentarios, la CCS equivale al nivel máximo aplicable. Para otros fines, o en caso de que no se haya establecido un nivel máximo, la CCS se fija de antemano por el laboratorio.

“Método de cribado”: método utilizado para seleccionar con una certeza determinada las muestras con niveles de micotoxinas que superan la CCS. A efectos de la selección de micotoxinas, una certeza del 95 % se considera adecuada a su objetivo. El resultado de un análisis de cribado ha de ser “negativo” o “sospechoso”. Los métodos de cribado permiten analizar un elevado número de muestras en poco tiempo con una buena relación coste-eficacia, aumentando así la posibilidad de descubrir nuevos incidentes con alta exposición y riesgo para la salud de los consumidores. Deben basarse en métodos bioanalíticos, de cromatografía líquida acoplada a espectrografía de masas o de cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados de las muestras que superen el valor de corte se verificarán con un nuevo análisis completo de la muestra original mediante un método de confirmación.

“Muestra negativa” significa que el contenido de micotoxinas en la muestra es inferior a la CCS con una certeza del 95 % (es decir, hay un 5 % de probabilidades de que las muestras se califiquen incorrectamente como negativas).

“Muestra de falso negativo” significa que el contenido de micotoxinas en la muestra es superior a la CCS, pero que se ha calificado como negativa.

“Muestra sospechosa” (muestra positiva) significa que la muestra supera el valor de corte (véase más adelante) y puede contener micotoxinas a un nivel más elevado que en la CCS. Cualquier resultado sospechoso activa un análisis de confirmación para identificar y cuantificar de forma inequívoca las micotoxinas.

“Muestra de falsa sospecha” es una muestra negativa que ha sido calificada de sospechosa.

“Métodos de confirmación” son los que proporcionan información total o complementaria que permite identificar y cuantificar de manera inequívoca la micotoxina al nivel de interés.

“Valor de corte”: respuesta, señal o concentración, obtenida por el método de cribado, cuya superación hace que la muestra deba clasificarse como “sospechosa”. El corte se determina durante la validación y tiene en cuenta la variabilidad de la medición.

“Muestra de control negativo (matriz en blanco)”: muestra identificada como exenta ⁽¹⁾ de micotoxinas destinada al cribado para utilizarla, por ejemplo, en determinaciones previas de un método de confirmación de precisión suficiente. Si no pueden obtenerse estas muestras puede utilizarse el material con el que pueda obtenerse el nivel más bajo, siempre que permita llegar a la conclusión de que el método de cribado es adecuado para su objetivo.

“Muestra de control positivo”: muestra que contiene la micotoxina en la CCS, como un material de referencia certificado o un material de contenido conocido (por ejemplo, material para ensayos de aptitud) u otro suficientemente caracterizado por un método de confirmación. En ausencia de cualquiera de las mencionadas, puede utilizarse una mezcla de muestras con diferentes niveles de contaminación o una muestra enriquecida elaborada en laboratorio y suficientemente caracterizada, siempre que pueda demostrarse que el nivel de contaminación ha sido comprobado.

4.3.2.3. Procedimiento de validación

El objetivo de la validación es demostrar la adecuación al objetivo del método de cribado. Se hace mediante la determinación del valor de corte y la determinación del porcentaje de falsos negativos y falsas sospechas. Estos dos parámetros incorporan las características de funcionamiento, como la sensibilidad, la selectividad y la precisión.

Los métodos de cribado pueden someterse a una validación interlaboratorios o ser validados por un solo laboratorio. Si ya están disponibles los datos de la validación interlaboratorios para una determinada combinación micotoxina/matriz/CCS, basta una verificación del funcionamiento del método en un laboratorio que lo aplique.

4.3.2.3.1. Validación inicial por un solo laboratorio

Micotoxinas

La validación se llevará a cabo para cada micotoxina en el ámbito de aplicación. En el caso de métodos bioanalíticos que ofrezcan una respuesta combinada para un determinado grupo de micotoxinas (como las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, o las fumonisinas B₁ y B₂), deberá demostrarse la aplicabilidad y las limitaciones del ensayo mencionado en el ámbito de aplicación del método. No se considera que la reactividad cruzada no deseada (como el deoxinivalenol-3-glicósido, el 3- o el 15-acetil-deoxinivalenol en métodos inmunológicos para el deoxinivalenol) incremente el porcentaje de falsos negativos de las micotoxinas en cuestión, pero puede incrementar el de falsas sospechas. Este incremento no deseado se verá reducido por un análisis de confirmación, con el fin de identificar y cuantificar inequívocamente las micotoxinas.

Matrices

Debe efectuarse una validación inicial para cada producto o, si se sabe que el método es aplicable a varios productos, para cada grupo de productos. En este último caso se selecciona de dicho grupo un producto representativo y pertinente (véase el cuadro A).

Conjunto de la muestra

El número mínimo de muestras diferentes para la validación es de 20 muestras homogéneas de control negativo y 20 muestras homogéneas de control positivo que contengan las micotoxinas en la CCS, analizadas en condiciones de precisión intermedia (RSD_{Ri}) en 5 días diferentes. Con carácter facultativo, podrá añadirse una unidad suplementaria de 20 muestras que contengan la micotoxina en otros contenidos al conjunto de validación para averiguar en qué medida el método puede distinguir entre diferentes concentraciones de micotoxinas.

Concentración

Se validará cada CCS que se utilice sistemáticamente.

4.3.2.3.2. Validación inicial a través de ensayos en colaboración

La validación a través de ensayos en colaboración debe hacerse siguiendo un protocolo reconocido internacionalmente sobre estos ensayos (como ISO 5725:1994 o el protocolo armonizado internacional de la IUPAC), lo que requiere incluir datos válidos de al menos ocho laboratorios diferentes. Aparte de eso, la única diferencia en comparación con las validaciones en un laboratorio único es que un número no inferior a 20 muestras por producto/contenido puede dividirse entre los laboratorios participantes, con un mínimo de dos muestras por laboratorio.

⁽¹⁾ Las muestras se consideran exentas del análisis si la cantidad presente en la muestra no supera la CCS en más de 1/5. Si el nivel puede cuantificarse gracias a un método de confirmación, ese nivel se tendrá en cuenta para evaluar la validación.

4.3.2.4. Determinación del valor de corte y del porcentaje de falsas sospechas de las muestras en blanco

Las respuestas (relativas) relativas a las muestras de control negativas y positivas se toman como base de cálculo de los parámetros requeridos.

Métodos de cribado con una respuesta proporcional a la concentración de micotoxinas

Para los métodos de cribado con una respuesta proporcional a la concentración de micotoxinas se aplica la fórmula siguiente:

$$\text{Corte} = R_{\text{CCS}} - \text{valor } t_{0,05} * SD_{\text{CCS}}$$

R_{CCS} = respuestas de muestras de control positivas (en la CCS),

valor t = un valor t unicaudal para un porcentaje de falsos negativos del 5 % (véase el cuadro B),

SD_{CCS} = desviación estándar. Métodos de cribado con una respuesta inversamente proporcional a la concentración de micotoxinas

Análogamente, para los métodos de cribado con una respuesta inversamente proporcional a la concentración de micotoxinas, el valor de corte se determina del modo siguiente:

$$\text{Corte} = R_{\text{CCS}} - \text{valor } t_{0,05} * SD_{\text{CCS}}$$

Con este valor t específico para establecer el valor de corte, el porcentaje de falsos negativos se fija por defecto en el 5 %.

Evaluación de la adaptación al objetivo

Los resultados de las muestras de control negativas se utilizan para calcular el porcentaje de falsas sospechas. El valor t se calcula en correspondencia con el caso de que el resultado de una muestra de control negativa esté por encima del valor de corte y se clasifique erróneamente como sospechosa.

valor t = $(\text{corte} - \text{media}_{\text{en blanco}}) / SD_{\text{en blanco}}$ para los métodos de cribado con una respuesta proporcional a la concentración de micotoxinas

o

valor t = $(\text{media}_{\text{en blanco}} - \text{corte}) / SD_{\text{en blanco}}$ para los métodos de cribado con una respuesta inversamente proporcional a la concentración de micotoxinas.

Para una distribución unicaudal, a partir del valor t obtenido sobre la base de los grados de libertad calculados en función del número de experimentos se puede, bien calcular la probabilidad de muestras falsamente sospechosas (por ejemplo, con la función TDIST de la hoja de cálculo), o bien tomarla de un cuadro de distribución de t.

El valor correspondiente de una distribución de t indica el porcentaje de falsas sospechas.

Este concepto se describe en detalle con un ejemplo en *Analytical and Bioanalytical Chemistry*: DOI 10.1007/s00216-013-6922-1.

4.3.2.5. Extensión del ámbito de aplicación del método

4.3.2.5.1. Extensión del ámbito de aplicación a otras micotoxinas

Cuando se añaden nuevas micotoxinas en el ámbito de aplicación de un método de cribado existente se requiere una plena validación para demostrar la aptitud del método.

4.3.2.5.2. Extensión a otros productos

Si se sabe o se prevé que el método de cribado puede ser aplicable a otros productos, será preciso verificar la validez de esos otros productos. Si el nuevo producto pertenece a un grupo de productos (véase el cuadro A) para el que ya se ha realizado una validación inicial, bastará con una validación adicional limitada. Para ello, deberá analizarse un mínimo de 10 muestras homogéneas con control negativo y 10 muestras homogéneas con control positivo (en la CCS) en condiciones de precisión intermedia. Las muestras con control positivo deberán superar el valor de corte. En caso de que este criterio no se cumpla, se requerirá la plena validación.

4.3.2.6. Verificación de métodos ya validados mediante ensayos en colaboración

En los métodos de cribado ya validados mediante un ensayo de laboratorio en colaboración, deberá verificarse el funcionamiento del método. Para ello deberá analizarse un mínimo de 6 muestras con control negativo y 6 muestras con control positivo (en la CCS). Las muestras con control positivo deberán superar el valor de corte. Si no se cumple este requisito, el laboratorio deberá realizar un análisis de las causas subyacentes para determinar los motivos por los que no puede cumplir las especificaciones obtenidas en el ensayo en colaboración. Solo después de tomar medidas correctoras volverá a verificarse el funcionamiento del método en el laboratorio. Si su laboratorio no está capacitado para verificar los resultados del ensayo en colaboración, deberá establecer su propio valor de corte en una validación completa en un único laboratorio.

4.3.2.7. Verificación continua del método/Validación permanente del método

Tras la validación inicial, los datos de validación adicional se obtienen incluyendo al menos dos de las muestras con control positivo en cada lote de muestras controladas. Una muestra con control positivo es una muestra conocida (por ejemplo, utilizada en la validación inicial), y la otra es un producto diferente del mismo grupo de productos (en caso de que solo se analice un producto, se utilizará una muestra diferente de este producto). La inclusión de una muestra con control negativo es facultativa. Los resultados obtenidos de las dos muestras con control positivo se añaden al conjunto ya existente de validación.

Al menos una vez al año volverá a determinarse el valor de corte y a evaluarse la validez del método. La verificación continua del método responde a varios objetivos:

- control de calidad del lote de muestras controlado,
- obtención de información sobre la solidez del método en las condiciones del laboratorio que lo aplica,
- justificación de la aplicabilidad del método a distintos productos,
- posibilidad de ajustar los valores de corte en caso de deriva gradual a lo largo del tiempo.

4.3.2.8. Informe de validación

El informe de validación deberá incluir los siguientes datos:

- una declaración sobre la CCS,
- una declaración sobre el valor de corte obtenido,

Nota: El valor de corte deberá tener el mismo número de cifras significativas que la CCS. Los valores numéricos utilizados para calcular el valor de corte deberán tener al menos una cifra significativa más que la CCS.

- una declaración sobre el porcentaje estimado de falsas sospechas,
- una declaración sobre el modo en el que se ha generado el porcentaje de falsas sospechas.

Nota: La declaración sobre el porcentaje estimado de falsas sospechas indica si el método es adecuado para su objetivo, ya que indica el número de muestras en blanco (o con poca contaminación) que serán objeto de verificación.

Cuadro A

Grupos de productos para validar los métodos de cribado

Grupos de productos	Categorías de productos	Productos típicos representativos incluidos en la categoría
Alto contenido de agua	Zumos de fruta	Zumo de manzana, mosto
	Bebidas alcohólicas	Vino, cerveza, sidra
	Raíces, bulbos y tubérculos	Jengibre fresco
	Purés a base de cereales o frutos	Papillas para bebés y niños pequeños

Grupos de productos	Categorías de productos	Productos típicos representativos incluidos en la categoría
Alto contenido de aceite	Frutos con cáscara	Nueces, avellanas, castañas
	Semillas oleaginosas y sus productos	Semillas de colza, girasol, algodón o soja, cacahuetes, sésamo, etc.
	Frutos oleaginosos y sus productos	Aceites y pasta (como manteca de cacahuete o tahina)
Alto contenido de almidón o proteína y bajo contenido de agua y grasa	Semillas de cereales y sus productos	Grano de trigo, centeno, cebada, maíz, arroz, avena Pan integral, pan blanco, galletas, cereales para el desayuno, pasta
	Productos dietéticos	Polvos para preparar comida para bebés y niños pequeños
Alto contenido de ácido y de agua (*)	Cítricos	
Productos raros o únicos (**)		Granos de cacao y sus productos, copra y sus productos Café, té Especias, regaliz
Alto contenido de azúcar y bajo contenido de agua	Frutos secos	Higos secos, pasas, pasas de Corinto y sultaninas
Leche y productos lácteos	Leche	Leche de vaca, cabra y búfala
	Queso	Queso de vaca y de cabra
	Lácteos (como leche en polvo)	Yogur, nata

(*) Si se utiliza una disolución amortiguadora para estabilizar el pH en la fase de extracción, este grupo de productos puede fusionarse en un solo grupo de productos de "alto contenido de agua".

(**) Los productos raros o únicos solo deben ser totalmente validados si se analizan con frecuencia. Si solo se analizan de manera ocasional, la validación podrá reducirse a comprobar los niveles declarados utilizando matrices en blanco.

Cuadro B

Valor de t unicaudal para un porcentaje de falsos negativos del 5 %

Grados de libertad	Número de repeticiones	valor t (5 %)
10	11	1,812
11	12	1,796
12	13	1,782
13	14	1,771
14	15	1,761
15	16	1,753
16	17	1,746
17	18	1,74
18	19	1,734

Grados de libertad	Número de repeticiones	valor t (5 %)
19	20	1,729
20	21	1,725
21	22	1,721
22	23	1,717
23	24	1,714
24	25	1,711
25	26	1,708
26	27	1,706
27	28	1,703
28	29	1,701
29	30	1,699
30	31	1,697
40	41	1,684
60	61	1,671
120	121	1,658
∞	∞	1,645

4.3.3. Requisitos para métodos cualitativos de cribado (que no dan valores numéricos)

La elaboración de directrices para la validación de métodos de ensayo binarios depende actualmente de diversos organismos de normalización (como la AOAC o la ISO). Hace muy poco, la AOAC ha elaborado una directriz sobre la materia que puede considerarse como la más avanzada en su campo. Así pues, los métodos que ofrecen resultados binarios (como la inspección visual de análisis de nivel) deben validarse con arreglo a esta directriz:

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

4.4. Estimación de la incertidumbre de medición, cálculo de la recuperación y registro de los resultados ⁽¹⁾

4.4.1. Métodos de confirmación

El resultado analítico deberá expresarse como sigue:

- Corregido en función de la recuperación, indicando su nivel. Dicha corrección no será necesaria si el porcentaje de recuperación se sitúa entre el 90 % y el 110 %.
- Como " $x \pm U$ ", donde x es el resultado analítico y U la incertidumbre de medida expandida, utilizando un factor de cobertura de 2, que da un nivel de confianza aproximado del 95 %.

Para los productos alimenticios de origen animal también puede tenerse en cuenta la incertidumbre de medición estableciendo el límite de decisión (CCa) con arreglo a la Decisión 2002/657/CE de la Comisión ⁽²⁾ (punto 3.1.2.5 de su anexo I: caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido).

Sin embargo, si el resultado del análisis fuera notablemente inferior (> 50 %) al nivel máximo o muy superior a él (por ejemplo, quintuplicándolo), podría comunicarse sin corrección en función de la recuperación, y omitirse la tasa de recuperación y la incertidumbre de medición, siempre que se aplicaran los procedimientos de calidad apropiados y que el análisis sirviera exclusivamente para comprobar el cumplimiento de las disposiciones legales.

⁽¹⁾ El documento *Report on the relationship between analytical results, measurement uncertainty, recovery factors and the provisions of EU food and feed legislation* (Informe sobre la relación entre resultados analíticos, incertidumbre de medición, factores de recuperación y disposiciones de la UE sobre alimentos y piensos) se encuentra en la dirección siguiente: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf

⁽²⁾ Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 14 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (DO L 221 de 17.8.2002, p. 8).

Las presentes normas de interpretación del resultado del análisis en vista de la aceptación o el rechazo del lote son aplicables al resultado del análisis de la muestra destinada al control oficial. En caso de análisis con fines de defensa del comercio o de arbitraje, se aplicarán las normas nacionales.

4.4.2. *Métodos de cribado*

El resultado del cribado se expresará como “conforme” o como “sospechoso” de no conformidad.

“Sospechoso” significa que la muestra supera el valor de corte y puede contener micotoxinas a un nivel más elevado que en la CCS. Cualquier resultado sospechoso activa un análisis de confirmación para identificar y cuantificar de forma inequívoca las micotoxinas.

“Conforme” significa que el contenido de micotoxinas en la muestra es inferior a la CCS con una certeza del 95 % (es decir, hay un 5 % de probabilidades de que las muestras se califiquen incorrectamente como negativas). El resultado del análisis se comunicará como “< nivel de CCS” en el nivel de CCS especificado.»
