

"PRILOG I.

METODE UZORKOVANJA

1. SVRHA I PODRUČJE PRIMJENE

Uzorci za službenu kontrolu hrane za životinje uzimaju se u skladu s metodama opisanim u nastavku. Tako dobijeni uzorci smatraju se reprezentativnim za uzorkovane dijelove.

Svrha reprezentativnog uzorkovanja dobijanje je manje količine iz serije na način da određivanje bilo koje posebne osobine te količine predstavlja srednju vrijednost osobine serije. Serija se uzorkuje ponovljenim uzimanjem pojedinačnih uzoraka pri različitim jedinstvenim položajima u seriji. Ti pojedinačni uzorci kombiniraju se miješanjem kako bi se stvorio grupni uzorak iz kojeg se reprezentativnim dijeljenjem pripremaju reprezentativni konačni uzorci.

Ako se vizuelnom inspekcijom utvrdi razlika u kvalitetu dijelova hrane za životinje namijenjene uzorkovanju u odnosu na preostali dio iste serije, takvi dijelovi razdvajaju se od ostatka hrane za životinje te se s njima postupa kao s odvojenom podserijom. Ako nije moguće razdijeliti hranu za životinje u odvojene podserije, hrana za životinje uzorkuje se kao jedna serija. Tada se to navodi u izvještaju o uzorkovanju.

Ako se utvrdi da hrana za životinje, uzorkovana u skladu s odredbama ovog Pravilnika ne ispunjava propisane uslove i dio je jedne serije istovrsnog razreda ili opisa, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava propisane zahtjeve sigurnosti.

2. DEFINICIJE POJMOVA

- Serija: identificirana količina hrane za životinje za koju je utvrđeno da posjeduje zajedničke osobine kao što je porijeklo, sorta, način pakiranja, preduzeće koje pakira proizvode, pošiljatelj ili označavanje, a u slučaju

proizvodnog postupka, proizvodna jedinica iz jedinstvenog postrojenja koja se koristi jedinstvenim proizvodnim parametrima ili nekoliko takvih jedinica pri neprekinutoj proizvodnji i grupnom skladištenju.

- Uzorkovani dio: serija ili identificirani dio serije ili podserije.
- Zapečaćeni uzorak: uzorak zapečaćen na način da uzorku nije moguće pristupiti bez lomljenja ili uklanjanja pečata.
- Pojedinačni uzorak: količina koja se uzima iz jedne tačke uzorka.
- Grupni uzorak: skup pojedinačnih uzoraka uzetih iz istog uzorkovanog dijela.
- Reducirani uzorak: dio grupnog uzorka dobijen postupkom reprezentativnog smanjivanja grupnog uzorka.
- Konačni uzorak: dio reduciranog uzorka ili homogeniziranog grupnog uzorka.
- Laboratorijski uzorak: uzorak namijenjen za laboratoriju (zaprmljen u laboratoriji) koji može biti konačan, smanjeni ili grupni uzorak.
- Nadležni organi - definirani u Pravilniku o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja u skladu s odredbama propisa o hrani i hrani za životinje te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja ("Službeni glasnik BiH", broj 5/13).

3. OPĆE ODREDBE

- Osoblje koje uzima uzorke: uzorke uzimaju veterinarski inspektori, odnosno druga lica ovlaštena u skladu s posebnim propisima.
- Uzorak mora biti zapečaćen na način da uzorku nije moguće pristupiti bez lomljenja ili uklanjanja pečata. Oznaka pečata treba biti jasno prepoznatljiva i vidljiva. Uzorak se može pohraniti u posudu koja se zatvara na način da se ne može otvoriti bez nepovratnog oštećivanja prijemnog spremnika ili posude čime se izbjegava ponovno korištenje prijemnog spremnika ili posude.
- Identifikacija uzorka: uzorak mora biti neizbrisivo označen i mora se identificirati na način da postoji nesumnjiva veza s izvještajem o uzorku.
- Iz svakog grupnog uzorka uzimaju se najmanje dva konačna uzorka: najmanje jedan za kontrolu (za potrebe provedbe) i jedan za nositelja djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje (za potrebe prizivnog postupka). Naposljetku, za referencu se može uzeti jedan konačan uzorak. Ako je cjelokupan grupni uzorak homogeniziran, konačni uzorci uzimaju se iz homogeniziranog grupnog uzorka, osim ako je takav postupak u suprotnosti s važećim pravilima o pravima nositelja djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje.

4. OPREMA

4.1 Oprema za uzorkovanje mora biti izrađena od materijala koji ne mogu kontaminirati proizvode namijenjene uzorkovanju. Oprema namijenjena višestrukoj upotrebi mora biti jednostavna za čišćenje kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija.

4.2 Preporučena oprema za uzorkovanje čvrste hrane za životinje

4.2.1 *Ručno uzorkovanje*

4.2.1.1 Lopatica s ravnim dnom i okomitim stranicama.

4.2.1.2 Sonda za uzorkovanje s dugim procjepom ili pregradama. Dimenzije sonde za uzorkovanje moraju odgovarati osobinama uzorka (dubina posude, veličina vreće itd.) i veličini čestica hrane za životinje.

Ako sonda za uzorkovanje ima nekoliko otvora, oni se odvajaju pregradama ili raspoređenim otvorima kako bi se osiguralo da se uzorak uzima na različitim mjestima uzduž sonde.

4.2.2 *Mehaničko uzorkovanje*

Za uzorkovanje hrane za životinje koja se kreće može se koristiti odgovarajuća mehanička oprema. Odgovarajuća mehanička oprema znači da se uzorkuje najmanje čitav dio protoka.

Uzorkovanje hrane za životinje u pokretu (pri velikim brzinama protoka) može se provesti automatskim uzorkivačima.

4.2.3 Razdjelnik

Ako je moguće i prikladno, oprema namijenjena za razdvajanje uzorka na približno jednake dijelove treba se koristiti za pripremu reduciranih uzoraka na reprezentativan način.

5. KOLIČINSKI ZAHTEJEVI VEZANI ZA BROJ POJEDINAČNIH UZORAKA

- Količinski zahtjevi iz tačaka 5.1. i 5.2. vezani za broj pojedinačnih uzoraka primjenjuju se za uzorkovane dijelove u veličinama do najviše 500 tona koji se mogu uzorkovati na reprezentativan način. Opisani postupak uzorkovanja važeći je i za količine veće od propisane maksimalne veličine uzorkovanog dijela pod uslovom da se najveći broj pojedinačnih uzoraka iz tablice koja slijedi zanemari, pri čemu se broj pojedinačnih uzoraka određuje formulom kvadratnog korijena navedenog u odgovarajućem dijelu postupka (više o tome u tački 5.3.), a najmanja grupna veličina uzorka proporcionalno se uvećala. Ovime se ne sprječava razdvajanje velike serije u nekoliko manjih podserija te uzorkovanje svake podserije u skladu s postupkom opisanom u tačkama 5.1. i 5.2.
- Veličina uzorkovanog dijela mora biti takva da svaki od njegovih sastavnih dijelova može biti uzorkovan.
- Za jako velike serije ili podserije (> 500 tona) i za serije koje se prevoze ili skladište na takav način da je uzorkovanje nemoguće u skladu s postupkom uzorkovanja predviđenim tačkama 5.1. i 5.2. ovog Poglavlja, primjenjuje se postupak uzorkovanja predviđen tačkom 5.3.
- U slučaju da je nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje prema propisima obavezan udovoljiti ovom Pravilniku i u okviru obaveznog sistema nadzora, nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje može odstupati od količinskih zahtjeva predviđenih ovim Poglavljem kako bi se u obzir uzele operativne karakteristike pod uslovom da je nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje dokazao nadležnim organima istovjetnost postupka uzorkovanja u pogledu reprezentativnosti i nakon dobijenog odobrenja od nadležnog organa.
- Izuzetno, ako nije moguće provesti navedenu metodu uzorkovanja vezano za količinske zahtjeve zbog neprihvatljive komercijalne štete na seriji (zbog oblika pakiranja, prijevoznih sredstava, načina skladištenja itd.), može se primijeniti alternativni način uzorkovanja pod uslovom da je što reprezentativniji te u potpunosti opisan i dokumentiran.

5.1 Količinski zahtjevi vezani za pojedinačne uzorke pri kontroli supstanci ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje

5.1.1 Čvrsta hrana za životinje u rasutom stanju

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
<2,5 tona	7
> 2,5 tona	Kvadratni korijen iz dvadeset puta broja tona u uzorkovanom dijelu (*), do 40 pojedinačnih uzoraka
(*) Kada dobijeni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj	

5.1.2 Tekuća hrana za životinje u rasutom stanju

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
<2,5 tona ili <2 500 litara	4 (*)
> 2,5 tona ili > 2 500 litara	7 (*)
(*) Ako nije moguće dobiti homogenu tekućinu, potrebno je uvećati broj pojedinačnih uzoraka	

5.1.3 Pakirana hrana za životinje

Hrana za životinje (u čvrstom ili tekućem stanju) može se pakirati u vreće, limenke, bačve itd. koje su u tablici označene kao jedinice. Velike jedinice (≥ 500 kg ili litara) moraju se uzorkovati u skladu s odredbama predviđenima za hranu za životinje u rasutom stanju (više o tome u tačkama 5.1.1. i 5.1.2.).

Veličina uzorkovanog dijela	Minimalan broj jedinica (najmanje jedna) namijenjenih uzimanju pojedinačnog uzorka (*)
1 do 20 jedinica	1 jedinica (**)
21 do 150 jedinica	3 jedinice (**)
151 do 400 jedinica	5 jedinica (**)
> 400 jedinica	Jedna četvrtina kvadratnog korijena iz broja jedinica u uzorkovanom dijelu (***), do 40 jedinica
(*) U slučaju kada otvaranje jedinice može uticati na analizu (npr. kvarljiva vlažna hrana za životinje), neotvorena jedinica služi kao pojedinačni uzorak.	
(**) Za jedinice čiji sadržaj ne prelazi 1 kilogram ili jednu litru, pojedinačni uzorak je sadržaj jedne izvorne jedinice.	
(***) Kada dobijeni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj	

5.1.4 Krmni blokovi ili kameni za lizanje

Najmanje 1 blok ili kamen za lizanje za uzorkovanje po uzorkovanom dijelu od 25 jedinica, do najviše 4 bloka ili kamena za lizanje.

Za četiri bloka ili kamena za lizanje kojima pojedinačna težina nije veća od 1 kg, pojedinačni uzorak sadržaj je jednog bloka ili jednog kamena za lizanje.

5.1.5 Vlaknasta krma/krmivo

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka (*)
<5 tona	5
> 5 tona	Kvadratni korijen iz pet puta broja tona u uzorkovanom dijelu (**), do 40 pojedinačnih uzoraka
(*) Uzima se u obzir da u određenim situacijama (npr. kod silaža) nije moguće uzeti potrebne pojedinačne uzorke bez uzrokovanja neprihvatljive štete na seriji. U tim situacijama može se primijeniti druga važeća metoda uzorkovanja koja mora biti usklađena s međunarodno priznatim smjernicama za uzorkovanje takvih serija.	
(**) Kada dobijeni broj nije cijeli broj, zaokružuje se na sljedeći cijeli broj.	

5.2 Količinski zahtjevi vezani za pojedinačne uzorke pri kontroli supstanci ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje

Ti količinski zahtjevi u pogledu pojedinačnih uzoraka koriste se u sljedećim situacijama:

- kontrola aflatoksina, raženih gljivica, ostalih mikotoksina i štetnih botaničkih nečistoća u hrani za životinje;
- kontrola unakrsne kontaminacije sastojkom, uključujući i genetski modificiranim materijalom, ili supstance za koju se očekuje neujednačena distribucija u hrani za životinje.
- Ako kontrolni organ osnovano sumnja u postojanje takve neujednačene distribucije i u slučaju unakrsne kontaminacije sastojkom ili supstanci u krmnoj smjesi, primjenjuju se količinski zahtjevi navedeni u tablici u nastavku.

Veličina uzorkovanog dijela	Najmanji broj pojedinačnih uzoraka
< 80 tona	Vidjeti količinske zahtjeve u tački 5.1. Broj pojedinačnih zahtjeva koji se moraju uzeti množi se sa 2,5.
≥ 80 tona	100

5.3 Količinski zahtjevi vezani za pojedinačne uzorke kod vrlo velikih serija

U slučaju velikih uzorkovanih dijelova (uzorkovani dijelovi > 500 tona), broj pojedinačnih uzoraka namijenjenih uzorkovanju = 40 pojedinačnih uzoraka + kvadratni korijen iz količine tona pri kontroli supstanci ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u cijelom uzorku ili 100 pojedinačnih uzoraka + kvadratni korijen iz količine tona pri kontroli sastojaka ili supstanci vjerovatno neravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje.

6. KOLIČINSKI ZAHTJEVI VEZANI ZA GRUPNI UZORAK

Zahtjeva se samo jedan grupni uzorak na uzorkovani dio		
	Vrsta hrane za životinje	Najmanja veličina grupnog uzorka (*) (**) (***)
6.1.	Hrana za životinje u rasutom stanju	4 kg
6.2.	Pakirana hrana za životinje:	4 kg(****)
6.3.	Tekuća ili polutekuća hrana za životinje	4 litara
6.4.	Krmni blokovi ili kameni za lizanje:	
6.4.1.	Pojedinačne mase veće od 1 kg	4 kg
6.4.2.	Pojedinačne mase ne veće od 1 kg	masa četiri izvorna bloka ili kamena za lizanje
6.5.	Vlaknasta krma/krmivo	4 kg (****)
(*) Ako se uzorkuje hrana za životinje visoke vrijednosti, može se uzeti manja količina grupnog uzorka pod uslovom da se to opiše i navede u izvještaju o uzorkovanju. (**) U skladu s posebnim propisima o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje obzirom na prisutnost genetski modificiranog materijala za koji je postupak odobravanja u toku ili je odobrenje isteklo, grupni uzorak za kontrolu prisutnosti genetski modificiranog materijala mora sadržavati najmanje 35 000 sjemenki/zma. Prema tome, veličina grupnog uzorka za kukuruz mora biti najmanje 10,5 kg, a za soju 7 kg. Za ostalo sjemenje kao što je ječam, proso, zob, riža, raž, pšenica i sjeme repe, grupna veličina uzorka od 4 kg odgovara količini od 35 000 sjemenki. (***) U slučaju pakirane hrane za životinje, možda neće biti moguće postići veličinu od 4 kg za grupni uzorak, ovisno od veličine pojedinačnih jedinica. (****) U slučaju vlaknaste krme ili krmiva niske specifične težine (npr. sijeno, slama), grupni uzorak treba imati najmanje 1 kg.		

7. KOLIČINSKI ZAHTJEVI VEZANI ZA KONAČNE UZORKE

Konačni uzorci
Potrebna je analiza najmanje jednog konačnog uzorka.
Količina konačnog uzorka za analizu ne smije biti manja od:

Švrsta hrana za životinje	500 g (*) (**) (***)
tekuća ili polutekuća hrana za životinje	500 ml (*)
(*) U skladu s posebnim propisima o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje obzirom na prisutnost genetski modificiranog materijala za koji je postupak odobravanja u toku ili je odobrenje isteklo, konačni uzorak za kontrolu prisutnosti genetski modificiranog materijala mora sadržavati najmanje 10 000 sjemenki/zma. Prema tome, za kukuruz veličina konačnog uzorka mora biti najmanje 3 000 g, a za soju 2 000 g. Za ostalo sjemenje kao što je ječam, proso, zob, riža, raž, pšenica i sjeme repe, grupna veličina uzorka od 500 g odgovara više od 10 000 sjemenki. (**) Ako je grupni uzorak znatno manji od 4 kg ili litara (vidjeti u bilješkama tačku 6), može se uzeti i manja količina konačnog uzorka pod uslovom da se to opiše i navede u izvještaju o uzorkovanju. (***) Pri uzorkovanju mahunarki, zrna žitarica i orašastog voća za određivanje ostataka pesticida, najmanja veličina konačnog uzorka iznosi 1 kg u skladu s odredbama Pravilnika o metodama uzorkovanja za provođenje službene kontrole ostataka pesticida u i na proizvodima biljnog i životinjskog porijekla ("Službeni glasnik BiH", broj 78/12).	

8. METODE UZORKOVANJA ZA VRLO VELIKE SERIJE ILI SERIJE KOJE SE SKLADIŠTE ILI PREVOZE NA NAČIN DA UZORKOVANJE U ČITAVOJ SERIJI NIJE MOGUĆE

8.1 Opća načela
Ako način prijevoza ili skladištenja serije onemogućava uzimanje pojedinačnih uzoraka u čitavoj seriji, uzorkovanje takvih serija treba se provoditi kada je serija u protoku.
Kod velikih skladišta namijenjenih skladištenju hrane za životinje, nositelji djelatnosti treba podsticati da ugrade opremu u skladištu koja omogućava (automatsko) uzorkovanje u čitavoj skladištenoj seriji.
Kod primjene postupaka uzorkovanja predviđenih u tački 8. ovog Priloga, nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje ili njihov predstavnik obavještava se o postupku uzorkovanja. Ako nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za

životinje ili njegov predstavnik dovede u pitanje taj postupak uzorkovanja, nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje ili njegov predstavnik omogućava nadležnom organu uzorkovanje u čitavoj seriji na vlastiti trošak.

8.2 Velike serije koje se prevoze brodom
8.2.1 Dinamičko uzorkovanje velikih serija koje se prevoze brodom

Uzorkovanje velikih serija u brodovima provodi se po mogućnosti dok je proizvod u protoku (dinamičko uzorkovanje).
Uzorkovanje se vrši po brodskom skladištu (subjekt koji se može fizički odvojiti). Međutim, brodska skladišta djelimično se prazne jedno za drugim tako da početno fizičko odvajanje više ne postoji nakon prijenosa u skladišnim objektima. Uzorkovanje se stoga može provesti u funkciji početnog fizičkog razdvajanja ili u funkciji razdvajanja nakon prijenosa u skladišne objekte.

Istovar broda može trajati nekoliko dana. Obično se uzorkovanje mora provesti u redovnim intervalima tokom trajanja istovara. Međutim, nije uvijek moguće ili prikladno da službeni inspektor bude prisutan na uzorkovanju tokom čitavog trajanja istovara. Stoga je dopušteno provesti uzorkovanje za dio (uzorkovani dio) čitave serije. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimanjem u obzir uzorkovanog dijela.

Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara propisanim zahtjevima, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava propisane zahtjeve.

Prisutnost inspektora potrebna je čak i kada je službeni uzorak uzet automatski. Međutim, ako se automatsko uzorkovanje provodi s unaprijed zadatim parametrima koji se ne mogu mijenjati tokom uzorkovanja, a pojedinačni uzorci se skupljaju u zapečaćeni prijemni spremnik čime se sprječava svaka moguća prijevара, tada je prisutnost inspektora potrebna samo na početku uzorkovanja, pri svakoj promjeni prijemnog spremnika za uzorak i na kraju uzorkovanja.

8.2.2 Statičko uzorkovanje serija koje se prevoze brodom
Ako se uzorkovanje provodi statičkim uzorkovanjem, primjenjuje se istovjetni postupak koji je predviđen za skladišne objekte (silose) kojima se pristupa s gornje strane (vidjeti tačku 8.4.1.).

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu (odozgo) serije/brodskog skladišta. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se vodeći računa o veličini uzorkovanog dijela. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne ispunjava propisane zahtjeve, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava propisane zahtjeve.

8.3 Uzorkovanje velikih serija koje se skladište u skladištima

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu serije. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se uzimajući u obzir veličinu uzorkovanog dijela. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara propisanim zahtjevima, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava propisane zahtjeve.

8.4 Uzorkovanje skladišnih objekata (silosa)
8.4.1 Uzorkovanje silosa kojima se (jednostavno) pristupa odozgo

Uzorkovanje se mora provesti na pristupačnom dijelu serije. Broj pojedinačnih uzoraka određuje se vodeći računa o veličini uzorkovanog dijela. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara

propisanim zahtjevima, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava propisane zahtjeve.

8.4.2 *Uzorkovanje silosa kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silosi)*

8.4.2.1 Silosi kojima se ne pristupa odozgo (zatvoreni silos) veličine > 100 tona

Hrana za životinje u tim silosima ne može se uzorkovati na statički način. Prema tome, ako se hrana za životinje u silosu mora uzorkovati i ne postoji mogućnost premještanja pošiljke, potrebno je s nositeljem djelatnosti sklopiti dogovor prema kojem je on ili ona dužan obavijestiti inspektora o tome kada će se silos istovariti kako bi se omogućilo uzorkovanje u trenutku kada je hrana za životinje u protoku.

8.4.2.2 Silos kojem se ne pristupa odozgo (zatvoreni silos) veličine < 100 tona

Postupak uzorkovanja uključuje ispuštanje u prijemni spremnik količine od 50 do 100 kg i uzimanje uzorka iz njega. Veličina grupnog uzorka odgovara čitavoj seriji, a broj pojedinačnih uzoraka odnosi se na količinu iz silosa puštenu u prijemni spremnik za uzorkovanje. Ako se uzorkuje dio serije hrane za životinje istovrsnog razreda ili opisa i utvrdi se da taj dio serije ne odgovara propisanim zahtjevima, smatra se da sva hrana za životinje iz te serije također ne ispunjava propisane zahtjeve, osim ako se detaljnom analizom utvrdi da nema dokaza da ostatak serije ne ispunjava propisane zahtjeve.

8.5 **Uzorkovanje hrane za životinje u rasutom stanju u zatvorenim posudama**

Takve serije često se mogu uzorkovati samo nakon istovara. U određenim slučajevima nije moguće obaviti istovar na mjestu utovara ili kontrole stoga se uzorkovanje obavlja pri istovaru tih posuda.

9. UPUTE ZA UZIMANJE, PRIPREMANJE I PAKIRANJE UZORAKA

9.1 Uopćeno

Uzorci se moraju uzimati i pripremiti bez nepotrebnog odlaganja uz pridržavanje mjera opreza kojima se sprječava promjena sastava ili kontaminacija proizvoda. Instrumenti, radne površine i posude za prihvatanje uzoraka moraju biti čisti i suhi.

9.2 Pojedinačni uzorci

Pojedinačni uzorci moraju se uzeti nasumično iz cijeloga uzorka i moraju biti približno jednake veličine.

Veličina pojedinačnog uzorka iznosi najmanje 100 grama ili 25 grama za vlaknastu krmu ili krmivo niske specifične težine.

Ako se u skladu s pravilima postupka uzorkovanja utvrđenima u tački 8. mora uzeti manje od 40 pojedinačnih uzoraka, veličina pojedinačnih uzoraka određuje se u funkciji potrebne veličine grupnog uzorka koji se mora postići (vidjeti tačku 6).

U slučaju uzorkovanja malih serija pakirane hrane za životinje gdje je prema količinskim zahtjevima potrebno uzeti ograničen broj pojedinačnih uzoraka, pojedinačni uzorak je sadržaj jedne izvorne jedinice čiji sadržaj ne prelazi 1 kg ili jednu litru.

U slučaju uzorkovanja pakirane hrane za životinje sastavljene od malih jedinica (npr. < 250 g), veličina pojedinačnog uzorka ovisi od veličine jedinice.

9.2.1 Hrana za životinje u rasutom stanju

Prema potrebi uzorkovanje se može izvesti pri premještanju uzorka (pri utovaru ili istovaru).

9.2.2 Pakirana hrana za životinje

Nakon odabira potrebnog broja jedinica za uzorkovanje u skladu s tačkom 5. ovog Priloga, sandom ili lopaticom uzima se

dio sadržaja svake jedinice. Prema potrebi, uzorci se mogu uzeti nakon odvojenog pražnjenja jedinica.

9.2.3 *Homogenizirana ili za homogeniziranje primjerena tekuća ili polutekuća hrana za životinje*

Nakon odabira potrebnog broja jedinica za uzorkovanje iz tačke 5. ovog Priloga, njihov udio se prema potrebi homogenizira i iz svake jedinice se uzima određena količina.

Pojedinačni uzorci se mogu uzimati pri pražnjenju sadržaja spremnika.

9.2.4 *Tekuća ili polutekuća hrana za životinje koja nije prikladna za homogeniziranje*

Nakon odabira traženog broja jedinica za uzorkovanje iz tačke 5. ovog Priloga, uzorci se uzimaju s različitih nivoa.

Uzorci se mogu uzeti i za vrijeme pražnjenja udjela, ali se prva količina mora odbaciti.

U oba slučaja ukupni volumen ne smije biti manji od 10 litara.

9.2.5 Krmni blokovi ili kameni za lizanje

Nakon odabira traženog broja blokova ili kamena za lizanje namijenjenih uzorkovanju iz tačke 5. ovog Priloga može se uzeti dio svakog bloka ili kamena za lizanje. U slučaju sumnje da blok ili kamen za lizanje nije prikladan za homogeniziranje, čitav blok ili kamen za lizanje može se uzeti kao uzorak.

Za četiri bloka ili kamena za lizanje kojima pojedinačna težina nije veća od 1 kg, pojedinačni uzorak je sadržaj jednog bloka ili jednog kamena za lizanje.

9.3 Priprema grupnih uzoraka

Pojedinačni uzorci pomiješaju se tako da tvore grupni uzorak.

9.4 Priprema konačnih uzoraka

Materijal grupnog uzorka mora se pažljivo izmiješati ⁽¹⁾.

- Svaki uzorak se pohrani u prikladnu posudu/prijemni spremnik. Potrebno je preduzeti sve mjere opreza kako bi se tokom prijevoza ili skladištenja spriječila promjena sastava uzorka, kontaminacija ili onečišćenje.
- U slučaju kontrole supstanci ili proizvoda ravnomjerno raspodijeljenih u hrani za životinje, grupni uzorak se može reprezentativno smanjiti na najmanje 2,0 kg ili 2,0 litre (reducirani uzorak) ⁽²⁾, po mogućnosti mehaničkim ili automatskim razdjelnikom. Za kontrolu prisutnosti ostataka pesticida u mahunarkama, zrnima žitarica i orašastom voću, najmanja veličina reduciranog uzorka iznosi 3 kg. Ako svojstva hrane za životinje ne dozvoljavaju korištenje razdjelnika ili razdjelnik nije dostupan, uzorak se smanjuje četvrtanjem. Potom se iz smanjenih uzoraka pripreme konačni uzorci (za potrebe kontrole, prizivnog postupka i u referentne svrhe) približno jednake veličine u skladu s količinskim zahtjevima iz tačke 7. ovog Priloga. U slučaju kontrole proizvoda, uključujući genetski modificiranih materijala, ili supstanci vjerovatno neravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje, grupni uzorak je:
 - potpuno homogeniziran i naknadno razdijeljen u konačne uzorke ili
 - reduciran na najmanje 2 kg ili 2 litre ⁽³⁾ mehaničkim ili automatskim razdjelnikom. Samo u slučaju kada svojstva hrane za životinje onemogućavaju korištenje razdjelnika, uzorak se može po potrebi smanjiti četvrtanjem. Za kontrolu prisutnosti genetski modificiranog materijala u okviru posebnih propisa o utvrđivanju metoda uzorkovanja i analize za službenu kontrolu hrane za životinje obzirom na prisutnost genetski modificiranog materijala, za koji je postupak

¹ Sve grude se razbiju (prema potrebi, tako da se odvoje i zatim vrate u uzorak).

² Osim kod vlaknaste krme ili krmiva niske specifične težine.

³ Osim kod vlaknaste krme ili krmiva niske specifične težine.

odobravanja u toku ili je odobrenje isteklo, reducirani uzorak mora sadržavati najmanje 35 000 sjemenki/zrna kako bi se omogućilo dobijanje konačnih uzoraka za potrebe provedbe, prizivnog postupka i u referentne svrhe od najmanje 10 000 sjemenki zrna (vidjeti bilješku (**)) u tački 6. ovog Priloga i bilješku (*) u tački 7. ovog Priloga.

9.5 Pakiranje uzoraka

Posude ili pakiranja zapečaćeni su i označeni tako da ih nije moguće otvoriti bez oštećivanja pečata. Cijela etiketa mora biti uključena u pečat.

9.6 Slanje uzoraka u laboratoriju

Uzorak se bez nepotrebnog odlaganja šalje u određenu analitičku laboratoriju, zajedno s podacima potrebnim analitičaru.

10. PODACI O UZORKOVANJU

O svakom uzorku moraju se voditi evidencije kako bi se svaki uzorkovani dio i njegova veličina mogao nedvosmisleno prepoznati.

U evidencijama se također navodi svako odstupanje od postupka uzorkovanja predviđenog ovim Pravilnikom.

Osim stavljanja evidencija na raspolaganje službenoj kontrolnoj laboratoriji, evidencije se stavljaju na raspolaganje nositelju djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje i/ili laboratoriji koju je odredio nositelj djelatnosti u poslovanju s hranom za životinje.".

Član 3.

Prilog II. mijenja se i glasi:

"PRILOG II.

OPĆE ODREDBE O ANALITIČKIM METODAMA ZA HRANU ZA ŽIVOTINJE

Dio A. PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU

1. Svrha

U navedenim postupcima opisuje se priprema uzoraka za analizu, koji se šalju nadzornim laboratorijama nakon uzorkovanja provedenog u skladu s odredbama iz Priloga I. ovog Pravilnika.

Ti laboratorijski uzorci moraju se pripremiti tako da izvagane količine budu homogene i reprezentativne za konačne uzorke, kako su predviđene za analitičke metode.

2. Mjere opreza

Postupak pripremanja uzoraka ovisi od analitičkih metoda koje se koriste te proizvoda i supstanci koje se kontroliraju. Stoga je vrlo važno osigurati da primijenjeni postupak za pripremanje uzorka bude primjeren analitičkoj metodi koja se koristi te proizvodima ili supstancama koje se kontroliraju.

Svi potrebni postupci moraju se provesti na način kojim se u najvećoj mogućoj mjeri sprječava kontaminacija i promjena sastava uzorka.

Mljevenje, miješanje i prosijavanje mora se vršiti bez odlaganja kako bi se uzorak čim manje izlagao zraku i svjetlu. Ne smiju se koristiti mlinovi i drobilice koji bi mogli znatno zagrijati uzorak.

Preporučuje se ručno mljevenje hrane za životinje koja je posebno osjetljiva na toplinu. Treba se pobrinuti da sama oprema ne bude izvor kontaminacije.

Ako se priprema ne može obaviti bez znatne promjene udjela vlage u uzorku, određuje se udio vode prije i nakon pripreme, u skladu s metodom utvrđenom u Dijelu A Priloga III. ovog Pravilnika.

3. Postupak

3.1 Opći postupci

Testni alikvot uzima se iz konačnog uzorka. Ne preporučuje se dijeljenje uzoraka metodom stožaste hrpe i četvrtanja jer se na taj način mogu dobiti testni alikvoti s visokom pogreškom dijeljenja.

3.1.1 Hrana za životinje koja se može samljjeti bez dodatne obrade

- Prosijani konačni uzorak se promiješa i prikupi u prikladno čistu i suhu posudu s hermetičkim zatvaračem. Neposredno prije vaganja količine za analizu (testni alikvot), uzorak se ponovo promiješa kako bi se osigurala potpuna homogenizacija.

3.1.2 Hrana za životinje koja se može samljjeti nakon sušenja
- Ako se u analitičkim metodama ne navodi drukčije, konačni uzorak se, u skladu s postupkom za prethodno sušenje iz tačke 4.3. metode za određivanje udjela vlage iz Dijela A Priloga III. ovog Pravilnika suši, tako da se udio vode snizi na 8% - 12%. Zatim se nastavlja u skladu s tačkom 3.1.1.

3.1.3 Tekuća ili polutekuća hrana za životinje

- Konačni uzorak se prikupi u prikladno čistu i suhu posudu s hermetičkim zatvaračem. Neposredno prije vaganja količine za analizu (testni alikvot), uzorak se temeljno promiješa kako bi se osigurala potpuna homogenizacija.

3.1.4 Ostala hrana za životinje

- Konačni uzorci koji se ne mogu pripremiti u skladu s jednom od gore navedenih postupaka obrađuju se bilo kojim drugim postupkom kojim se osigurava da je količina uzorka odvagana za analizu (testni alikvot) homogena i reprezentativna za konačne uzorke.

3.2 Posebni postupak pri provjeri vizuelnom inspekcijom ili mikroskopijom ili kada je čitav grupni uzorak homogeniziran

- U slučaju provjere vizuelnom inspekcijom (bez korištenja mikroskopa), za provjeru se koristi čitav laboratorijski uzorak.

- U slučaju mikroskopske provjere, u laboratoriji se može smanjiti grupni uzorak ili dodatno smanjiti reducirani uzorak. Konačni uzorci za potrebe prizivnog postupka i u referentne svrhe uzimaju se nakon postupka koji je jednak postupku koji slijedi za konačni uzorak u provedbene svrhe.

- Ako je čitav grupni uzorak homogeniziran, konačni uzorci uzimaju se iz homogeniziranog grupnog uzorka.

4. Pohranjivanje uzoraka

Uzorci se moraju pohraniti na temperaturi koja neće promijeniti njihov sastav. Uzorci namijenjeni za analizu vitamina ili supstanci posebno osjetljivih na svjetlost moraju se pohraniti u uslovima u kojima uzorak nije pod štetnim uticajem svjetla.

Dio B. ODREDBE O REAGENSIMA I OPREMI KOJI SE KORISTE U ANALITIČKIM METODAMA

1. Ako se u analitičkim metodama ne navodi drukčije, svi reagensi moraju biti analitičke čistoće (pro analisi (p.a.)). Kod analize tragova, čistoća reagensa mora se provjeriti slijepom probom. Ovisno od dobijenih rezultata, može biti potrebno dodatno pročišćivanje reagensa.
2. Kod svih postupaka iz analitičkih metoda koji uključuju pripremanje rastvora, razrjeđivanje, ispiranje ili pranje, a kod kojih se ne navodi vrsta korištenog rastvarača ili razrjeđivača, koristi se voda. U pravilu, voda mora biti demineralizirana ili destilirana. U posebnim slučajevima, navedenima u analitičkim metodama, vodu treba pročistiti posebnim postupcima.
3. Obzirom na opremu koja se uobičajeno nalazi u kontrolnim laboratorijama, u analitičkim metodama se navode samo posebni instrumenti i oprema ili oni koji zahtijevaju poseban način upotrebe. Oni moraju biti čisti, posebno kod određivanja vrlo malih količina supstanci.

Dio C. PRIMJENA ANALITIČKIH METODA I PRIKAZ REZULTATA

1. Postupak ekstrakcije

U nekoliko metoda utvrđen je poseban postupak ekstrakcije. U pravilu se, osim postupka navedenog u metodi, mogu koristiti i

drugi postupci ekstrakcije, pod uslovom da je efikasnost korištenog postupka ekstrakcije za analiziranu matricu dokazano jednakovrijedna postupku navedenom u metodi.

2. Postupak pročišćivanja

U nekoliko metoda utvrđen je poseban postupak pročišćivanja. U pravilu se, osim postupka navedenog u metodi, mogu koristiti i drugi postupci pročišćivanja, pod uslovom da se korištenim postupkom pročišćivanja za analiziranu matricu dokazano postižu analitički rezultati jednakovrijedni postupku navedenom u metodi.

3. Broj postupaka određivanja

Kod analize nepoželjnih supstanci, ako je rezultat prvog određivanja znatno (> 50 %) niži od specifikacije koja se kontrolira, nisu potrebni dodatni postupci određivanja pod uslovom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvaliteta. U ostalim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (sekundarno određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutrašnje unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Za potvrdu usklađenosti koristi se srednja vrijednost dva određivanja, uzimajući u obzir nesigurnost mjerenja.

Pri kontroli označenog udjela supstanci ili sastojka, ako se rezultatom prvog određivanja potvrdi označeni udio, tj. ako je rezultat analize unutar prihvatljivih granica odstupanja od označenog udjela, nisu potrebni dodatni postupci određivanja pod uslovom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvaliteta. U ostalim slučajevima potrebna je dvostruka analiza (sekundarno određivanje) kako bi se isključila mogućnost unutrašnje unakrsne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. Za potvrdu usklađenosti koristi se srednja vrijednost dva određivanja, uzimajući u obzir nesigurnost mjerenja.

U nekim slučajevima ta prihvatljiva granica odstupanja definirana je u zakonodavstvu kao što je Pravilnik o stavljanju na tržište i korištenju hrane za životinje ("Službeni glasnik BiH", broj 15/13), Pravilnik o nepoželjnim supstancama u hrani za životinje i važeći propisi iz ove oblasti.

4. Izvještavanje o korištenoj analitičkoj metodi

Korištena analitička metoda navodi se u izvještaju o analizi.

5. Izvještavanje o rezultatima analize

Rezultat analize prikazuje se na način utvrđen analitičkom metodom, s primjerenim brojem značajnih karakteristika, a prema potrebi se korigira obzirom na udio vode u konačnom uzorku prije pripreme.

6. Nesigurnost mjerenja i stepen iskorištenja pri analizi nepoželjnih supstanci

Vezano za nepoželjne supstance u smislu Pravilnika o nepoželjnim supstancama, smatra se da proizvod namijenjen za hranu za životinje nije u skladu s najvećom dopuštenom količinom ako je rezultat analize, u odnosu na hranu za životinje s udjelom vode od 12%, veći od najveće dopuštene količine, uzimajući u obzir proširenu nesigurnost mjerenja i korekciju za iskorištenje. Za ocjenu usklađenosti koristi se analizirana koncentracija nakon korekcije za iskorištenje i nakon oduzimanja proširene nesigurnosti mjerenja. Taj postupak se primjenjuje samo u slučajevima kada analitička metoda omogućava procjenu nesigurnosti mjerenja i korekciju za iskorištenje (na primjer, nije moguć u slučaju mikroskopske analize).

Rezultati analize iskazuju se na sljedeći način (ako korištena analitička metoda omogućava ocjenu nesigurnosti mjerenja i korekciju za iskorištenje):

- a) s korekcijom za iskorištenje, pri čemu se navodi nivo iskorištenja. Korekcija za iskorištenje nije potrebna ako je postotak iskorištenja između 90% i 110%.
- b) kao 'x +/- U', pri čemu je x rezultat analize, a U proširena nesigurnost mjerenja uz upotrebu obuhvatnog faktora 2, čime se postiže nivo pouzdanosti od približno 95%.

Međutim, ako je rezultat analize znatno (> 50%) niži od specifikacije koja se kontrolira i pod uslovom da su korišteni primjereni postupci za osiguranje kvaliteta, a svrha analize je samo provjera usklađenosti sa zakonskim odredbama, rezultat analize se može iskazati bez korekcije za iskorištenje i u tim slučajevima se korekcija za iskorištenje i nesigurnost mjerenja mogu izostaviti".

Član 4.

U Prilogu V. Dio B. mijenja se i glasi:

"Dio B. ODREĐIVANJE NIVOA DIOKSINA (PCDD/PCDF) I PCB-ova
POGLAVLJE I. METODE UZORKOVANJA I
TUMAČENJE REZULTATA ANALIZE
1. Svrha i područje primjene

Uzorci za službenu kontrolu nivo polihloriranih dibenzo-p-dioksina (PCDD), polihloriranih dibenzofurana (PCDF), polihloriranih bifenila sličnih dioksinu (PCB)^{(1)*} i PCB-ova koji nisu slični dioksinu u hrani uzimaju u skladu s odredbama Priloga I. ovog Pravilnika. Primjenjuju se količinski zahtjevi za kontrolu supstanci ili proizvoda ravnomjerno raspoređenih u hrani za životinje kako je predviđeno tačkom 5.1. Priloga I. ovog Pravilnika. Grupni uzorci dobijeni na taj način smatraju se reprezentativnim za serije i podserije iz kojih su uzeti. Usklađenost s najvišim nivoima određenim Pravilnikom o nepoželjnim supstancama utvrđuje se na osnovu nivoa utvrđenih na laboratorijskim uzorcima.

Za potrebe ovog Dijela B, primjenjuju se definicije utvrđene u članu 2. Pravilnika o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata ("Službeni glasnik BiH", broj 95/10)

Kongener	Vrijednost TEF-a	Kongener	Vrijednost TEF-a
Dibenzo-p-dioksini ("PCDD") i Dibenzo-p-furani ("PCDF")		PCB-i "slični dioksinu"Ne-orto PCB-i+Mono-orto PCB-i	
2,3,7,8-TCDD	1	Ne-orto PCB-i	
1,2,3,7,8-PeCDD	1		
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003		
		Mono-orto PCB-i	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Korištene skraćenice: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = heksa; "Hp" = hepta; "O" = okta; "CDD" = hlordibenzo-p-dioksin; "CDF" = hlordibenzofuran; "CB" = hlorobifenil.

Uz te definicije, za potrebe ovog Dijela B primjenjuju se i sljedeće definicije:

"Orijentacijske metode" znači metode upotrijebljene za odabir onih uzoraka s nivoima PCDD/PCDF-ova i dioksinu

¹ Tablica faktora ekvivalentne toksičnosti (TEF) za dioksine, furane i PCB-ove slične dioksinu: WHO-TEF za procjenu rizika za zdravlje ljudi na osnovu zaključaka sa stručnog zasjedanja Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) – Međunarodni program za sigurnost hemikalija (IPCS) održanog u Ženevi u junu 2005. (Martin van den Berg et al., Ponovljena evaluacija faktora ekvivalentne toksičnosti za dioksine i spojeve slične dioksinu kod ljudi i sisara Svjetske zdravstvene organizacije, provedena 2005. Toksikološke znanosti 93(2), 223.–241. (2006.))

sličnih PCB-ova koje prelaze najveće dopuštene količine ili pragove za pokretanje postupka. One omogućavaju troškovno efikasnu veliku propusnost uzoraka i tako povećavaju mogućnost za otkrivanje novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Orijentacijske metode zasnivaju se na bioanalitičkim i GC-MS metodama. Rezultati iz uzoraka koji prelaze cut-off vrijednost za provjeru usklađenosti s najvećom dopuštenom količinom provjeravaju se punom ponovljenom analizom originalnog uzorka potvrđnom metodom.

"Potvrđne metode" znači metode koje osiguravaju potpune ili dopunske informacije koje omogućavaju nedvosmisleno otkrivanje i kvantificiranje najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i dioksina sličnih PCB-ova, ili u slučaju potrebe, praga za pokretanje postupka. Pri takvim metodama koriste se plinska kromatografija i masena spektrometrija visoke razlučivosti (GC-HRMS) ili plinska kromatografija i tandem masena spektrometrija (GC-MS/MS).

2. Usklađenost serije ili podserije s najvećom dopuštenom količinom

2.1. U pogledu PCB-ova koji nisu slični dioksinu

Serijski se prihvaća ako analitički rezultat ne prelazi najveću dopuštenu količinu za PCB-ove koji nisu slični dioksinu kako je propisano u Pravilniku o nepoželjnim supstancama uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Serija nije usklađena najvećim dopuštenim količinama iz Pravilnika o nepoželjnim supstancama ako gornji^{(1)*} analitički rezultat potvrđen dvostrukom analizom^{(2)*} prelazi najveće dopuštene količine uzimajući u obzir mjernu nesigurnost. Srednja vrijednost dva određivanja koristi se za provjeru usklađenosti, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu s jednom od sljedećih pristupa:

- izračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija pouzdanost od oko 95 %. Serija odnosno podserija nije usklađena ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene najviše dopuštene količine,
- postavljanjem granične količine (CC α) u skladu s odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda (tačka 2.1.2.5. Priloga II. Pravilnika o provođenju analitičkih metoda - primjer supstance s određenom dozvoljenom količinom). Serija ili podserija je neusklađena ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CC α .

Stavovi 1., 2. i 3. primjenjuju se na rezultate analize dobijene iz uzorka za službene kontrole. U slučaju potrebe dodatne analize ili referentne potrebe primjenjuju se propisi na nivou države.

2.2. U pogledu PCDD/F-a i dioksina sličnih PCB-ova

Serijski je usklađena s najvećim dopuštenim količinama ako rezultat pojedinačne analize

- provedene orijentacijske metodom s udjelom lažno usklađenih rezultata manjim od 5% ukazuje da nivo ne prelazi dotične najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksina sličnih PCB-ova kako je propisano u Pravilniku o nepoželjnim supstancama,
- provedene potvrđnom metodom ne prelazi dotične najveće dopuštene količine PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksina sličnih PCB-ova kako je propisano u Pravilniku o nepoželjnim supstancama uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Za orijentacijske testove potrebno je odrediti cut-off vrijednost za odluku o usklađenosti s dotičnim najvećim dopuštenim količinama određenim za PCDD/PCDF ili za zbir PCDD/PCDF-ova i dioksina sličnih PCB-ova.

Serijski nije usklađena s najvećim dopuštenim količinama kako su određene u Pravilniku o nepoželjnim supstancama ako gornji^{(3)*} analitički rezultat dobijen potvrđnom metodom i potvrđen dvostrukom analizom, prelazi bez sumnje najveću dopuštenu količinu uzimajući u obzir mjernu nesigurnost^{(4)*}. Srednja vrijednost dva određivanja koristi se za provjeru usklađenosti uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

Mjerna nesigurnost može se uzeti u obzir u skladu s jednom od sljedećih pristupa:

- izračunom proširene nesigurnosti, koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija pouzdanost od oko 95%. Serijska odnosno podserijska nije usklađena ako je izmjerena vrijednost umanjena za mjernu nesigurnost (U) iznad utvrđene najviše dopuštene količine. U slučaju kada se odvojeno određuju PCDD/PCDF i dioksini slični PCB-i, tada se koristi zbir procijenjenih proširenih nesigurnosti za svaki rezultat analize PCDD/PCDF-ova i dioksina sličnih PCB-ova zasebno, kako bi se dobio zbir PCDD/PCDF-ova i dioksina sličnih PCB-ova,
- postavljanjem granične količine (CC α) u skladu s odredbama Pravilnika o provođenju analitičkih metoda (tačka 2.1.2.5. Priloga I. Pravilnika o provođenju analitičkih metoda – primjer supstance s određenom dozvoljenom količinom). Serijska ili podserijska nije usklađena ako je izmjerena vrijednost jednaka ili iznad CC α .

Stavovi 1. do 4. primjenjuju se na rezultate analize dobijene na uzorku službene kontrole. U slučaju potrebe dodatne analize ili referentne potrebe primjenjuju se propisi na nivou države.

3. Rezultati koji prelaze pragove za pokretanje postupka kako je utvrđeno u Prilogu II. Pravilnika o nepoželjnim supstancama

¹ Pojam "gornji" zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera. Pojam "donji" zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera. Pojam "srednji" zahtijeva primjenu polovine granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera.

² Uopćeno, primjenjuju se zahtjevi za dvostruku analizu iz Priloga II. Dijela C tačke 3. ovog Pravilnika. Međutim, za potvrđne metode upotrebom C-obilježenog unutrašnjeg standarda za odgovarajuće analite, dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju takve potvrđne metode nije usklađen. Dvostruka analiza je potrebna kako bi se isključila mogućnost unutrašnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem porijekla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.

³ Pojam "gornji" zahtijeva primjenu granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam "donji" zahtijeva primjenu nule za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ). Pojam "srednji" zahtijeva primjenu polovine granice kvantifikacije za izračun doprinosa svakog pojedinačnog nekvantificiranog kongenera ekvivalentu toksičnosti (TEQ).

⁴ Uopćeno, primjenjuju se zahtjevi za dvostruku analizu iz Priloga II. Dijela C tačke 3. ovog Pravilnika. Međutim, za potvrđne metode upotrebom 13C-obilježenog unutrašnjeg standarda za odgovarajuće analite, dvostruka analiza potrebna je samo ako rezultat prvog određivanja, u kojem se primjenjuju takve potvrđne metode nije usklađen. Dvostruka analiza je potrebna kako bi se isključila mogućnost unutrašnje uzajamne kontaminacije ili slučajne zamjene uzoraka. U slučaju da se analiza izvodi u okviru incidenta kontaminacije, potvrđivanje dvostrukom analizom može se zaobići u slučaju da su uzorci koji su odabrani za analizu utvrđivanjem porijekla povezani s incidentom kontaminacije i otkrivena količina je značajno veća od najveće dopuštene količine.

Pragovi za pokretanje postupka predstavljaju alat za odabir uzoraka u onim slučajevima u kojima je potrebno utvrditi izvor kontaminacije i preduzeti mjere za njeno smanjenje ili uklanjanje. Orijentacijske metode uspostavljaju odgovarajuće cut-off vrijednosti za odabir tih uzoraka. Mjere potrebne za otkrivanje izvora i za smanjenje ili uklanjanje kontaminacije provest će se samo ako je prelaženje praga za pokretanje postupka potvrđeno dvostrukom analizom koristeći potvrđnu metodu i uzimajući u obzir mjernu nesigurnost^{(1)*}.

POGLAVLJE II. Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste za kontrolu količina dioksina (PCDD/PCDF) i dioksinu sličnih PCB-ova u određenoj hrani

1. Područje primjene

Zahtjevi iz ovog Poglavlja primjenjuju se za službenu kontrolu hrane u kojoj se određuju količina 2,3,7,8-supstituiranih polihloriranih dibenzo-p-dioksina i polihloriranih dibenzofurana (PCDD/PCDF) i dioksinu i dioksinu sličnih polihloriranih bifenila (dioksinu slični PCB-i) i za druge regulatorne potrebe.

Monitoring prisutnosti PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u hrani može se obavljati pomoću dva različita tipa analitičkih metoda:

a) Orijentacijske metode

Cilj orijentacijskih metoda je odabir onih uzoraka s nivoima PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova koje prelaze najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Orijentacijske metode trebale bi omogućiti troškovno efikasnu veliku propusnost uzoraka i tako povećati mogućnost za otkrivanje novih incidenata s velikom izloženosti i rizicima za zdravlje potrošača. Osmišljene su tako da se njima izbjegavaju lažno usklađeni rezultati. One mogu uključivati bioanalitičke metode i GC-MS metode.

Orijentacijske metode upoređuju analitički rezultat s cut-off vrijednošću, navodeći odluku da ili ne u pogledu mogućeg prelaženja najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/F-a i dioksinu sličnih PCB-ova u uzorcima za koje se sumnja da su neusklađeni s najvećom dopuštenom količinom mora biti određena/potvrđena potvrđnom metodom.

Osim toga, orijentacijske metode mogu pokazati nivoe PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova prisutne u uzorku. U slučaju primjene bioanalitičkih orijentacijskih metoda rezultat se izražava kao bioanalitički ekvivalenti (BEQ), dok se u slučaju primjene fizikalno-hemijskih GC-MS metoda izražava kao toksični ekvivalenti (TEQ). Numerički navedeni rezultati orijentacijskih metoda prikladni su za dokazivanje usklađenosti ili sumnje na neusklađenost ili prelaženja pragova za pokretanje postupka i pokazuju raspon nivoa u slučaju daljnjeg praćenja pomoću potvrđnih metoda. Oni nisu prikladni u svrhe kao što su ocjena količina prisutnosti, procjena unosa, praćenje vremenskih kretanja kod količina ili ponovljena ocjena pragova za pokretanje postupka i najveće dopuštene količine.

b) Potvrđne metode

Potvrđne metode omogućavaju nedvosmisleno određivanje količine PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u uzorku i osiguravaju punu informaciju na nivou kongenera. Stoga te metode omogućavaju kontrolu najvećih dopuštenih količina i pragova za pokretanje postupka uključujući potvrdu rezultata dobijenih orijentacijskim metodama. Osim toga rezultati se mogu koristiti u druge svrhe kao što su određivanje niskih količina prisutnosti kod praćenja hrane, praćenje vremenskih kretanja, procjena izloženosti populacije i stvaranje baze podataka zbog moguće ponovne ocjene pragova za pokretanje postupka i najvećih dopuštenih količina. One su važne i za određivanje

uzoraka kongenera kako bi se ustanovio izvor moguće kontaminacije. Pri takvim metodama koristi se GC-HRMS. Za potvrđivanje usklađenosti ili neusklađenosti s najvećom dopuštenom količinom može se koristiti i GC-MS/MS.

2. Pozadina

Za izračun koncentracija toksičnih ekvivalenata (TEQ), koncentracije pojedinačnih supstanci u datom uzorku pomnože se s njihovim odgovarajućim faktorom toksične ekvivalentnosti (TEF) (vidjeti bilješku ⁽¹⁾ Poglavlja I.), a zatim saberu kako bi se dobila ukupna koncentracija dioksinu sličnih spojeva izraženih kao TEQ.

Za potrebe ovog Dijela B, prihvaćena specifična granica kvantifikacije pojedinačnog kongenera znači najniža koncentracija analita koja se može izmjeriti razumnom statističkom sigurnošću, ispunjavajući kriterije identifikacije kako su opisani u međunarodno priznatim normama, npr. u normi EN 16215:2012 (Hrana za životinje - određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-ova pomoću GC-HRMS i PCB indikatora pomoću GC-HRMS) i/ili u metodi EPA 1613 i 1668 kako su revidirani.

Granica kvantifikacije pojedinog kongenera može se odrediti na sljedeći način:

- a) koncentracija analita u ekstraktu uzorka koja proizvodi odziv instrumenta na dva različita iona koji se prate uz omjer signala i šuma (signal/šum) 3:1 pri manje osjetljivom signalu; ili
- b) ako zbog tehničkih razloga izračun signal-šum ne daje pouzdane rezultate, najniža tačka koncentracije na kalibracijskoj krivulji koja daje prihvatljivo ($\leq 30\%$) i dosljedno (mjereno najmanje na početku i na kraju analitičke serije uzoraka) odstupanje prosječnom faktoru relativnog odgovora izračunato za sve tačke na kalibracijskoj krivulji u svakoj seriji uzoraka. LOQ se računa iz najniže tačke koncentracije uzimajući u obzir povrat unutrašnjih standarda i uzimanje uzorka.

Bioanalitičke orijentacijske metode ne daju rezultate na nivou kongenera, već samo navode^{(2)*} vrijednosti TEQ izražene u bioanalitičkim ekvivalentima (BEQ), obzirom na to da svi spojevi prisutni u izolatu uzorka koji proizvedu odgovor pri testiranju možda ne ispunjavaju sve zahtjeve načela TEQ.

Orijentacijske i potvrđne metode mogu se upotrijebiti za kontrolu određene matrice samo ako su dovoljno osjetljive za pouzdano utvrđivanje količina koje su na pragu za pokretanje postupka ili najvećoj dopuštenoj količini.

3. Zahtjevi za osiguranje kvaliteta

3.1. Mjere za sprječavanja uzajamnog zagađenja moraju se preduzeti u svakom stepenu uzorkovanja i analize.

3.2. Uzorci se moraju čuvati i prevoziti u spremnicima od stakla, aluminijske, polipropilena ili polietilena koji su primjereni za čuvanje i ne utiču na sadržaj PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u uzorcima. Tragovi papirne prašine moraju se ukloniti iz spremnika.

3.3. Skladištenje i prijevoz moraju biti provedeni tako da se očuva cjelovitost uzorka hrane.

3.4. Gdje je to primjenjivo, svaki laboratorijski uzorak treba sitno samljati i dobro promiješati koristeći postupak kojim se postiže potpuna homogenizacija (npr. prosijavanjem samljevenog uzorka kroz sito otvora 1 mm); ako je sadržaj vlage u uzorku previsok, uzorak se prije mljevenja mora osušiti.

¹ Jednako obrazloženje i zahtjevi za dvostruku analizu za kontrolu pragova za pokretanje postupka kao u bilješci (4) za najveće dopuštene količine

² Bioanalitičke metode nisu specifične za određivanje spojeva kongenera uključenih u sistem TEF. Drugi strukturno povezani spojevi koji se vežu na receptor aromatskih ugljikovodika (AhR) mogu biti prisutni u izolatu uzorka što pridonosi općem odgovoru. Stoga bioanalitički rezultati nisu procjena, već više pokazatelj TEQ vrijednosti u uzorku.

3.5. Kontrola reagensa, staklovine i opreme zbog mogućeg uticaja na rezultate izražene u TEQ ili BEQ od opće je važnosti.

3.6. Slijepu probu treba analizirati, provodeći cijeli analitički postupak ali bez uzorka.

3.7. Za bioanalitičke metode vrlo je važno da su sva staklova i rastvarači koji se koriste u analizi ispitani da su slobodni od spojeva koji interferiraju s otkrivanjem ciljnih spojeva u radnom rasponu. Staklovinu treba isprati rastvaračima ili/i grijati na temperaturama koje su primjerene za otklanjanje tragova PCDD/PCDF-ova, dioksinu sličnih spojeva te interferirajućih spojeva s njene površine.

3.8. Količina uzorka za ekstrakciju mora biti dovoljna da se zadovolje zahtjevi u pogledu dovoljno niskog radnog raspona uključujući koncentracije na nivou najveće dopuštene količine ili pragu za pokretanje postupka.

3.9. Posebni postupci pripreme uzorka koji se koriste za dotične proizvode moraju slijediti međunarodno priznate smjernice.

4. Zahtjevi za laboratorije

4.1. U skladu s odredbama Pravilnika o službenim kontrolama, laboratorije akreditiraju priznate organe koji rade u skladu sa zahtjevima BAS EN ISO/IEC 17011 standardu, kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvaliteta. Laboratorije se akreditiraju prema normi BAS EN ISO/IEC 17025.

4.2. Sposobnost laboratorija dokazuje se kontinuiranim uspješnim sudjelovanjem u međulaboratorijskim studijama za određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u relevantnim matricama hrane i rasponima koncentracija.

4.3. Laboratorije koje provode orijentacijske metode pri rutinskim kontrolama uzoraka moraju uspostaviti usku saradnju s laboratorijama koje provode potvrdne metode zbog kontrole kvaliteta, i zbog potvrde analitičkih rezultata sumnjivih uzoraka.

5. Osnovni zahtjevi za analitičke postupke za dioksine (PCDD/PCDF) i dioksinu slične PCB-ove

5.1. Nisko radno područje i granice kvantifikacije

Za PCDD/PCDF, osjetljivost određivanja mora biti na nivou pikograma (10^{-15} g) zbog visoke toksičnosti nekih od ovih spojeva. Za većinu PCB kongenera dovoljna je osjetljivost u području nanograma (10^{-9} g). Međutim za mjerenje toksičnijih kongenera dioksinu sličnih PCB-ova (posebno ne-orto supstituiranih kongenera) donji dio radnog raspona mora doseći donje pikogramsko područje (10^{-12} g). Za sve druge kongenere PCB-ova, dovoljan je nivo kvantifikacije u nanogramskom rasponu (10^{-9} g).

5.2. Visoka selektivnost (specifičnost)

5.2.1. Potrebno je razlikovati između PCDD-a, PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova i mnogobrojnih drugih, istovremeno ekstrahiranih i vjerovatno interferirajućih spojeva, prisutnih u koncentracijama koje su nekoliko redova veličine veće od koncentracija predmetnih analita. Kod metoda plinske kromatografije/masene spektrometrije (GC-MS), nužno je razlikovati između različitih kongenera, npr. između toksičnih (npr. 17 2,3,7,8-supstituiranih PCDD/PCDF i 12 dioksinu sličnih PCB-ova) i drugih kongenera.

5.2.2. Bioanalitičke metode moraju moći otkriti ciljne spojeve kao zbir PCDD/PCDF-ova i/ili dioksinu sličnih PCB-ova. Čišćenje uzorka ima za cilj uklanjanje spojeva koji uzrokuju lažnu neusklađenost rezultata ili spojeva koji mogu smanjiti odgovor i prouzrokovati lažno usklađene rezultate.

5.3. Visoka tačnost (istinitost i preciznost, očito iskorištenje pri biološkim testovima)

5.3.1. Kod metoda GC-MS određivanje treba osigurati valjanu procjenu prave koncentracije u uzorku. Visoka tačnost (tačnost mjerenja: podudarnost između rezultata mjerenja i stvarne ili prihvaćene referentne vrijednosti mjerenoga) potrebna je da bi

se izbjeglo odbijanje rezultata analize uzorka na osnovu nepouzdana procjene rezultata TEQ-a. Tačnost se izražava kao istinitost (razlika između izmjerene srednje vrijednosti za analit u certificiranome materijalu i njegove certificirane vrijednosti, izražena kao postotak ove vrijednosti) i preciznost (RSD_R relativna standardna devijacija izračunata iz rezultata dobijenih u uslovima obnovljivosti).

5.3.2. Kod bionalitičkih metoda potrebno je odrediti očito iskorištenje pri biološkim testovima. Očito iskorištenje pri biološkim testovima znači nivo BEQ-a izračunat iz kalibracijske krivulje TCDD-a ili PCB-ova 126, korigiran za slijepe vrijednosti i zatim podijeljen s vrijednosti TEQ-a, koji je određen potvrdnom metodom. Njegova namjena je ispravljanje faktora poput gubitka PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih spojeva tokom postupka ekstrakcije i pročišćavanja, povećavanje ili smanjivanje odgovora koekstrahiranih spojeva (agonistički i antagonistički učinci), kvalitet prilagođavanja krivulje, ili razlike između vrijednosti faktora ekvivalenta toksičnosti (TEF) i relativne potencije (REP). Očito iskorištenje pri biološkim testovima izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka, koji imaju reprezentativnu raspodjelu kongenera u blizini predmetnog nivoa.

5.4. Validacija u rasponu najveće dopuštene količine i opće mjere za kontrolu kvaliteta

5.4.1. Laboratorije moraju dokazati efikasnost izvedbe metode u određenom rasponu najveće dopuštene količine, npr. 0,5 x, 1 x i 2 x većom količinom od najveće dopuštene količine, s prihvatljivom relativnom standardnom devijacijom ponovljene analize tokom validacijskog postupka i/ili rutinske analize.

5.4.2. Redovne slijepe probe i pokusi s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka (ako je dostupan, poželjan je certificirani referentni materijal) provode se kao mjere unutrašnje kontrole kvaliteta. Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za slijepe probe, pokuse s dodavanjem ili analize kontrolnih uzoraka, bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je provedba analiza u skladu sa zahtjevima.

5.5. Granica određivanja

5.5.1. Za bioanalitičku orijentacijsku metodu, određivanje LOQ nije nužno potrebno, ali je potrebno dokazati da metoda može razlikovati slijepu vrijednost od cut-off vrijednosti. Pri određivanju vrijednosti BEQ određuje se prag izvještavanja zbog postupanja s uzorcima koji daju odgovor ispod tog nivoa. Za prag izvještavanja potrebno je dokazati da se razlikuje najmanje za tri puta od postupka sa slijepim uzorcima s odgovorom ispod radnog raspona. Stoga se izračunava na osnovu uzoraka koji sadrže ciljne spojeve blizu najniže zahtijevanog nivoa, a ne iz omjera između signala i šuma ili slijepe probe.

5.5.2. Granica određivanja (LOQ) za potvrdnu metodu mora biti približno jedna petina najveće dopuštene količine.

5.6. Analitički kriteriji

Za pouzdane rezultate potvrdnih ili orijentacijskih metoda moraju biti ispunjeni sljedeći kriteriji u rasponu najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, za TEQ vrijednosti odnosno BEQ vrijednosti, koje se određuju kao ukupna vrijednost TEQ (kao zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova), ili odvojeno za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove:

	Orijentacijske metode s bioanalitičkim ili fizikalno-hemijskim metodama	Potvrdne metode
Učestalost lažno usklađenih rezultata(1)	< 5%	
Istinitost		-20% do +20%
Ponovljivost (RSDr)	< 20%	
Interna laboratorijska obnovljivost (RSDR)	< 25%	< 15%
(1) U odnosu na najveće dopuštene količine		

5.7. Posebni zahtjevi za orijentacijske metode

5.7.1. Mogu se koristiti GC-MS metode analize i bioanalitičke metode. Za GC-MS metode primjenjuju se zahtjevi utvrđeni u tački 6. Za ćelijske bioanalitičke metode primjenjuju se posebni zahtjevi utvrđeni u tački 7.

5.7.2. Laboratorije koje provode orijentacijske metode za rutinsku kontrolu uzoraka moraju uspostaviti usku saradnju s laboratorijama koje provode potvrdnu metodu.

5.7.3. Tokom rutinske analize potrebno je provesti provjeru mogućnosti orijentacijske metode pomoću kontrole analitičkog kvaliteta i stalnog vrjednovanja metoda. Kontinuirano se mora provoditi program za kontrolu usklađenih rezultata.

5.7.4. Provjera mogućeg smanjenja ćelijskog odgovora i citotoksičnosti:

20% izolata uzoraka mjeri se u rutinskom orijentacijskom pregledu bez i s dodatim 2,3,7,8-TCDD koji odgovara najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka kako bi se provjerilo je li odgovor možda smanjen zbog interferirajućih supstanci prisutnih u izolatu uzorka. Izmjerena koncentracija uzorka s dodatkom uporedi se sa zbirom koncentracija izolata bez dodatka i koncentracije za dodavanje. Ako je ta izmjerena koncentracija za više od 25% manja od izračunate (zbirne) koncentracije, to ukazuje na moguće smanjenje signala i dotični rezultat treba podvrgnuti potvrdnoj analizi GC-HRMS. Rezultati se prate na dijagramima kontrole kvaliteta.

5.7.5. Kontrola kvaliteta usklađenih uzoraka:

Otprilike od 2% do 10% usklađenih uzoraka, ovisno od matrice uzorka i laboratorijskih iskustava, bit će potvrđeno GC-HRMS analizom.

5.7.6. Određivanje učestalosti lažno usklađenih rezultata na osnovu podataka QC:

Određuje se učestalost lažno usklađenih rezultata dobijenih orijentacijskim metodama analize uzoraka ispod i iznad najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Stvarna učestalost lažno usklađenih rezultata mora biti ispod 5%. Kada je najmanje 20 potvrđenih rezultata po matrici/grupi matrica dostupno iz kontrole kvaliteta usklađenih uzoraka, donose se zaključci o učestalosti lažno usklađenih rezultata iz te baze podataka. Rezultati uzoraka analizirani prstenastim probama ili tokom incidenata kontaminacije koji pokrivaju raspon koncentracije do npr. 2x najveće dopuštene količine (NDK), mogu se uključiti i u minimum od 20 rezultata za procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata. Uzorci moraju uključivati najčešće uzorke kongenera koji predstavljaju različite izvore.

Iako su orijentacijske metode usmjerene prvenstveno na otkrivanje uzoraka koji prelaze prag za pokretanje postupka, kriterij za određivanje lažno usklađenih rezultata je najveća dopuštena količina, uzimajući u obzir mjernu nesigurnost potvrdne metode.

5.7.7. Mogući neusklađeni rezultati iz orijentacijske metode moraju se uvijek provjeriti cijelom ponovljenom analizom na originalnom uzorku potvrdnom metodom. Ti uzorci se mogu koristiti i za procjenu učestalosti lažno neusklađenih rezultata. Kod orijentacijskih metoda učestalost "lažnih neusklađenih rezultata" je dio rezultata za koje je potvrđeno da su usklađeni s potvrdnom analizom, dok je prethodnom orijentacijskom metodom analize za uzorak izražena sumnja da nije usklađen. Međutim, procjena prednosti orijentacijske metode zasniva se na poređenju lažno neusklađenih rezultata s ukupnim brojem pregledanih uzoraka. Ta učestalost mora biti dovoljno niska da je upotreba orijentacijske metode korisna.

5.7.8. Bioanalitičke metode moraju barem u uslovima validacije valjano pokazati količinu TEQ, izračunatu i izraženu kao BEQ. I kod bioanalitičkih metoda provedenih u uslovima ponovljivosti, interna laboratorijska ponovljivost RSD_r je uobičajeno manja nego obnovljivost RSD_R.

6. Posebni zahtjevi koje moraju ispunjavati metode GC-MS za orijentacijske ili potvrdne metode

6.1. *Prihvatljive razlike između gornje i donje granice razina WHO-TEQ*

Razlika između gornje i donje granice ne smije biti veća od 20 % da bi se potvrdilo prelaženje najveće dopuštene količine ili u slučaju potrebe prelaženja praga za pokretanje postupka.

6.2. *Kontrola iskorištenja*

6.2.1. Dodavanje ¹³C-označenih 2,3,7,8-hlor supstituiranih unutrašnjih standarda za PCDD/PCDF i ¹³C-označenih unutrašnjih standarda za dioksinu slične PCB-ove je potrebno provesti na samom početku analitičke metode, na primjer prije ekstrakcije kako bi se vrjednovao analitički postupak. Najmanje se mora dodati po jedan kongener za sve tetra do okta-hlorirane homologne grupe za PCDD/PCDF i najmanje po jedan kongener za sve homologne grupe za dioksinima slične PCB-ove (odnosno najmanje po jedan kongener za svaki izabrani ion u spektrometriji masa koja se koristi za praćenje PCDD/PCDF-ova odnosno dioksinima sličnih PCB-ova). U slučaju potvrdnih metoda koristi se svih 17 ¹³C-označenih 2,3,7,8-hlor supstituiranih unutrašnjih standarda za PCDD/PCDF-ove i svih 12 ¹³C-označenih unutrašnjih standarda za dioksinu slične PCB-ove.

6.2.2. Relativne faktore odgovora treba utvrditi i za one kongenere za koje se ne dodaje ni jedan ¹³C-označen analog, tako što će se koristiti odgovarajući kalibracijski rastvori.

6.2.3. Za hranu biljnog i životinjskog porijekla koja sadrži manje od 10% masti, unutrašnji standardi se obavezno dodaju prije ekstrakcije. Za hranu životinjskog porijekla u kojoj je udio masti veći od 10%, unutrašnji standardi se mogu dodati prije ili poslije ekstrakcije masti. Mora se provesti odgovarajuće vrjednovanje efikasnosti ekstrakcije, što ovisi od toga dodaje li se unutrašnji standard prije ili nakon ekstrakcije masti, te o tome iskazuju li se rezultati na udio masti u uzorku ili na cijeli uzorak.

6.2.4. Prije GC-MS analize treba dodati 1 ili 2 (surogat) standarda radi provjere iskorištenja.

6.2.5. Potrebno je kontrolirati iskorištenje. Za potvrdne metode, iskorištenje pojedinačnih unutrašnjih standarda mora biti u rasponu između 60% i 120%. Manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere, a posebno za neke hepta- i okta-hlorirane dibenzo-p-dioksine i dibenzofurane, je prihvatljivo pod uslovom da je njihov doprinos TEQ vrijednosti manji od 10% ukupne TEQ vrijednosti (dobijene na osnovu zbira PCDD/PCDF-ova i dioksinima sličnih PCB-ova). Za orijentacijske metode GC-MS iskorištenje mora biti u rasponu između 30% i 140%.

6.3. *Uklanjanje interferirajućih supstanci*

- Odvajanje PCDD/PCDF-ova od interferirajućih hloriranih spojeva kao što su PCB-i koji nisu slični dioksinu i hlorirani difenil eteri se provodi pomoću odgovarajućih hromatografskih tehnika (najbolje pomoću kolone s florisilom, aluminijevim oksidom i/ili aktivnim ugljenom). - Razdvajanje izomera plinskom hromatografijom mora biti zadovoljavajuće (< 25% od vrha do vrha između 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.4. *Kalibracija sa standardnom krivuljom*

Raspon kalibracijske krivulje mora obuhvaćati relevantni raspon najvećih dopuštenih količina ili pragova za pokretanje postupka.

6.5. *Posebni zahtjevi za potvrdne metode*

- Za GC-HRMS:

U HRMS, rezolucija je tipično veća ili jednaka 10 000 za cijeli maseni raspon pri 10% najmanjeg razmaka između dviju vršnih vrijednosti jednakog intenziteta.

Ispunjavanje daljnjih kriterija za identifikaciju i potvrđivanje kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-ova pomoću GC/HRMS i PCB indikatora

pomoću GC/HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane.

- Za GC-MS/MS:

Praćenje barem dva specifična prekursora iona, svakog s jednim posebnim odgovarajućim prijelaznim ionom produkta za sve označene i neoznačene analite u okviru analize. Najveće dopušteno odstupanje relativnih intenziteta iona od $\pm 15\%$ za odabranu tranziciju iona produkta u poređenju s izračunatim ili izmjerenim vrijednostima (prosjek iz kalibracijskih normi), primjenjujući identične MS/MS uslove, posebno energiju kolizije i pritisak plina kolizije, za svaku tranziciju jednog analita.

Rezoluciju za svaki kvadropol treba postaviti jednako ili bolje od jedinične masene rezolucije (jedinična masena rezolucija: rezolucija koje je dovoljna da dvije vršne tačke razdvoji za jednu masenu jedinicu) kako bi se smanjila moguća međudjelovanja predmetnih analita.

Ispunjavanje daljnjih zahtjeva kako su opisani u međunarodno priznatim normama, na primjer u normi EN 16215:2012 (hrana za životinje – određivanje dioksina i dioksinu sličnih PCB-ova pomoću GC-HRMS i PCB indikatora pomoću GC-HRMS) i/ili u metodama EPA 1613 i 1668, kako su revidirane, osim obaveze da se koristi GC-HRMS.

7. Posebni zahtjevi za bioanalitičke metode

Bioanalitičke metode su metode koje se zasnivaju na upotrebi bioloških načela kao što su testovi na ćelijskoj osnovi, testovi na osnovu receptora ili imunološki testovi. U ovoj tački 7. utvrđuju se općeniti zahtjevi za bioanalitičke metode.

Orijentacijska metoda u načelu klasificira uzorak kao usklađen ili kao sumnjiv da nije usklađen. U tu svrhu izračunata vrijednost BEQ upoređuje se s cut-off vrijednošću (vidjeti 7.3.). Uzorci ispod cut-off vrijednosti smatraju se usklađenim, za uzorke jednake ili iznad cut-off vrijednosti sumnja se da nisu usklađeni, što zahtijeva analizu potvrdnom metodom. U praksi BEQ vrijednost koja odgovara 2/3 najveće dopuštene količine može se koristiti kao najprimjerenija cut-off vrijednost osiguravajući učestalost lažno usklađenih rezultata ispod 5 % i prihvatljivu učestalost lažno neusklađenih rezultata. Kako su najveće dopuštene količine odvojene za PCDD/PCDF i za zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova, provjera usklađenosti uzoraka bez frakcioniranja zahtijeva odgovarajuće cut-off vrijednosti za PCDD/PCDF-ove kod bioloških testova. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak dotičnog praga za pokretanje postupka može se koristiti kao cut-off vrijednost.

Nadalje, kod nekih bioanalitičkih metoda okvirna vrijednost izražena u BEQ može se navesti za uzorke unutar radnog raspona koji prelaze prag izvještavanja (vidjeti 7.1.1. i 7.1.6.).

7.1. Procjena odgovora na ispitivanje

7.1.1. Opći zahtjevi

- Kada se koncentracije izračunavaju iz kalibracijske krivulje za TCDD, vrijednosti na donjem i gornjem kraju krivulje pokazuju veliku razliku (visok koeficijent varijacije (CV)). Radni raspon je raspon u kojem je CV manji od 15%. Donji dio radnog raspona (prag izvještavanja) mora se dalje odrediti u znatno većoj mjeri (najmanje tri puta više) od postupka slijepe probe. Gornji dio radnog raspona obično predstavlja vrijednost EC₇₀ (70% najveće efikasne koncentracije), ali je niži ako je CV u tom rasponu veći od 15%. Radni raspon se određuje tokom validacije. Cut-off vrijednosti (7.3.) moraju biti dobro unutar radnog raspona.
- Standardni rastvori i izolati uzoraka ispituju se barem dvostrukom analizom. Kad se koriste dvostruke analize, standardni rastvori ili izolati kontrolnih uzoraka ispitani u 4 do 6 bunarića raspoređenih po pločici pokazuju odgovor ili koncentraciju (moguće samo u radnom rasponu) na osnovu CV < 15%.

7.1.2. Kalibracija

7.1.2.1. Kalibracija sa standardnom krivuljom

- Nivoi u uzorcima mogu se procijeniti poređenjem odgovora na ispitivanje s kalibracijskom krivuljom TCDD (ili PCB 126 ili standardna mješavina PCDD/PCDF-ova/dioksinu sličnih PCB-ova) za izračun BEQ vrijednosti u izolatu i kasnije u uzorku.
- Kalibracijska krivulja sadrži 8 do 12 koncentracija (barem dvostruko) s dovoljno koncentracija u donjem dijelu krivulje (radni raspon). Posebnu pažnju treba obratiti na kvalitet prilagođavanja krivulje u radnom rasponu. Tako R² vrijednost ima malu ili nikakvu korist u procjeni ispravnosti prilagođavanja pri nelinearnoj regresiji. Bolje prilagođavanje postići će se smanjivanjem razlike između izračunatih i primijećenih vrijednosti u radnom rasponu krivulje (npr. smanjivanjem zbira kvadrata rezidua).
- Procijenjena vrijednost u izolatu uzorka zatim se korigira za vrijednost BEQ, izračunatu za slijepi uzorak matrice/rastvarača (kako bi se uzele u obzir nečistoće iz upotrijebljenih rastvarača i hemikalija) i za očito iskorištenje (izračunato iz vrijednosti BEQ odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka). Za korekciju iskorištenja, očito iskorištenje mora uvijek biti unutar zahtijevanog raspona (vidjeti tačku 7.1.4.). Referentni uzorci koji se koriste za korekciju iskorištenja moraju biti usklađeni sa zahtjevima iz tačke 7.2.

7.1.2.2. Kalibracija s referentnim uzorcima

Druge mogućnosti je da se u blizini ciljnog nivoa upotrijebi kalibracijska krivulja pripremljena iz barem četiri referentna uzorka (vidjeti tačku 7.2.4.): jedna slijeпа matrica te tri referentna uzorka s 0,5x, 1,0x i 2,0x većom vrijednosti od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka) zbog čega korekcija vrijednosti slijepega proba i iskorištenja više nije potrebna. U ovom slučaju se može odgovor testa koji odgovara 2/3 najveće dopuštene količine (vidjeti 7.3.) izračunati neposredno iz tih uzoraka i upotrijebiti kao cut-off vrijednost. Za provjeru uzoraka koji prelaze pragove za pokretanje postupka, odgovarajući postotak praga za pokretanje postupka može odgovarati kao cut-off vrijednost.

7.1.3. Odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova

Izolati se mogu podijeliti u frakcije koje sadržavaju PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove omogućavajući odvojeno iskazivanje vrijednosti TEQ za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove (u BEQ). Po mogućnosti se koristi standardna kalibracijska krivulja PCB 126 za procjenu rezultata za frakciju koja sadrži dioksinu slične PCB-ove.

7.1.4. Očito iskorištenje pri biološkim testovima

"Očito iskorištenje pri biološkim testovima" izračunava se iz odgovarajućih referentnih uzoraka s reprezentativnim uzorcima kongenera u području oko najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka i izražava se kao postotak vrijednosti BEQ u poređenju s vrijednošću TEQ. Ovisno od vrste ispitivanja i upotrijebljenog ili upotrijebljenih TEF-ova⁽¹⁾, razlike između faktora TEF i REP za dioksinu slične PCB-ove mogu prouzrokovati manje očito iskorištenje za dioksinu slične PCB-ove u poređenju s PCDD/PCDF-om. Stoga ako se provodi odvojeno određivanje PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova, očito iskorištenje pri biološkim testovima iznosi: za dioksinu slične PCB-ove 25% do 60%, za PCDD/PCDF-ove od 50% do 130% (rasponi vrijede za kalibracijsku krivulju TCDD). Obzirom da doprinos dioksinu sličnih PCB-ova zbiru PCDD/PCDF-ova i

¹ Trenutni zahtjevi zasnivaju se na TEF vrijednostima objavljenima u: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241. (2006.).

dioksinu sličnih PCB-ova može varirati kod različitih matrica i uzoraka, očito iskorištenje pri biološkim testovima za parametar zbira odražava ove raspone koji iznose od 30% do 130%. Bilo koja implikacija bitno revidiranih vrijednosti TEF-a na važeće zakonodavstvo za PCDD/PCDF-ove i dioksinu slične PCB-ove zahtijeva reviziju ovih raspona.

7.1.5. Kontrola iskorištenja pri čišćenju

Gubitak spojeva tokom čišćenja provjerava se tokom validacije. Slijepa proba s dodatkom mješavine različitih kongenera se podvrgava čišćenju (najmanje $n = 3$), a iskorištenje i varijabilnost provjeravaju se potvrdnom analizom. Iskorištenje mora iznositi od 60% do 120% posebno za kongenere koji doprinose više od 10% vrijednosti TEQ u različitim mješavinama.

7.1.6. Prag izvještavanja

Za izvještavanje o vrijednostima BEQ, prag izvještavanja se određuje na osnovu odgovarajućih uzoraka matrica koji uključuju tipične uzorke kongenera, ali ne na osnovu kalibracijske krivulje standarda zbog niske preciznosti u donjem rasponu krivulje. Učinci ekstrakcije i čišćenja moraju se uzeti u obzir. Prag izvještavanja mora se odrediti značajno iznad postupka sa slijepim uzorcima (najmanje tri puta više).

7.2. Korištenje referentnih uzoraka

7.2.1. Referentni uzorci predstavljaju uzorke matrica, uzorke kongenera i raspone koncentracija za PCDD/PCDF i dioksinu slične PCB-ove oko najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.

7.2.2. Uz svaku seriju uzoraka koja se ispituje mora se uključiti jedna slijepa proba ili po mogućnosti slijepa matrica i jedan referentni uzorak s najvećom dopuštenom količinom ili na pragu za pokretanje postupka. Ovi uzorci se moraju ekstrahirati i analizirati istovremeno u istovjetnim uslovima. Referentni uzorak mora pokazati izrazito veći odgovor od slijepog uzorka, što osigurava ispravnost testa. Ti se uzorci mogu koristiti za korekciju slijepe probe i iskorištenja.

7.2.3. Referentni uzorci koji se odabiru za korekciju iskorištenja su reprezentativni za pokusne uzorke, što znači da uzorci kongenera ne uzrokuju preniske procjene vrijednosti.

7.2.4. Dodatnim referentnim uzorcima kojima su količine 0,5 i 2 puta veće od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka mogu se uključiti za dokazivanje ispravnosti ispitivanja u rasponu propisanih količina za kontrolu najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Ako se kombiniraju, ovi uzorci se mogu koristiti za izračun vrijednosti BEQ u pokusnim uzorcima (vidjeti tačku 7.1.2.2.).

7.3. Određivanje cut-off vrijednosti

Odnos između bioanalitičkih rezultata u BEQ i rezultati GC/HRMS u TEQ određuje se (npr. kalibracijskim pokusima u matrici, koji uključuju referentne uzorke s dodatkom 0, 0,5x, 1x i 2x najveća dopuštena količina (NDK) sa šest ponavljanja na svakom nivou ($n = 24$)). Faktori korekcije (slijepa proba i iskorištenje) mogu se procijeniti iz ovog odnosa, ali se moraju provjeravati u svakoj seriji ispitivanja u skladu s tačkom 7.2.2.

Cut-off vrijednosti određuju se za donošenje odluke o usklađenosti uzorka s najvećim dopuštenim količinama ili za kontrolu praga za pokretanje postupka, ako je relevantno, obzirom na dotičnu najveću dopuštenu količinu ili prag za pokretanje postupka određene posebno za PCDD/PCDF-ove i za dioksinu slične PCB-ove ili za zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova. Prikazuje ih donja krajnja tačka distribucije bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode na osnovu 95% nivoa pouzdanosti, što znači da je udio lažno usklađenih rezultata $< 5\%$ i na osnovu $RSD_R < 25\%$. Odlučujuća granica potvrdne metode najveća je dopuštena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost.

U praksi se cut-off vrijednost (u BEQ) može izračunati na sljedeći način (vidjeti sliku 1.).

7.3.1. Korištenje donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrdne metode:

$$\text{Cut-off vrijednost} = \text{BEQ}_{DL} - S_{y,x} \cdot t_{\alpha, f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

pri čemu je:

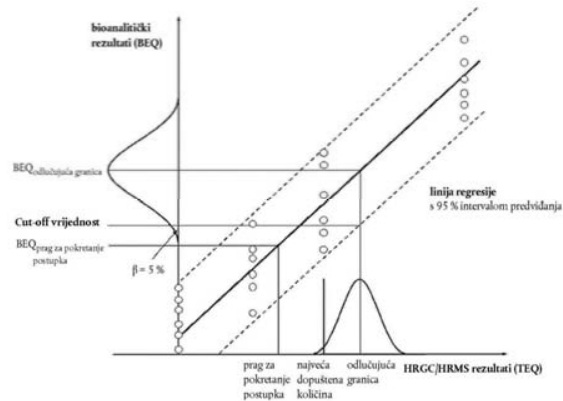
BEQ_{DL}	BEQ što odgovara odlučujućoj granici potvrdne metode, koja je najveća dopuštena količina uzimajući u obzir mjernu nesigurnost
$S_{y,x}$	standardna devijacija rezidua
$t_{\alpha, f=m-2}$	student faktor ($\alpha = 5\%$, $f =$ slobodni stepeni, jednostrani)
m	ukupan broj kalibracijskih tačaka (indeks j)
n	broj ponavljanja na svakom nivou
x_i	koncentracija uzorka (u TEQ) kalibracijske tačke i određena potvrdnom metodom
-	srednja vrijednost koncentracija (u TEQ) svih kalibriranih uzoraka
$Q_{xx} =$	$\frac{\sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2}{m-1}$
$Q_{xx} =$	parametar zbir kvadrata, $i =$ indeks za kalibracijsku tačku i

7.3.2. Izračun iz bioanalitičkih rezultata (korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode, kao donja krajnja tačka distribucije podataka pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti:

Cut-off vrijednost = $\text{BEQ}_{DL} - 1,64 \times \text{SD}_R$ pri čemu je:

SD_R standardna devijacija rezultata bioanalitičkih testova pri BEQ_{DL} , izmjereno u uslovima unutrašnje laboratorijske obnovljivosti

7.3.3. Izračun kao srednja vrijednost bioanalitičkih rezultata (u BEQ, korigirano za vrijednost slijepe probe i za iskorištenje) iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na 2/3 najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka. Ovo se zasniva na zapažanju da će se ta vrijednost kretati oko cut-off vrijednosti određene u tačkama 7.3.1. ili 7.3.2.



Slika 1.

Slika 1. Izračun cut-off vrijednosti na osnovu 95% nivoa pouzdanosti, što znači da je udio lažno usklađenih rezultata $< 5\%$ i na osnovu $RSD_R < 25\%$:

1. iz donjeg raspona 95% intervala predviđanja pri odlučujućoj granici potvrdne metode;
2. iz višestrukih analiza uzoraka ($n \geq 6$) kontaminiranih na odlučujućoj granici potvrdne metode kao donja krajnja tačka

distribucije (na slici prikazana s krivuljom u obliku zvona) pri odgovarajućoj srednjoj BEQ vrijednosti.

7.3.4. Ograničenja cut-off vrijednosti:

Cut-off vrijednosti na osnovu BEQ, izračunate iz RSD_R postignute tokom validacije koristeći ograničen broj uzoraka s različitim uzorcima matrice/kongenera mogu biti veće od najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka, na osnovu TEQ zbog veće preciznosti od one rutinski dobijene kada je potrebno kontrolirati nepoznati spektar mogućih uzoraka kongenera. U takvim se slučajevima cut-off vrijednosti izračunaju iz $RSD_R = 25\%$, ili se daje prednost dvjema trećinama najveće dopuštene količine ili praga za pokretanje postupka.

7.4. Karakteristike izvedivosti

7.4.1. Obzirom na to da se u bioanalitičkim metodama ne mogu koristiti unutrašnji standardi, moraju se provoditi ispitivanja ponovljivosti kako bi se dobili podaci o standardnoj devijaciji unutar i između serija ispitivanja. Ponovljivost mora biti manja od 20%, a interna laboratorijska obnovljivost manja od 25%. To se zasniva na nivoima izračunatih u BEQ nakon korekcije za vrijednost slijepe probe i za iskorištenja.

7.4.2. U postupku validacije potrebno je dokazati da test pravi razliku između slijepe probe i nivoa na cut-off vrijednosti omogućavajući identifikaciju uzoraka iznad odgovarajuće cut-off vrijednosti (vidjeti tačku 7.1.2.).

7.4.3. Moraju se utvrditi ciljni spojevi, moguće interferencije i najveće prihvatljive količine za slijepe probe.

7.4.4. Postotak standardne devijacije u odgovoru ili koncentraciji izračunat iz odgovora (moguće samo u radnom rasponu) pri trostrukom određivanju izolata uzorka ne smije biti iznad 15 %.

7.4.5. Nekorigirani rezultati referentnih uzoraka izraženi u BEQ (vrijednost slijepe probe i pri najvećoj dopuštenoj količini ili pragu za pokretanje postupka) koriste se za ocjenu izvedivosti bioanalitičke metode kroz kontinuirani vremenski period.

7.4.6. Dijagrami kontrole kvaliteta (QC) za postupke sa slijepim uzorcima i svaka vrsta referentnog uzorka bilježe se i provjeravaju kako bi se osiguralo da je izvedivost analiza usklađena sa zahtjevima, a posebno za postupak sa slijepim uzorcima u pogledu zahtijevane najmanje razlike do donjeg dijela radnog raspona i za referentne uzorke u pogledu unutar laboratorijske obnovljivosti. Postupke sa slijepim uzorcima potrebno je dobro kontrolirati kako bi se izbjegli lažno usklađeni rezultati kada se oduzimaju.

7.4.7. Rezultati analiza sumnjivih uzoraka dobijenih potvrdnim metodama i 2 do 10% usklađenih uzoraka (najmanje 20 uzoraka po matrici) sakuplja se i koristi za procjenu izvedivosti orijentacijske metode i odnosa između BEQ i TEQ. Ova baza podataka se može koristiti za ponovljenu evaluaciju cut-off vrijednosti koje se primjenjuju na rutinske uzorke za validirane matrice.

7.4.8. Uspješna izvedivost metode može se također dokazati prstenastim probama. Rezultati uzoraka analiziranih prstenastim probama koje uključuju raspon koncentracija od npr. 2x najveće dopuštene količine, mogu također biti uključeni u procjenu učestalosti lažno usklađenih rezultata, ako laboratorija može dokazati uspješnu izvedivost. Uzroci uključuju najčešće uzorke kongenera, koji predstavljaju različite izvore.

7.4.9. Tokom incidentata se mogu ponovo procijeniti cut-off vrijednosti uzimajući u obzir posebne uzorke matrica i kongenera koji se pojavljuju u tom incidentu.

8. Izvještavanje o rezultatima

8.1. Potvrdne metode

8.1.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCDD/PCDF-ova i kongenera dioksinu sličnih PCB-ova i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvještaju

uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

8.1.2. U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinu sličnih PCB-ova.

8.1.3. Iskorištenja pojedinih unutrašnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u tački 6.2.5., u slučaju da je dobijeni rezultat veći od najveće dopuštene količine (u tom slučaju iskorištenja za jednu ili dvije dvostruke analize), a u drugim slučajevima na zahtjev.

8.1.4. Obzirom da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usklađenosti uzorka, potrebno je navesti i taj parametar. Stoga se rezultati analize prikazuju kao $x \pm U$, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija nivo pouzdanosti od 95%. Određuju li se odvojeno PCDD/PCDF-i i dioksinu slični PCB-i, tada se zbir procijenjene proširene nesigurnosti za pojedinačne rezultate analiza PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova koristi za zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova.

8.1.5. Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CC α (kako je opisano u tački 2.2. Poglavlja I. ovog Dijela B), tada se mora navesti i taj parametar.

8.1.6. Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti barem na jednak broj decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine, kako je određeno u Pravilniku o nepoželjnim supstancama.

8.2. Bioanalitičke orijentacijske metode

8.2.1. Rezultat orijentacijske metode izražava se kao usklađen ili se za njega sumnja da je neusklađen ("sumnjiv").

8.2.2. Osim toga, rezultat za PCDD/PCDF-ove i/ili dioksinu slične PCB-ove može se izraziti u bioanalitičkim ekvivalentima (ne TEQ).

8.2.3. Za uzorke s odgovorom ispod granice izvještavanja navodi se da su "ispod granice izvještavanja".

8.2.4. Za svaku vrstu uzorka matrice u izvještaju se mora navesti najveća dopuštena količina ili prag za pokretanje postupka na kojoj se procjena zasniva.

8.2.5. U izvještaju se mora navesti vrsta ispitivanja koje se koristi, osnovno načelo ispitivanja i vrsta kalibracije.

8.2.6. U izvještaju je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCDD/PCDF-ova, dioksinu sličnih PCB-ova.

8.2.7. U slučaju uzoraka za koje se sumnja da nisu usklađeni, izvještaj treba uključivati napomenu o postupku koji treba poduzeti. Koncentracija PCDD/PCDF-ova i zbir PCDD/PCDF-ova i dioksinu sličnih PCB-ova u tim uzorcima s povišenim nivoima mora se odrediti/potvrditi potvrdnom metodom.

POGLAVLJE III.

Priprema uzorka i zahtjevi za metode analize koje se koriste u kontrolama količina PCB-ova koji nisu slični dioksinu (PCB # 28, 52, 101, 138, 153, 180)

1. Područje primjene

Zahtjevi postavljeni u ovom Prilogu primjenjuju se kada se hrana analizira za službenu kontrolu nivoa polihloriranih bifenila koji nisu slični dioksinu (PCB-ova koji nisu slični dioksinu) i za druge regulatorne svrhe.

2. Metode detekcije koje se koriste

Plinska kromatografija/detektor hvatanja elektrona (GC-ECD), GC-LRMS, GC-MS/MS, GC-HRMS ili istovjetne metode.

3. Identifikacija i potvrđivanje predmetnih analiza

3.1. Relativno retencijsko vrijeme u odnosu na interne standarde ili referentne standarde (prihvaćena devijacija od $\pm 0,25\%$).

3.2. Plinsko kromatografsko odvajanje svih šest indikatorskih PCB-ova (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138,

PCB 153 i PCB 180) od interferirajućih supstanci, posebno ko-eluiranih PCB-ova, a posebno ako su uzorci u rasponu zakonski dozvoljenih granica i neusklađenost se mora potvrditi.

[Kongeneri za koje je često ustanovljeno da ko-eluiraju su npr. PCB 28/31, PCB 52/69 i PCB 138/163/164. Za GC-MS moraju se uzeti u obzir i moguće interferencije fragmenata viših hloriranih kongenera.]

3.3. Zahtjevi za tehnike GC-MS

Monitoring najmanje:

- a) dva specifična iona za HRMS;
- b) dva specifična iona s m/z > 200 ili tri specifična iona s m/z > 100 za LRMS;
- c) 1 prekursor ion i 2 iona produkta za MS-MS.

Najveća dozvoljena odstupanja za odgovore odabranih masenih fragmenata:

Relativna devijacija intenziteta odabranih masenih fragmenata od teoretskog odgovora ili kalibracijski standard za ciljini ion (ion s najsnažnijim odgovorom koji se prati) i potvrdnih iona:

Relativni odgovor potvrdnih iona u odnosu na ciljini ion	GC-EI-MS (relativna devijacija)	GC-CI-MS,GC-MS ^a (relativna devijacija)
>50%	± 10%	± 20%
>20% do 50%	± 15%	± 25%
>10% do 20%	± 20%	± 30%
≤10%	± 50% ⁽¹⁾	± 50% ⁽¹⁾
(1) Zadovoljavajući broj masenih fragmenata s relativnim intenzitetom > 10% mora biti dostupan, zato upotreba potvrdnih iona s relativnim odgovorom manjim od 10% u poređenju s ciljnim ionom nije preporučljiva.		

3.4. Zahtjevi za tehnike GC-ECD

Potvrda rezultata koji prelaze dopušteno odstupanje s dva stupca GC sa stacionarnim fazama različitog polariteta.

4. Prikazivanje izvođenja metode

Validacija u području najveće dopuštene količine (0,5 do 2 puta više od najveće dopuštene količine) s prihvatljivim koeficijentom varijacije za ponovljene analize (vidjeti zahtjeve za srednju preciznost u tački 9.).

5. Granica kvantifikacije

Vrijednosti slijepe probe ne smiju biti veće od 30 % nivoa kontaminacije što odgovara najvećoj dopuštenoj količini ^{(1)*}.

6. Kontrola kvaliteta

Redovne slijepe probe, analize uzoraka s dodatkom, analize uzoraka za kontrolu kvaliteta, sudjelovanje u međulaboratorijskim studijama s različitim matricama uzoraka.

7. Kontrola iskorištenja

7.1.Korištenje primjerenih unutrašnjih standarda s fizikalno-hemijskim svojstvima koji odgovaraju predmetnim analitima.

7.2. Dodavanje unutrašnjih standarda: Dodavanje proizvoda (prije ekstrakcije i postupka čišćenja).

7.3. Zahtjevi za metode u kojima se koristi svih šest indikatorskih kongenera PCB-ova označenih izotopima:

- a) korekcija rezultata za iskorištenje unutrašnjih standarda;
- b) iskorištenje izotopski označenih unutrašnjih standarda je između 50 i 120%;
- c) prihvatljivo je manje ili veće iskorištenje za pojedinačne kongenere s manje od 10-postotnim doprinosom zbiru šest indikatorskih PCB-ova.

7.4. Zahtjevi za metode u kojima se ne koristi svih šest izotopski označenih unutrašnjih standarda ili se koriste drugi unutrašnji standardi:

- a) kontrola iskorištenja unutrašnjih standarda za svaki uzorak;
- b) prihvatljivo iskorištenje unutrašnjih standarda između 60 i 120%;
- c) korekcija rezultata u pogledu iskorištenja unutrašnjih standarda.

7.5.Iskorištenje neoznačenih kongenera provjerava se analizom uzoraka s dodatkom ili kontrolnih uzoraka s koncentracijama u rasponu najveće dopuštene količine. Prihvatljivo iskorištenje za te kongenere je između 70 i 120%.

8. Zahtjevi za laboratorije

U skladu s odredbama Pravilnika o službenim kontrolama, laboratorije akreditiraju priznate organe koji rade u skladu sa zahtjevima BAS EN ISO/IEC 17011 kako bi se osiguralo da primjenjuju analitičko osiguranje kvaliteta. Laboratorije se akreditiraju prema normi EN ISO/IEC 17025.

9. Karakteristike izvedivosti: kriteriji za zbir šest indikatorskih PCB-ova kod najveće dopuštene količine

Istinitost	- 30 to + 30%
Srednja preciznost (RSD %)	<20%
Razlika između izračuna gornje i donje granice	<20%

10. Izvještaj o rezultatima

10.1. U onoj mjeri u kojoj to analitički postupak dopušta, analitički rezultati moraju sadržavati količine pojedinačnih PCB kongenera i treba ih definirati kao donje, gornje ili srednje kako bi se u izvještaj uključilo što više podataka o rezultatima i na taj način omogućilo tumačenje rezultata prema posebnim zahtjevima.

10.2. U izvještaj je potrebno uključiti i metodu koja se koristi za ekstrakciju PCB-ova i masti.

10.3. Iskorištenja pojedinih unutrašnjih standarda moraju biti navedena u slučaju da su izvan raspona navedenog u tački 7., u slučaju da je dobijeni rezultat veći od najvećih dopuštenih količina, a u drugim slučajevima na zahtjev.

10.4. Obzirom na to da mjernu nesigurnost treba uzeti u obzir pri odluci o usklađenosti uzorka, taj je parametar također potrebno navesti. Stoga se rezultati analize prikazuju kao x +/- U, gdje je x rezultat analize, a U je proširena mjerna nesigurnost koristeći faktor pokrivanja 2, čime se dobija nivo pouzdanosti od 95%.

10.5. Ako se uzima u obzir mjerna nesigurnost primjenom CCα (kako je opisano u Dijelu B Poglavlju I. tački 2.1. ovog Priloga) tada se mora navesti i taj parametar.

10.6. Rezultati se moraju iskazati u istim mjernim jedinicama i zaokružiti najmanje na jednak broj decimalnih mjesta kao najveće dopuštene količine, kako je određeno u Pravilniku o nepoželjnim supstancama."

Član 5.

Prilog VI. mijenja se i glasi:

"PRILOG VI.
ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE
SASTOJAKA ŽIVOTINJSKOG PORIJEKLA ZA
SLUŽBENU KONTROLU HRANE ZA ŽIVOTINJE
1. CILJ I PODRUČJE PRIMJENE

Određivanje sastojaka životinjskog porijekla u hrani za životinje provodi se svjetlosnom mikroskopijom ili lančanom reakcijom polimeraze (PCR) u skladu s odredbama iz ovog Priloga.

Ove dvije metode omogućavaju otkrivanje prisutnosti sastojaka životinjskog porijekla u krmivima i krmnim smjesama. Međutim, one ne omogućavaju izračun količine takvih sastojaka u krmivima i krmnim smjesama. Obje metode imaju granicu detekcije ispod 0,1% (m/m).

PCR metoda omogućava određivanje taksonomske grupe sastojaka životinjskog porijekla prisutnih u krmivima i krmnim smjesama.

¹ Izrazito se preporučuje niži doprinos nivoa reagensa u slijepoj probi od nivoa kontaminanta u uzorku. Laboratorija je odgovorna kontrolirati varijaciju nivoa vrijednosti slijepih proba, posebno ako su te vrijednosti oduzete.

U ove metode primjenjuju se pri kontroli provedbe zabrana iz člana 9. stav 1. i Priloga IV. Pravilnika kojim se utvrđuju mjere za sprječavanje, kontrolu i iskorjenjivanje transmisivnih spongiformnih encefalopatija ("Službeni glasnik BiH", br. 25/11, 20/13 i 70/14) i iz člana 13. stav 1. Odluke o nusproizvodima životinjskog porijekla i njihovim proizvodima koji nisu namijenjeni ishrani ljudi ("Službeni glasnik BiH", broj 19/11).

Ovisno od vrste hrane za životinje koja se ispituje, ove metode se mogu koristiti u okviru jednog jedinstvenog operativnog protokola, bilo samostalno ili zajedno, u skladu sa standardnim operativnim postupcima (SOP) koje je uspostavila referentna laboratorija EU za životinjske bjelančevine u hrani za životinje (EURL-AP) i objavila na svojim internet stranicama¹.

2. METODE

2.1. Svjetlosna mikroskopija

2.1.1. Načelo

Sastojci životinjskog porijekla koji mogu biti prisutni u krmivima i krmnim smjesama koji se šalju na analizu, identificiraju se na osnovu tipičnih i mikroskopski prepoznatljivih karakteristika, kao što su mišićna vlakna i ostali dijelovi mesa, hrskavica, kosti, rogovi, dlaka, čekinje, krv, perje, ljuske jaja, riblje kosti i ljuske.

2.1.2. Reagensi i oprema

2.1.2.1. Reagensi

2.1.2.1.1. Sredstvo za koncentriranje

2.1.2.1.1.1. Tetrahloretilen (gustoća 1,62)

2.1.2.1.2. Reagens za bojenje

2.1.2.1.2.1. Alizarin crvenilo (otopi se 2,5 ml 1M hloridne kiseline u 100 ml vode i tom se rastvoru doda 200 mg alizarin crvenila)

2.1.2.1.3. Sredstva za pripremu preparata

2.1.2.1.3.1. Lužina (NaOH 2,5 % w/v ili KOH 2,5% w/v)

2.1.2.1.3.2. Glicerol (nerazrijeđen, viskozitet: 1 490 cP)

2.1.2.1.3.3. Norland® Optical Adhesive 65 (viskoznost: 1.200 cP) ili smola sa istovjetnim svojstvima za pripremu trajnih preparata

2.1.2.1.4. Sredstva za pripremu preparata s osobinama bojenja

2.1.2.1.4.1. Lugolov rastvor (otopi se 2 g kalijevog jodida u 100 ml vode, zatim se uz često mućkanje doda 1 g joda)

2.1.2.1.4.2. Cistinski reagens (2 g olovnog acetata, 10 g NaOH/100 ml vode)

2.1.2.1.4.3. Fehlingov reagens (pripremi se prije upotrebe od jednakih dijelova (1/1) osnovnih rastvora A i B. Rastvor A: 6,9 g bakrova (II) sulfata pentahidrata otopi se u 100 ml vode. Rastvor B: 34,6 g kalij-natrijevog tartarata tetrahidrata i 12 g NaOH otopi se u 100 ml vode)

2.1.2.1.4.4. Tetrametilbenzidin/vodikov peroksid (otopi se 1 g 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB) u 100 ml ledene ocatne kiseline i 150 ml vode. Prije upotrebe izmiješaju se četiri dijela te TMB rastvora s jednim dijelom 3% vodikovoga peroksida)

2.1.2.1.5. Sredstva za ispiranje

2.1.2.1.5.1. Etanol ≥ 96% (tehnički čist)

2.1.2.1.5.2. Aceton (tehnički čist)

2.1.2.1.6. Reagens za izbjeljivanje

2.1.2.1.6.1. Komerijalni rastvor natrijevog hipohlorita (9–14% aktivnog hlora)

2.1.2.2. Oprema

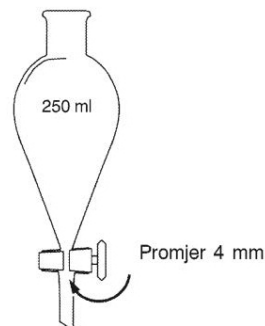
2.1.2.2.1. Analitička vaga s preciznošću od 0,001 g

2.1.2.2.2. Pribor za mljevenje: mlin - ili mužar

2.1.2.2.3. Sito s mrežicom kvadratnih očica širine 0,25 mm i 1 mm

2.1.2.2.4. Konusni stakleni lijevak za odjeljivanje 250 ml s teflonskim čepom ili čepom od brušenog stakla na dnu konusa. Prečnik otvora čepa mora biti ≥ 4mm. Umjesto toga se može upotrijebiti čaša s konusnim dnom za taloženje pod uslovom da je laboratorija dokazala da su granice detekcije istovjetne onima kada se koristi konusni stakleni lijevak za odjeljivanje.

Lijevak za odjeljivanje



2.1.2.2.5. Stereomikroskop koji obuhvaća barem konačni obim povećanja od 6,5 x do 40 x

2.1.2.2.6. Sastavljeni mikroskop koji obuhvata barem konačni obim povećanja od 100 x do 400 x s poljem za propušteno svjetlo. Mogu se dodatno koristiti polarizirano svjetlo i diferencijalni interferentni kontrast.

2.1.2.2.7. Standardno laboratorijsko posuđe od stakla

2.1.2.2.8. Oprema za pripremu preparata: klasična mikroskopska stakalca, stakalca s udubinom, pokrovna stakalca (20 x 20 mm), pinceta, fina lopatica

2.1.3. Uzorkovanje i priprema uzoraka

2.1.3.1. Uzorkovanje

Koristi se reprezentativan uzorak koji je uzet u skladu s odredbama iz Priloga I. ovog Pravilnika.

2.1.3.2. Mjere predostrožnosti

Kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija u laboratoriji, svu laboratorijsku opremu za višekratnu upotrebu potrebno je pažljivo očistiti prije upotrebe. Dijelove lijevka za odjeljivanje potrebno je prije čišćenja rastaviti. Dijelove lijevka za odjeljivanje i posuđe od stakla potrebno je prethodno oprati ručno, a zatim oprati u perilici posuda. Sita se moraju očistiti četkom s tvrdim sintetičkim dlačicama. Preporučuje se završno čišćenje sita acetonom i komprimiranim vazduhom nakon prosijavanja masnog materijala, kao što je riblje brašno.

2.1.3.3. Priprema uzoraka osim masti i ulja

2.1.3.3.1. Sušenje uzorka: uzorci sa sadržajem vlage > 14% moraju se osušiti prije rukovanja.

2.1.3.3.2. Prethodno prosijavanje uzorka: preporučuje se da se hrana za životinje u peletima i zrnju prethodno prosije na 1 mm, a zatim se dobijene frakcije analiziraju kao odvojeni uzorci.

2.1.3.3.3. Razdioba uzorka u poduzorke i mljevenje: barem 50 g uzorka se razdjeli na poduzorke za analizu, koji se zatim melju.

2.1.3.3.4. Ekstrakcija i priprema taloga: prenese se dio od 10 g (s preciznošću od 0,01 g) samljevenog poduzorka u lijevak za odjeljivanje ili čašu s konusnim dnom za taloženje i doda se 50 ml tetrahloretilena. Dio koji je prenesen u lijevak mora se ograničiti na 3 g u slučaju ribljeg brašna ili drugih čistih proizvoda životinjskog porijekla, mineralnih sastojaka ili premiksa koji proizvode više od 10% taloga. Mješavinu je potrebno snažno protresti tokom najmanje 30 s i mora se oprezno dodati najmanje još 50 ml tetrahloretilena, kako bi se isprale unutrašnje stijenke lijevka i uklonile sve prijanjajuće čestice. Tako dobijena mješavina se ostavi da stoji najmanje 5 minuta prije odvajanja taloga otvaranjem čepa.

¹ <http://eurl.craw.eu/>

Ako se koristi čaša s konusnim dnom za taloženje, mješavinu je potrebno snažno miješati najmanje 15 s, a sve prijanjajuće čestice uz stijenke čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutrašnju površinu s najmanje 10 ml čistog tetrahloretilena. Mješavinu je potrebno ostaviti da stoji tokom 3 minute i zatim ponovo promiješati tokom 15 s, a sve čestice koje prijanjaju uz stijenke čaše potrebno je pažljivo isprati niz unutrašnju površinu s najmanje 10 ml čistog tetrahloretilena. Tako dobijena mješavina se ostavi da stoji najmanje 5 minuta, zatim se tekuća frakcija odstrani i ukloni pažljivim dekantiranjem, vodeći računa da se ni malo taloga ne izgubi.

Talog se osuši i zatim izvaga (s preciznošću od 0,001 g). Ako više od 5% taloga sadrži čestice > 0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobijene frakcije se ispituju.

2.1.3.3.5. Ekstrakcija i priprema flotata: nakon dobijanja taloga gore opisanom metodom, u lijevku za odvajanje moraju ostati dvije faze: tekuća, koja se sastoji od tetrahloretilena i čvrsta koja se sastoji od plivajućeg materijala. Ta čvrsta faza je flotat koji se izolira tako da se tetrahloretilen u cjelosti odlije iz lijevka otvaranjem čepa. Okretanjem lijevka za odvajanje, flotat se prenese u veliku Petrijevju zdjelicu i posuši na zraku u digestoru. Ako se više od 5% flotata sastoji od čestica > 0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobijene frakcije se ispituju.

2.1.3.3.6. Priprema sirovine: pripremi se dio od najmanje 5 g samljevenog poduzorka. Ako se više od 5% sirovine sastoji od čestica > 0,50 mm, mora se prosijati kroz sito 0,25 mm i dvije dobijene frakcije se ispituju.

2.1.3.4. Priprema uzoraka koji se sastoje od masti i ulja

Potrebno je sljedeći sljedeći protokol za pripremu uzoraka koji se sastoje od masti i ulja:

- ako je mast u čvrstom stanju, zagrijava se u pećnici dok ne postane tekuća,
- koristeći pipetu se prenese 40 ml masti ili ulja s dna uzorka u epruvetu za centrifugiranje,
- centrifugira se 10 minuta na 4 000 okr./min,
- ako se mast stvrdnula nakon centrifugiranja, zagrijava se u pećnici dok ne postane tekuća,
- ponovo se centrifugira 5 minuta na 4 000 okr./min,
- malom kašikom ili spatulom se prenese polovina dekantirane nečistoće na mikroskopsko stakalce za identifikaciju. Kao sredstvo za pripremu preparata preporučuje se glicerol,
- preostala nečistoća koristi se za pripremu taloga kako je opisano u tački 2.1.3.3.

2.1.3.5. Upotreba reagensa za bojenje

Kako bi se olakšala pravilna identifikacija sastojaka životinjskog porijekla, subjekt može koristiti reagense za bojenje tokom pripreme uzorka u skladu sa smjernicama koje je izdao EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

Ako se koristi rastvor Alizarin crvenila za bojenje taloga primjenjuje se sljedeći protokol:

- osušeni talog se prenese u staklenu epruvetu i dvaput ispere s približno 5 ml etanola (svaki put se koristi vrtložna mješalica tokom 30 s, a rastvarač se ostavi da stoji približno 1 minutu i 30 s i zatim odlije),
- talog se izbije dodavanjem najmanje 1 ml rastvora natrijevog hipohlorita. Reakcija se razvija 10 min. Epruveta se napuni vodom, talog se ostavi da stoji 2-3 minute, a voda i suspendirane čestice se pažljivo odliju,
- talog se dvaput ispere s 10 ml vode (koristi se vrtložna mješalica u trajanju 30 s, ostavi se da se istaloži i svaki se put odlije voda),

- dodaje se 2 do 10 kapi rastvora Alizarin crvenila i smjesa se promućka u vrtložnoj mješalici. Trajanje reakcije je 30 sekundi i obojeni talog se dvaput ispere s približno 5 ml etanola, zatim jedanput acetonom (svaki put se koristi vrtložna mješalica 30 s, a rastvarač se ostavi da stoji približno 1 minutu i zatim odlije),
- obojeni talog se osuši.

2.1.4. Mikroskopski pregled

2.1.4.1. Priprema preparata

Mikroskopski preparat se priprema od taloga i, ovisno od odabira subjekta, od flotata ili sirovine. Ako se tokom pripreme preparata koristilo prosijavanje, pripremaju se obje dobijene frakcije (fina i gruba). Pokusni dijelovi frakcija, nanесeni na stakalce reprezentativni su za čitavu frakciju.

Potrebno je pripremiti dovoljan broj preparata kako bi se osigurala provedba čitavog ispitnog protokola, koji je utvrđen u tački 2.1.4.2.

Mikroskopski preparati se pripremaju s odgovarajućim sredstvom za pripremu u skladu sa SOP-u koju je EURL-AP utvrdio i objavio na svojoj internet stranici. Preparate je potrebno pokriti pokrovnim stakalcima.

2.1.4.2. Protokol pregleda za otkrivanje životinjskih čestica u krmnim smjesama i krmivima

Pripremljeni mikroskopski preparati se pregledavaju u skladu s protokolima pregleda propisanim u dijagramu 1 za krmne smjese i krmiva osim za čisto riblje brašno ili u dijagramu 2 za čisto riblje brašno.

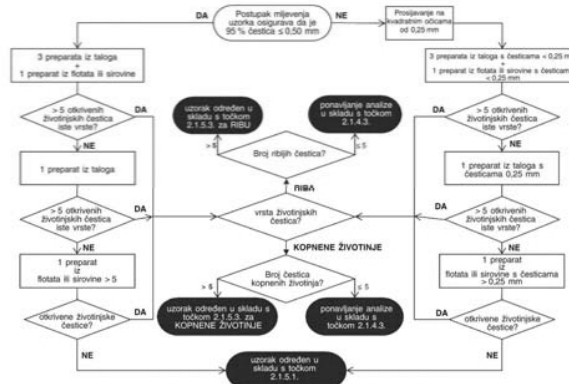
Mikroskopski pregledi će se provesti koristeći sastavljeni mikroskop na talogu i ovisno od odabira subjekta, na flotatu ili na sirovini. Uz sastavljeni mikroskop može se koristiti i stereomikroskop za grube frakcije. Svaki preparat se u potpunosti pregledava pod različitim povećanjima.

Minimalni broj preparata koji se moraju pregledati tokom svakog koraka protokola pregleda mora se striktno poštovati, osim ako nije moguće korištenjem čitavog materijala iz frakcije postići utvrđeni broj preparata. Pri svakom određivanju pregledava se najviše 6 preparata.

Za lakšu identifikaciju vrste i porijekla čestica subjekt može koristiti podupiruće alate kao što su sistemi za potporu pri odlučivanju, slikovne biblioteke i referentne uzorke.

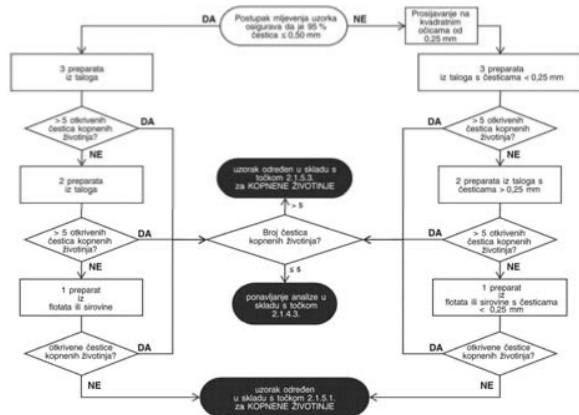
Dijagram 1.

Protokol pregleda za otkrivanje životinjskih čestica u krmnim smjesama i krmivima osim ribljeg brašna



Dijagram 2.

Protokol pregleda za otkrivanje životinjskih čestica u ribljem brašnu



2.1.4.3. Broj određivanja

Ako nakon prvog određivanja provedenog u skladu s protokolom pregleda propisanog u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2, nije otkrivena ni jedna životinjska čestica datog porijekla (tj. od kopnenih životinja ili ribe), nije potrebno dodatno određivanje, a o rezultatu analize je potrebno izvijestiti korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.1.

Ako nakon prvog određivanja provedenog u skladu s protokolom pregleda propisanog u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2, ukupan broj otkrivenih životinjskih čestica datog porijekla (tj. od kopnenih životinja ili ribe), iznosi od 1 do 5, provodi se drugo određivanje na poduzorku od 50 g. Ako nakon drugog utvrđivanja ukupan broj otkrivenih životinjskih čestica datog porijekla iznosi od 0 do 5, o rezultatima analize je potrebno izvijestiti korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.2., ili se provodi treće određivanje na novom poduzorku od 50 g. Ipak, ako je nakon prvog i drugog određivanja zbir otkrivenih čestica datog porijekla veći od 15, dodatno određivanje nije potrebno, a o rezultatima analize je potrebno direktno izvijestiti korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.3. Ako je nakon trećeg određivanja zbir otkrivenih životinjskih čestica datog porijekla veći od 15, o rezultatima analize potrebno je izvijestiti korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.3. Inače, o rezultatima analize je potrebno izvijestiti korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.2.

Ako je nakon prvog određivanja provedenog u skladu s protokolima pregleda propisanim u dijagramu 1 odnosno u dijagramu 2, otkriveno više od 5 životinjskih čestica datog porijekla (tj. od kopnenih životinja ili ribe), o rezultatima analize potrebno je izvijestiti korištenjem terminologije iz tačke 2.1.5.3.

2.1.5. Prikaz rezultata

Pri izvještavanju o rezultatima, laboratorija mora navesti na kojoj vrsti materijala je provedena analiza (talog, flotatu ili sirovina) i koliko je određivanja provedeno.

Laboratorijski izvještaj mora sadržavati barem informacije o prisutstvu sastojaka porijeklom od kopnenih životinja ili ribe.

O različitim slučajevima se izvještava na sljedeće načine.

2.1.5.1. Nije otkrivena nijedna životinjska čestica datog porijekla:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica porijeklom od kopnenih životinja,
- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, u dostavljenom uzorku nije utvrđena prisutnost čestica porijeklom od ribe.

2.1.5.2. Prosječno je otkriveno između 1 i 5 životinjskih čestica datog porijekla:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, prosječno nije otkriveno više od 5 čestica porijeklom od kopnenih životinja u dostavljenom uzorku. Čestice su identificirane kao... [kosti, hrskavica, mišić, dlaka, rogov...]. Ovaj nizak nivo prisutnosti, koji je ispod granice detekcije mikroskopskom metodom, znači da se ne može isključiti rizik od lažno pozitivnog rezultata.

Ili, ako je primjereno,

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, prosječno nije otkriveno više od 5 čestica porijeklom od ribe u dostavljenom uzorku. Čestice su identificirane kao... [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge...]. Ovaj nizak nivo prisutnosti, koji je ispod granice detekcije mikroskopskom metodom znači da se ne može isključiti rizik od lažno pozitivnog rezultata.

U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvještaju mora biti navedeno u kojoj frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) su bile otkrivene životinjske čestice, jer otkrivanje životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolišnog zagađenja.

2.1.5.3. Prosječno je otkriveno više od 5 životinjskih čestica datog porijekla:

- koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom prosječno je otkriveno više od 5 čestica porijeklom od kopnenih životinja u dostavljenom uzorku. Čestice su identificirane kao... [kosti, hrskavica, mišići, dlaka, rogov...].

Ili, ako je primjereno,

koliko je moguće utvrditi iz pregleda svjetlosnim mikroskopom, prosječno je otkriveno više od 5 čestica porijeklom od ribe u dostavljenom uzorku. Čestice su identificirane kao... [riblje kosti, riblje ljuske, hrskavica, mišić, otolit, škrge...].

U slučaju prethodnog prosijavanja uzorka, u laboratorijskom izvještaju mora biti navedeno u kojoj frakciji (prosijana frakcija, peletirana frakcija ili zrna) su bile otkrivene životinjske čestice, jer otkrivanje životinjskih čestica samo u prosijanoj frakciji može biti znak okolišnog zagađenja.

2.2. PCR

2.2.1. Načelo

Fragmenti dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) životinjskog porijekla, koji mogu biti prisutni u krmivima i krmnim smjesama, otkrivaju se tehnikom genskog umnožavanja putem PCR-a, koja cilja DNK sekvence značajne za vrstu.

PCR metoda zahtijeva najprije ekstrakciju DNK. Umnožavanje se vrši kasnije na tako dobijenom DNK ekstraktu, kako bi se otkrila ciljani životinjska vrsta.

2.2.2. Reagensi i oprema

2.2.2.1. Reagensi

2.2.2.1.1. Reagensi za ekstrakciju DNK-a

Upotrebljavaju se samo reagensi koje je odobrio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

2.2.2.1.2. Reagensi za umnožavanje genskog materijala

2.2.2.1.2.1. Početnice i sonde

Upotrebljavaju se samo početnice i sonde sa sekvencama oligonukleotida koje je validirao EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.⁽¹⁾

2.2.2.1.2.2. Glavna mješavina (Master mix)

¹ Popis ovih početnica i sondi za svaku ciljani životinjsku vrstu dostupan je na internet stranici EURL-AP-a.

Upotrebljavaju se samo rastvori glavne mješavine koje ne sadrže reagense koji bi mogli prouzrokovati lažne rezultate zbog prisustva životinjskog DNK-a⁽¹⁾.

2.2.2.1.2.3. Reagensi za dekontaminaciju

2.2.2.1.2.3.1. Rastvor hloridne kiseline (0,1 N)

2.2.2.1.2.3.2. Izbjeljivač (rastvor natrijevog hipohlorita sa 0,15 % aktivnog hlora)

2.2.2.1.2.3.3. Nehrđajući reagensi za dekontaminaciju skupih uređaja kao što su analitičke vage (npr. DNA Erase™ proizvođača MP Biomedicals)

2.2.2.2. Oprema

2.2.2.2.1. Analitička vaga s preciznošću od 0,001 g

2.2.2.2.2. Pribor za mljevenje

2.2.2.2.3. Uređaj za PCR (Thermocycler) koji omogućava PCR u stvarnom vremenu

2.2.2.2.4. Mikrocentrifuga za mikroevrupete

2.2.2.2.5. Komplet mikropipeta koje omogućavaju pipetiranje od 1 µl do 1 000 µl

2.2.2.2.6. Standardna plastična oprema za molekularnu biologiju: mikroeprovete za mikrocentrifugu, plastični nastavci s filterima za mikropipete, odgovarajuće pločice za uređaj za PCR (thermocycler).

2.2.2.2.7. Hladnjaci za skladištenje uzoraka i reagensa

2.2.3. *Uzorkovanje i priprema uzoraka*

2.2.3.1. Uzorkovanje

Koristi se reprezentativan uzorak, uzet u skladu s odredbama iz Priloga I. ovog Pravilnika.

2.2.3.2. Priprema uzorka

Pri pripremi laboratorijskih uzoraka do ekstrakcije DNK potrebno je poštovati zahtjeve iz Priloga II. ovog Pravilnika. Od najmanje 50 g uzorka se napravi poduzorak za analizu koji se zatim samelje.

Priprema uzorka mora se provesti u drugom prostoru od onih koji se koriste za ekstrakciju DNK-a i umnožavanje genskog materijala u skladu sa standardom ISO 24276.

Pripremaju se dva testna uzorka od najmanje 100 mg svaki.

2.2.4. Ekstrakcija DNK-a

Ekstrakcija DNK-a provodi se na svakom pripremljenom testnom koristeći SOP koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

Za svaku seriju ekstrakcije DNK-a pripremaju se dva kontrolna uzorka, kako je opisano u ISO standardu 24276:

- slijepi kontrolni uzorak ekstrakcije,
- pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a.

2.2.5. *Umnožavanje genskog materijala*

Genski materijal se umnožava koristeći metode validirane za svaku vrstu koja zahtijeva identifikaciju. Te metode su propisane u SOP koju je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici. Svaki ekstrakt DNK-a se analizira u najmanje dva različita stepena razrjeđenja, kako bi se ocijenila inhibicija.

Za svaku ciljanu vrstu pripremaju se dva kontrolna uzorka koja se umnažaju, kako je opisano u ISO standardu 24276:

- pozitivni kontrolni uzorak s ciljanim DNK-om se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR,
- kontrolni uzorak reagensa za umnožavanje (zove se također kontrolni uzorak bez matrice) se upotrijebi za svaku pločicu ili seriju analiza PCR.

2.2.6. *Tumačenje i prikaz rezultata*

U izvještaju o rezultatima, laboratorija mora navesti najmanje masu upotrijebljenog testnog uzorka, korištene tehnike za ekstrakciju, broj provedenih određivanja i granicu detekcije metode.

¹ Primjeri glavnih mješavina koje su funkcionalne dostupni su na internet stranici EURL-AP-a.

Rezultati se ne smiju tumačiti i saopćavati ako pozitivni kontrolni uzorak ekstrakcije DNK-a i pozitivni kontrolni uzorak s ciljnim DNK-om ne omogućavaju određivanje ciljane vrste pri analizi, dok je rezultat kontrolnog uzorka reagensa za umnožavanje negativan.

U slučaju da rezultati dva testna uzoraka nisu dosljedna, potrebno je ponoviti barem korak genskog umnožavanja. Ako laboratorija sumnja da razlog za neusklađenost mogu biti ekstrakti DNK-a, provodi se nova ekstrakcija DNK-a i umnažanje genetskog materijala prije tumačenja rezultata.

Konačni prikaz rezultata mora se zasnivati na integraciji i tumačenju rezultata dva testna uzorka u skladu sa SOP-om koji je uspostavio EURL-AP i objavio na svojoj internet stranici.

2.2.6.1. Negativni rezultat

O negativnom rezultatu se izvještava na sljedeći način:

U dostavljenom uzorku nije bio otkriven ni jedan DNK iz X (X je životinjska vrsta ili grupa životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).

2.2.6.2. Pozitivni rezultat

O pozitivnom rezultatu se izvještava na sljedeći način:

DNK iz X je otkriven u dostavljenom uzorku (X je životinjska vrsta ili grupa životinjskih vrsta koja je predmet ispitivanja).".

Član 6.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH".

VM broj 278/15
19. novembra 2015. godine
Sarajevo

Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Dr. **Denis Zvizdić**, s. r.