



PT_s dell'EURL-FA: partecipazione dei laboratori italiani per il controllo ufficiale nell'anno 2019

*Cinzia Civitareale &
Maurizio Fiori*

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria





EURL-FA Control (*Institute for Reference Materials and Measurements Joint Research Centre, Geel, Belgio*)

...

PTs - Anno 2019

2 conclusi; 1 in corso



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



2019 – PTs organizzati dall'EURL-FA Control



2° Proficiency Test - round **"FAC-19/1"** on the
"Determination of the mass fraction of **authorised
carotenoids** in compound feed"



5° Proficiency Test - round **"FAC-19/2"** on the
"Determination of the mass fraction of **authorised
coccidiostats** in compound feed"

2019 – partecipazione dei laboratori nazionali



"Determination of the mass fraction of authorised carotenoids in compound feed"



ICQRF- lab Modena

"According to Regulation (EC) No 2017/625 it is your duty as NRL to participate in PTs organised by the EURL-FA Control if you hold a mandate for this type of matrix or to mandate a laboratory to represent you in the exercise."



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



2019 – partecipazione dei laboratori nazionali



*"Determination of
the mass fraction of
authorised
coccidiostats in
compound feed"*

*Invito 4 aprile, invio campioni 22
maggio, scadenza invio risultati
21 giugno*



ISS (Roma) – **LNR**
IZS PLVA (Torino) – **LNR**



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



2019 - *Determination of the mass fraction of authorised coccidiostats in compound feed*



L'EURL ha consentito la partecipazione anche ai laboratori del controllo ufficiale $\neq$ da LNR

2019 - *Determination of the mass fraction of authorised coccidiostats in compound feed*

Laboratori partecipanti

Organisation	Country
AGES	AUSTRIA
FAVV	BELGIUM
Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture - ÚKZÚZ	CZECH REPUBLIC
Danish Veterinary and Food Administration	DENMARK
Finnish Food Authority	FINLAND
Service commun des laboratoires - Laboratoire de Rennes	FRANCE
TLLLR Jena	GERMANY
German Federal Institute for Risk Assessment	GERMANY
National Food Chain Safety Office	HUNGARY
The State Laboratory	IRELAND
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE PLVA	ITALY
Istituto Superiore di Sanità	ITALY
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE UMBRIA E MARCHE	ITALY
Istituto Zooprofilattico Lombardia ed E.R.	ITALY
Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana	ITALY
Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR	LATVIA
Wageningen Food Safety Research (WFSR),	NETHERLANDS
National Veterinary Research Institute	POLAND
INIAV, IP	PORTUGAL
University of Ljubljana, Veterinary Faculty, National Veterinary Institute	SLOVENIA
Laboratori Agroalimentari	SPAIN
SVA, National Veterinary Institute	SWEDEN
LGC Ltd	UNITED KINGDOM
Public Analyst Scientific Services Ltd	UNITED KINGDOM



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



2019 - Scopo

Determinare

 la concentrazione del diclazuril (autorizzato e carry-over) nei campioni di mangime per polli N. 1 e 2

 la concentrazione del narasin e nicarbazina nel campione di mangime per polli N. 3

Come procedere

-  Scegliere il metodo utilizzato nel controllo ufficiale e indicarne le caratteristiche
-  Riportare il risultato (mg kg^{-1}) come media di due o più determinazioni indipendenti (x_i)
-  Riportare e correggere il risultato per l'umidità (in % w/w) se $\neq$ dal 12%
-  Associare ai risultati l'incertezza estesa ($U(x_i)$) indicando il fattore di copertura (k); indicare se conforme o meno



NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Ai partecipanti viene richiesto di valutare la conformità dei mangimi analizzati tenendo presente i livelli di riferimento stabiliti nei regolamenti comunitari

NORMATIVA DI RIFERIMENTO



DICLAZURIL

AUTORIZZATO come additivo
Clinacox 0,5%®

Commission Implementing Regulation (EU) No 667/2013 concerning the authorisation of diclazuril as a feed additive for chickens reared for laying.

Autorizzato anche per polli ingrasso, tacchini e faraone.



NARASIN/NICARBAZINA

AUTORIZZATO come additivo
Maxiban G160®

Commission Regulation (EU) No 885/2010 concerning the authorisation of the preparation of narasin and nicarbazin as a feed additive for chickens for fattening and amending Regulation (EC) No 2430/1999.



DICLAZURIL

Cross-contaminazione

Commission Regulation (EU) No 574/2011 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, Ambrosia spp. and carry-over of certain coccidiostats.

NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Clinacox 0,5%® - Diclazur

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 667/2013 DELLA COMMISSIONE
del 12 luglio 2013

relativo all'autorizzazione del preparato diclazuril come additivo per mangimi destinati a pollastre allevate per la produzione di uova (titolare dell'autorizzazione Eli Lilly and Company Ltd.) e che modifica il regolamento (CE) n. 162/2003

Numero di identificazione dell'additivo	Nome del titolare dell'autorizzazione	Additivo (denominazione commerciale)	Composizione, formula chimica, descrizione, metodo di analisi	Specie o categoria di animali	Età massima	Tenore minimo	Tenore massimo	Altre disposizioni	Fine del periodo di autorizzazione	Limiti massimi per i residui (LMR) negli alimenti pertinenti di origine animale
						mg di sostanza attiva/kg di mangime completo con un tenore d'umidità del 12 %				
Coccidiostatici e istomonostatici										
51771	Eli Lilly and Company Ltd	Diclazuril 0,5 g/100 g (Clinacox 0,5 %)	Composizione dell'additivo Diclazuril: 0,50 g/100 g Farina di soia povera di proteine: 99,25 g/100 g	Pollastre allevate per la produzione di uova	16 settimane	1	1	1. L'additivo va incorporato nei mangimi composti sotto forma di premiscela. 2. Il diclazuril non va mescolato con altri coccidiostatici.	2 agosto 2023	Regolamento (UE) n. 37/2010 ⁽¹⁾ della Commissione



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Maxiban G160® - Narasin/Nicarbazina

REGOLAMENTO (UE) N. 885/2010 DELLA COMMISSIONE

del 7 ottobre 2010

relativo all'autorizzazione del preparato di narasin e nicarbazina come additivo dei mangimi per polli da ingrasso (titolare dell'autorizzazione Eli Lilly and Company Ltd), che modifica il regolamento (CE) n. 2430/1999

Numero di identificazione dell'additivo	Nome del titolare dell'autorizzazione	Additivo	Composizione, formula chimica, descrizione, metodo analitico	Specie animale o categoria di animali	Età massima	Tenore minimo	Tenore massimo	Altre disposizioni	Scadenza dell'autorizzazione	Limiti massimi di residui (LMR) negli alimenti di origine animale interessati
						mg di sostanza attiva/kg di mangime completo con un tenore d'umidità del 12 %				
Coccidiostatici e istomonostatici										
5 1.772	Eli Lilly and Company Ltd	Narasin: 80 g attività/kg Nicarbazin: 80 g/kg (Maxiban G160)	Composizione dell'additivo Narasin: 80 g attività/kg Nicarbazin: 80 g/kg (Rapporto 1:1) Olio vegetale o minerale: 10-30 g/kg Vermiculite: 0-20 g/kg Microtracciante rosso: 11 g/kg Semola di pannocchia di granturco o di pula di riso qb a 1 kg	Polli da ingrasso	—	40 mg Narasin 40 mg Nicarbazin	50 mg Narasin 50 mg Nicarbazin	1. Indicare nelle istruzioni per l'uso: «Pericoloso per specie equine, tacchini e conigli» «Alimento per animali contenente uno ionoforo: può essere controindicato l'uso contemporaneo con determinate sostanze medicamentose». 2. L'additivo va incorporato nei mangimi composti sotto forma di premiscela.	28 ottobre 2020	50 µg di narasin per kg di fegato, tessuto muscolare, reni e cute/grasso freschi. 15 000 µg di dinitrocarbanilide (DNC)/kg di fegato fresco; 6 000 µg di DNC/kg di reni freschi; 4 000 µg di DNC/kg di tessuto muscolare fresco e cute/grasso freschi.



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



NORMATIVA DI RIFERIMENTO

REGOLAMENTO (UE) N. 574/2011 DELLA COMMISSIONE

del 16 giugno 2011

che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di nitrito, melamina, *Ambrosia* spp. e carry-over di alcuni coccidiostatici e istomonostatici e che consolida gli allegati I e II

Coccidiostatico	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali ⁽¹⁾	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime con un tasso di umidità del 12 %
2. Diclazuril	Materie prime per mangimi	0,01
	Mangimi composti per	
	— specie volatili ovaiole e galline ovaiole (> 16 settimane) e tacchini da ingrasso (> 12 settimane)	0,01
	— conigli da ingrasso e da riproduzione prima della macellazione quando l'uso di diclazuril è proibito (mangimi per la fase finale del ciclo di ingrasso)	0,01
	— specie animali diverse dalle galline ovaiole (< 16 settimane), polli da ingrasso, faraone e tacchini da ingrasso (< 12 settimane)	0,03
	Premiscele destinate alla produzione di mangimi per cui l'uso di diclazuril non è autorizzato	⁽²⁾

Diclazuril - Cross contaminazione



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



Livelli d'interesse in mangime per avicoli



MAT 1: quantificare il diclazuril a livello di additivazione (Clinacox 0.5 %[®]) - 1 mg kg⁻¹



MAT 2: quantificare il diclazuril a livello di cross-contaminazione - 0.01 mg kg⁻¹



MAT 3: quantificare il narasin e la nicarbazina (Maxiban G160[®]) a livello di additivazione - range 40 - 50 mg kg⁻¹



RISULTATI

Lab code

C-12; A-19; O-15; O-21; O-22



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



Risultati



Le prestazioni dei laboratori sono valutate in base ai punteggi ottenuti di *z score* (z) e *zeta score* (ζ) secondo la norma ISO 13528: 2015



Le deviazioni standard relative, per la valutazione di competenza (*deviazione standard del PT*: σ_{pt}), derivano dalle deviazioni standard di riproducibilità determinate durante lo studio di validazione del metodo (CEN) utilizzato per assegnare la concentrazione ai materiali:

- 20% (del rispettivo valore assegnato) per diclazuril e nicarbazina
- 15% per narasin

Assigned value (x_{pt}) and standard deviation for the PT assessment (σ_{pt})

(all values expressed in mg kg⁻¹ - except in the last column)

Test item	Coccidiostat	Assigned value $x_{pt} \pm U(x_{pt})^*$	Coverage factor, k	σ_{pt} (% of x_{pt})	$u(x_{pt})/\sigma_{pt}$
Test item 1	Diclazuril	0.990 $\pm$ 0.054	2	0.198 (20 %)	0.14
Test item 2	Diclazuril	0.0092 $\pm$ 0.0007	2	0.0018 (20 %)	0.18
Test item 3	Narasin	36.6 $\pm$ 2.1	2	5.5 (15 %)	0.19
	Nicarbazin	37.1 $\pm$ 3.9	2	7.4 (20 %)	0.26

* $U(x_{pt})$ = expanded uncertainty at a given coverage factor k .

Diclazuril in test item 1 (authorised level)

Assigned range: $x_{pt} = 0.990 \pm 0.054 U(x_{pt})$, ($k = 2.0$); $\sigma_{pt} = 0.198$ (all values in mg kg^{-1})

Eseguono la ricerca 4 lab_s

su 5 partecipanti

Performance score z e ζ:

satisfactory, questionable,
unsatisfactory

a: $u_{\min}(u(x_{pt})) \leq u(x_i) \leq u_{\max}(\sigma_{pt})$;

b: $u(x_i) < u(x_{pt})$;

c: $u(x_i) > \sigma_{pt}$

Campione conforme

Lab	x_i	$\pm$	k	Tecnica	$u(x_i)$	z score	ζ score	unc.
A-19	--	--	--	--	--	--	--	--
C-12	0,9	0,3	2	LC-MS/MS	0,150	-0,5	-0,6	a
O-15	0,8	0,2	2	LC-MS/MS	0,100	-1,0	-1,8	a
O-21	1,042			LC-MS/MS	0,000	0,3	1,9	b
O-22	0,89	0,29	2	LC-MS/MS	0,145	-0,5	-0,7	a



Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

IX Workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per i metalli e i composti azotati negli alimenti e nei mangimi, per gli additivi nei mangimi, per i contaminanti da processo - Roma, 28-29 novembre 2019



Diclazuril in test item 2 (cross-contamination level)

Assigned range: $x_{pt} = 0.0092 \pm 0.0007$ U(x_{pt}), ($k = 2.0$); $\sigma_{pt} = 0.0018$ (all values in mg kg⁻¹)

Eseguono la ricerca 5
lab_s su 5 partecipanti

Campione conforme

Lab	x_i	$\pm$	k	Tecnica	$u(x_i)$	z score	ζ score	unc.
A-19	0,01	0,002	2	LC-MS/MS	0,001	0,4	0,7	a
C-12	0,008	0,002	2	LC-MS/MS	0,001	-0,7	-1,15	a
O-15	0,008	0,002	2	LC-MS/MS	0,001	-0,7	-1,1	a
O-21	0,006			LC-MS/MS	0,000	-1,7	-9,5	b
O-22	0,009	0,002	2	LC-MS/MS	0,001	-0,1	-0,2	a

Narasin in test item 3 (authorised level)

Assigned range: $x_{pt} = 36.6 \pm 2.1 U(x_{pt})$, ($k = 2.0$); $\sigma_{pt} = 5.5$ (all values in mg kg⁻¹)

Campione conforme

*Eseguono la ricerca 4 lab,
su 5 partecipanti*

Lab	x_i	$\pm$	k	Tecnica	$u(x_i)$	z score	ζ score	unc.
A-19								
C-12	45	8	2	LC-MS/MS	4,000	1,5	2,0	a
O-15	38	8,6	2	LC-MS/MS	4,300	0,3	0,3	a
O-21	37,208	4,204	2,04	LC-MS/MS	2,061	0,1	0,3	a
O-22	36,9	6,8	2	LC-MS/MS	3,400	0,1	0,1	a

Nicarbazin in test item 3 (authorised level)

Assigned range: $x_{pt} = 37.1 \pm 3.9 U(x_{pt})$, ($k = 2.0$); $\sigma_{pt} = 7.4$ (all values in mg kg⁻¹)

*Eseguono la ricerca 5 lab_s
su 5 partecipanti*

Campione conforme

Lab	x_i	$\pm$	k	Tecnica	$u(x_i)$	z score	ζ score	unc.
A-19	40	1,1	2	HPLC-DAD	0,550	0,4	1,4	b
C-12	36	7	2	HPLC-DAD	3,500	-0,1	-0,3	a
O-15	35	7,3	2	LC-MS/MS	3,650	-0,3	-0,5	a
O-21	38	2,8	2	HPLC-DAD	1,400	0,1	0,4	b
O-22	37,6	6,9	2	LC-MS/MS	3,450	0,1	0,1	a

Metodiche utilizzate

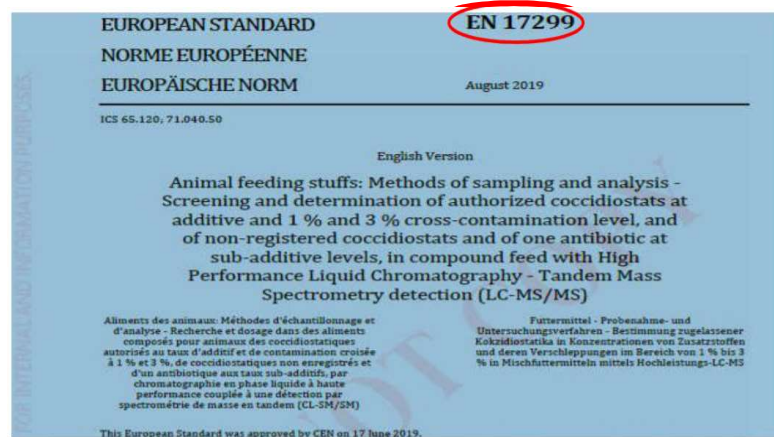
Scegliere il metodo utilizzato nel controllo ufficiale

Lab	Measurand	Standard method	Recovery correction	Recovery estimation	Recovery (%)	LOD (mg/kg)	Accredited	Guard column	Mobile phase isocratic	Mobile phase gradient	HPLC column stationary phase	Mobile phase components
A-19	Nicarbazin at AL (T3)	Yes	Yes	Spiking	94	0.82	Yes	Yes	No	Yes	C18	FA ACQ. + FA IN ACN
	Diclazuril at CL (T2)	Yes	Yes				Yes	Yes	No	Yes	C18	FA ACQ. + FA IN ACN
	Narasin at AL (T3)											
	Diclazuril at AL (T1)											
C-12	Nicarbazin at AL (T3)	Yes	No	Spiking	90	5	No	SI	SI	NO	C18	Acqua/ACN
	Diclazuril at CL (T2)	No	No		--	0.002	No	No	No	Yes	C18	H ₂ O/ACN-MeOH formic acid
	Narasin at AL (T3)	Yes	No		92	0.1	No	No	No	Yes	C18	H ₂ O/ACN-MeOH formic acid
	Diclazuril at AL (T1)	No	No				No	No	No	Yes	C18	H ₂ O/ACN-MeOH formic acid
O-15	Nicarbazin at AL (T3)	No	Yes	Spiking	98	0.1	Yes	Yes	No	Yes	C18	ACN/Formic acid 0.1 %
	Diclazuril at CL (T2)	No	Yes		97	0.003	Yes	Yes	No	Yes	C18	ACN/Formic acid 0.1 %
	Narasin at AL (T3)	No	Yes		99	0.1	Yes	Yes	No	Yes	C18	ACN/Formic acid 0.1 %
	Diclazuril at AL (T1)	No	Yes				Yes	Yes	No	Yes	C18	ACN/Formic acid 0.1 %
O-21	Nicarbazin at AL (T3)	No	Yes	Spiking	97	1.5	Yes	Yes	No	Yes	C18	Ammonium acetate, ACN
	Diclazuril at CL (T2)	No	Yes		100	0.005	No	No		Yes	C18	formic acid, acetonitrile
	Narasin at AL (T3)	No	Yes		88	0.35	Yes	No		Yes	C18	formic acid, acetonitrile
	Diclazuril at AL (T1)	No	Yes				No	No		Yes	C18	formic acid, acetonitrile
O-22	Nicarbazin at AL (T3)	No	Yes	Spiking	88	0.1	Yes	Yes	No	Yes	Biphenyl	MeOH/FOA 0.1 %
	Diclazuril at CL (T2)	No	Yes		90	0.002	Yes	Yes	No	Yes	Biphenyl	MeOH/FOA 0.1 %
	Narasin at AL (T3)	No	Yes		95	0.1	Yes	Yes	No	Yes	Biphenyl	MeOH/FOA 0.1 %
	Diclazuril at AL (T1)	No	Yes				Yes	Yes	No	Yes	Biphenyl	MeOH/FOA 0.1 %

Conclusioni

-  Tutti i laboratori italiani partecipanti hanno mostrato prestazioni soddisfacenti (punteggio z) per la determinazione del diclazuril, narasin e nicarbazina nei tre campioni ed hanno valutato correttamente i materiali di prova come conformi;
-  La maggior parte dei partecipanti ha riportato valutazioni realistiche dell'incertezza di misura:
tipo a: $u_{\min}(u(x_{pt})) \leq u(x_i) \leq u_{\max}(\sigma_{pt})$;
tipo b: $u(x_i) < u(x_{pt})$: *1lab per diclazuril in MAT 1 e MAT 2 - non fornito valore di $u(x_i)$; 2lab per nicarbazina in MAT 3;*
-  Metodi LC-MS/MS vs HPLC-UV/DAD non ci sono differenze sostanziali;
-  Conferma della capacità dei partecipanti nel monitorare i livelli massimi stabiliti dalla legislazione europea per gli additivi nei mangimi oggetto del PT.

Altro 2019 &...2020



2019 attività in corso

- PT: Urea in mangime per cani
- Validation study: metodo ufficiale (Reg.152/2009) determinazione urea

2020 PT

- Vitamina D3 e antiossidanti a livelli autorizzati nei mangimi

??? Da definire

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Contatti

LNR additivi nei mangimi

....



lnradditivim@iss.it



<http://old.iss.it/lcra/>