Laboratorio Nacional de Referencia para micotoxinas

GUÍA LNR: RE-EVALUACIÓN DE VALIDACIONES REALIZADAS SEGÚN Reglamento (CE) nº 401/2006 PARA SU ADAPTACIÓN AL Reglamento de Ejecución (UE) 2023/2782

Ed.01 (noviembre 2024)

Sobre la base de la mejor información científica disponible, el laboratorio de referencia de la Unión Europea en materia de micotoxinas y toxinas vegetales ha actualizado los criterios de funcionamiento analítico de las micotoxinas. Procedía, por tanto, modificar los criterios establecidos en el Reglamento (CE) nº 401/2006

Como consecuencia, se publicó el **Reglamento de Ejecución (UE) 2023/2782 de la Comisión, de 14 de diciembre de 2023, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control del contenido de micotoxinas en los alimentos,** que deroga **el Reglamento (CE) 401/2006,** lo que implica hacer una revisión de las validaciones completas y complementarias de los métodos de análisis de micotoxinas en alimentos**,** en lo que se refiere a los requisitos específicos para métodos de confirmación: criterios de funcionamiento.

Dicho reglamento es aplicable desde el 1 de abril de 2024.No obstante, hasta el 1 de enero de 2029, los requisitos específicos establecidos en el punto 4.3 del anexo II del Reglamento (CE) no 401/2006 seguirán aplicándose a los métodos que hubiesen sido validados antes de que se comenzase a aplicar el presente Reglamento.

1. OBJETO

El objetivo principal de este documento es establecer una base común que ayude en el proceso de reevaluación de validaciones realizadas según el Reglamento (CE) 401/2006 conforme a los requisitos del Reglamento (UE) 2023/2782.
En principio, el alcance de la validación se mantendrá igual (analitos, matrices, especies), siempre que se cumplan los criterios incluidos en este documento.

2. PASOS A SEGUIR

- Identificar la validación realizada según el Reglamento (CE) 401/2006 que va a ser adaptada al Reglamento (UE) 2023/2782 (PNT, alcance, código y fecha informe de validación, etc.).
- Revisar la validación para comprobar si se cumplen los nuevos requisitos.
- Cuando sea necesario, realizar los estudios experimentales necesarios para completar la adaptación al Reglamento (UE) 2023/2782.
- Elaborar un anexo al informe de validación con las comprobaciones realizadas, o bien con los nuevos datos de validación.

3. CRITERIOS Y CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO A EVALUAR

Recogidos en el Anexo II del Reglamento

CRITERIOS APLICABLES A LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

PRECAUCIONES (punto 1.1 anexo II)

Por lo general, dado que la distribución de las micotoxinas no es homogénea, las muestras se prepararán y, sobre todo, homogeneizarán, con sumo cuidado. Si el laboratorio realiza la homogeneización, se homogeneizará la muestra completa recibida. Para el análisis de las aflatoxinas conviene evitar en la medida de lo posible la luz del día durante la operación, puesto que las aflatoxinas se descomponen progresivamente bajo la influencia de la luz ultravioleta.

El criterio no ha cambiado. No es necesario comprobar

CÁLCULO DE LA PROPORCIÓN CÁSCARA/FRUTO EN LOS FRUTOS DE CÁSCARA ENTEROS Y LAS SEMILLAS OLEAGINOSAS ENTERAS (CACAHUETES Y OTROS) (punto 1.2. anexo II)

Los límites máximos fijados en el Reglamento (UE) 2023/915 se aplican a la parte comestible. El contenido de micotoxinas en la parte comestible puede determinarse de la forma siguiente: — Las muestras de frutos de cáscara y semillas oleaginosas con cáscara pueden pelarse y se analiza el contenido de micotoxinas en la parte comestible. — Los frutos de cáscara y semillas oleaginosas con cáscara pueden someterse al proceso de preparación de la muestra. Con el método de muestreo y análisis se estimará el peso del fruto en la muestra global. El peso del fruto en la muestra global se estimará tras establecer un factor adecuado para la proporción entre la cáscara/fruto en los frutos de cáscara enteros y las semillas oleaginosas enteras. Esta proporción sirve para determinar la cantidad de fruto en la muestra global utilizada para la preparación de la muestra y el método de análisis. Se tomarán aleatoriamente del lote unos cien frutos de cáscara enteros o semillas oleaginosas enteras, o se apartarán de cada muestra global. Para cada muestra de laboratorio, la proporción puede obtenerse pesando enteros los frutos y las semillas oleaginosas, retirando la cáscara y pesando de nuevo las porciones de cáscara y de fruto. La proporción cáscara/fruto, una vez determinada por el laboratorio a partir de varias muestras, podrá tenerse en cuenta en análisis posteriores. Sin embargo, si se comprueba que una muestra de laboratorio determinada sobrepasa cualquier contenido máximo, se determinará la proporción para esa muestra empleando los aproximadamente cien frutos de cáscara enteros o semillas oleaginosas enteras que se habían apartado de la muestra global.

El criterio no ha cambiado. No es necesario comprobar.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO (punto 2 anexo II)

Cada muestra de laboratorio se mezclará adecuadamente mediante un proceso, que podrá ser la molienda fina en caso necesario, con el que esté demostrado que se logra una homogeneización total, a excepción de las muestras para controlar la presencia de esclerocios de cornezuelo. Si la muestra de laboratorio debe analizarse para controlar la presencia de esclerocios de cornezuelo y micotoxinas, la parte de la muestra utilizada para determinar los esclerocios de cornezuelo se tomará de la muestra de laboratorio antes de proceder a la molienda de esta última.

Se hace una puntualización en el caso de la determinación de esclerocios del cornezuelo. Tomar la muestra de laboratorio ANTES de proceder a la molienda de ésta. Esto aplica a las muestras de control oficial, pero no a las validaciones del método.

MUESTRAS IDÉNTICAS (punto 3 anexo II)

Las muestras idénticas para garantizar el cumplimiento de la normativa o con fines de defensa o de arbitraje se tomarán de la muestra global homogeneizada, a menos que este procedimiento contravenga la normativa de los Estados miembros relativa a los derechos del operador de la empresa alimentaria.

El criterio no ha cambiado. No es necesario comprobar.

MÉTODO DE ANÁLISIS QUE UTILIZARÁ EL LABORATORIO Y REQUISITOS DE CONTROL DEL LABORATORIO

REQUISITOS GENERALES (punto 4.1. anexo II)

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 (UE) 2017/625. Siempre que sea posible, deberá comprobarse la veracidad del método analizando un material de referencia certificado o participando satisfactoriamente en ensayos de aptitud de forma periódica.

1.- Se actualiza la referencia del Reglamento de Controles Oficiales

2.- Se incluye el criterio de participación en ensayos de aptitud/ análisis de materiales de referencia certificados. En el reglamento 401/2006 se incluía solamente en el caso de la validación del método.

Puesto que el criterio PARTICIPACIÓN EN ENSAYOS DE APTITUD /ANÁLISIS DE MATERIALES DE REFERENCIA CERTIFICADOS es un requisito para la acreditación según la 17025, todos los laboratorios acreditados ya están cumpliendo dicho requisito.

REQUISITOS ESPECÍFICOS PARA MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN (punto 4.2.1. anexo II)

En lo que respecta a los métodos de confirmación, se aplicarán los siguientes criterios de funcionamiento:

Recuperación: la recuperación media debe situarse entre el 70 y el 120 %. La recuperación media es el valor medio de las muestras idénticas obtenido durante la validación al determinar los parámetros de precisión para la RSDr y la RSDwR. El criterio se aplica a todas las concentraciones y toxinas individuales, excepto a los alcaloides de cornezuelo. Para los alcaloides de cornezuelo, el criterio se aplica a la suma de cada par de epímeros. En casos excepcionales, podrán ser aceptables recuperaciones medias que se sitúen fuera del intervalo anterior, pero deberán estar entre un 50 y un 130 % y cumplir los criterios de precisión de la RSDr y la RSDwR.

1.- En el Reglamento 401/2006, se establecían valores de % de recuperación para cada grupo de micotoxinas, y en función de la concentración de micotoxina en la muestra.
En el Reglamento 2023/2782, se establece el mismo valor de % de recuperación para todas las micotoxinas y para todas las concentraciones.

2.- En el Reglamento 2023/2782 se especifica que el criterio se establece para el valor medio de las recuperaciones, cosa que no se especificaba en el 401/2006.

3.- En el Reglamento 2023/2782 se indica que, en casos excepcionales, podrán ser aceptables recuperaciones medias que se sitúen fuera del intervalo anterior, pero deberán estar entre un 50 y un 130 % y cumplir los criterios de precisión de la RSDr y la RSDwR

En algunos casos, el criterio de % de recuperación de 70-120% es más restrictivo que el anterior establecido, por lo que habrá que comprobar en todas las validaciones que se cumple el nuevo criterio. En los casos en que no se cumpla el criterio, y que no se trate de un caso excepcional (como se menciona en el Reglamento), se deberá repetir la validación al nivel de concentración de que se trate.

Precisión: La RSDr será inferior o igual al 20 %. La RSDwR será inferior o igual al 20 %. La RSDR será inferior o igual al 25 %. Estos criterios se aplican a todas las concentraciones. Si el laboratorio presenta pruebas de que se cumple el criterio de la RSDwR, no será necesario presentarlas también para el criterio de la RSDr, pues el hecho de que se cumpla el primer criterio garantiza que se cumple también el segundo. En caso de que el límite máximo se aplique a una suma de toxinas, los criterios de precisión se aplicarán tanto a la suma como a las toxinas individuales. En el caso de los alcaloides de cornezuelo, los criterios para las toxinas individuales se aplican a la suma de cada par de epímeros

1.- En el Reglamento 401/2006, el criterio de precisión se establecida mediante la ecuación de Horwitz modificada por Thompson.

2.- En el Reglamento 401/2006 no se hacía distinción entre la reproducibilidad inter e intra-laboratorio, y el criterio de precisión era el mismo en ambos casos. En el Reglamento 2023/2782 se introduce el concepto de DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA DE LA REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO (RSD_{WR}), y se establecen criterios distintos para estos dos conceptos:

$RSD_{WR} \leq 20\%$
$RSD \leq 25\%$

3.-En el Reglamento 401/2006, se establecían distintos criterios dependiendo del analito y de la concentración en la muestra. En el Reglamento 2023/2782, se establece el mismo criterio para todas las micotoxinas y para todas las concentraciones.

Comprobar que se cumplen los nuevos criterios en aquellos casos en los que sea más restrictivo. En los casos en que no se cumpla el criterio, se deberá repetir la validación al nivel de concentración de que se trate.

Límite de cuantificación: Si en el cuadro 1 siguiente figura un requisito específico para el LOQ de una micotoxina, el método deberá tener un LOQ igual o inferior a ese valor.

Requisitos relativos al LOQ para determinadas micotoxinas

Micotoxina	Alimentos	Requisito para el LOQ (µg/kg)
Aflatoxinas		
Aflatoxina B1	Alimentos infantiles y alimentos transformados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, alimentos para usos médicos especiales destinados a lactantes y niños de corta edad	≤ 0,1
Aflatoxina B1, B2, G1, G2, cada una de las aflatoxinas	Todos los demás alimentos	≤ 1
Ocratoxina A	Productos de confitería a base de regaliz que contengan < 97 % Extracto de regaliz en base seca	≤ 10,0
	Cacao en polvo	≤ 3,0
Alcaloides de cornezuelo (cada uno de los doce epímeros incluidos en la definición de la suma de límites máximos)	Cereales y alimentos a base de cereales	≤ 4
	Alimentos transformados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad	≤ 2

En todos los demás casos, se aplicará lo siguiente: El LOQ será ≤ 0,5 * límite máximo, y sería preferible que fuese inferior (≤ 0,2 * límite máximo). En caso de que el límite máximo se aplique a una suma de toxinas, el LOQ de cada una de las toxinas será ≤ 0,5 * límite máximo/n, siendo «n» el número de toxinas incluido en la definición del límite máximo.

1.- En el Reglamento 401/2006 no había un criterio para el valor del límite de cuantificación, y en algunos casos los valores indicados por los laboratorios son valores teóricos derivados de cálculos señal/ruido. En el Reglamento 2023/2782 se indica que será el nivel más bajo de concentración validado y además se dan unos valores máximos para los límites de cuantificación.

Comprobar en todas las validaciones que el límite de cuantificación cumple los criterios establecidos en el nuevo Reglamento:

- Que la concentración validada como límite de cuantificación cumple el criterio
- Y en aquellos casos en que no sea así, validar un nuevo límite de cuantificación

IDENTIFICACIÓN

Para la identificación, se aplicarán los criterios establecidos en el documento de orientación sobre la identificación de micotoxinas y toxinas vegetales en alimentos y piensos (1).

EXTENSIÓN DEL ÁMBITO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO (punto 4.2.1.2. anexo II)

Extensión del ámbito de aplicación a otras micotoxinas:

Cuando se añaden analitos adicionales en el ámbito de aplicación de un método de confirmación existente, es necesaria una validación completa para demostrar la idoneidad del método.

1.-En el Reglamento 401/2006 este criterio aplicaba solamente a métodos semicuantitativos de cribado.

Extensión a otros productos:

Si se sabe o se prevé que el método de confirmación puede ser aplicable a otros productos, será preciso verificar su validez para esos otros productos. Si el nuevo producto pertenece a un grupo de productos (véase el cuadro 2) para el que ya se ha realizado una validación inicial, bastará con una validación adicional limitada.

1.-En el Reglamento 401/2006 este criterio aplicaba solamente a métodos semicuantitativos de cribado.

Comprobar que, en todas las validaciones complementarias realizadas en el marco de un método con alcance flexible, la matriz en cuestión está contemplada en el grupo de productos con respecto a la validación completa. Si no es así, habrá que llevar a cabo una validación completa para esa matriz.

Cuadro 2

Grupos de productos para validar los métodos de confirmación y de cribado

Grupos de productos	Categorías de productos	Productos típicos representativos incluidos en la categoría
Alto contenido de agua	Zumos de frutas Bebidas alcohólicas Raíces y tubérculos Purés a base de cereales o frutas	Zumo de manzana, zumo de uva Vino, cerveza, sidra Jengibre fresco, infusiones (líquidas) Purés para lactantes y niños de corta edad
Alto contenido de aceite	Frutos de cáscara arbóreos Semillas oleaginosas y productos a base de semillas oleaginosas Frutos oleaginosos y productos a base de frutos oleaginosos	Nueces, avellanas, castañas colza, girasol, semillas de algodón, soja, cacahuetes, sésamo, etc. Aceites y pastas (como la manteca de cacahuete o la pasta de sésamo)
Alto contenido de almidón o proteína y bajo contenido de agua y grasa	Semillas de cereales y productos a base de semillas de cereales Productos dietéticos	Trigo, centeno, cebada, maíz, arroz, avena Pan integral, pan blanco, galletas saladas, cereales de desayuno, pastas alimenticias Polvos secos para preparar alimentos para lactantes y niños de corta edad
Alto contenido de ácido y de agua (*)	Productos cítricos	
Productos raros o únicos (**)		Cacao en grano y productos a base de cacao en grano, copra y productos a base de copra, café, té (producto desecado) Especias, raíz de regaliz, infusiones (producto desecado), complementos alimenticios, polen y productos a base de polen
Alto contenido de azúcar y bajo contenido de agua	Frutas desecadas	Higos secos, pasas, pasas de Corinto y sultaninas
Leche y productos lácteos	Leche Queso Productos lácteos (como leche en polvo)	Leche de vaca, cabra y búfala Queso de vaca y de cabra Yogur, nata
Carne (tejido)	Despojos comestibles Músculo, productos cárnicos transformados	Riñón, hígado jamón

(*) 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 validarse completamente si se analizan con frecuencia. Si solo se analizan de manera ocasional, la validación podrá limitarse a un mero control de los niveles declarados utilizando extractos en blanco enriquecidos.

ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA, CÁLCULO DE LA RECUPERACIÓN Y REGISTRO DE LOS RESULTADOS

El resultado analítico se notificará como sigue:

- Corregido en función de la recuperación, cuando proceda y sea pertinente; en caso de que esté corregido, deberá indicarse. Ha de mencionarse el porcentaje de recuperación, salvo que la corrección intrínseca del sesgo forme parte del procedimiento. Dicha corrección no será necesaria si el porcentaje de recuperación se sitúa entre el 90 y el 110 %.

1.-En el Reglamento 401/2006 se daba la opción de corregir o no por el porcentaje de recuperación, siempre y cuando se indicase.

Corregir los resultados por el porcentaje de recuperación, salvo cuando se sitúe entre el 90 y el 110% e indicar el valor de este porcentaje, salvo cuando la corrección forme parte intrínseca del procedimiento.

- Con la forma «x ± U», donde x es el resultado analítico y U la incertidumbre de medida analítica expandida, utilizando un factor de cobertura de 2 que permite obtener un nivel de confianza del 95 % aproximadamente.

Existe la posibilidad de notificar una incertidumbre de medida expandida por defecto del 50 %, siempre y cuando el laboratorio cumpla todos los requisitos de precisión que se indican en el punto 4.2. Un laboratorio individual puede demostrar esto cumpliendo los criterios de repetibilidad (RSDr) y de reproducibilidad intralaboratorio (RSDwR), y complementándolo con una participación satisfactoria en programas de ensayos de aptitud (a menos que no se disponga de un programa adecuado de ensayos de aptitud); se considerará que la participación ha sido satisfactoria cuando la puntuación z media sea de $|z| \leq 2$, lo que demuestra que se cumple la reproducibilidad (RSDR) requerida (sobre la base de una desviación estándar objetivo del 25 %).

El criterio no ha cambiado, salvo que se incluye como novedad la posibilidad de notificar una incertidumbre de medida expandida por defecto del 50%, siempre y cuando cumpla los requisitos de precisión anteriormente mencionados.

Se hacen una serie de aclaraciones que no aparecían en el Reglamento 4012006:

- En caso de que se haya fijado el límite máximo para la suma de toxinas (por ejemplo, aflatoxinas, toxina T-2 o HT-2, fumonisinas, alcaloides de cornezuelo), se indicarán los resultados analíticos para cada una de las toxinas.

En el caso de los alcaloides de cornezuelo, también se permite indicar la suma de cada uno de los seis pares de epímeros en lugar de los doce epímeros individualmente. Se efectuará una corrección de la recuperación, si procede, para cada una de las toxinas individuales antes de sumar las concentraciones. En el caso de los alcaloides de cornezuelo, la corrección también puede hacerse sobre la base de la recuperación obtenida para cada uno de los pares de epímeros.

- Para verificar la conformidad con la suma de límites máximos, se aplicará un enfoque del límite inferior, lo que significa que los resultados para las toxinas individuales que sean inferiores al LOQ se sustituirán por un cero para calcular la suma.

4. INFORME DE VALIDACIÓN

Finalmente, se elaborará un anexo al informe de validación con las comprobaciones y modificaciones o ensayos realizados.

5. REFERENCIAS

1.- Guidance document on identification of mycotoxins and plant toxins in food and feed.

2.- REGLAMENTO (CE) No 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.

3.- REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2023/2782 DE LA COMISIÓN de 14 de diciembre de 2023 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control del contenido de micotoxinas en los alimentos y se deroga el Reglamento (CE) no 401/2006.