

ДЕРЖАВНА ВЕТЕРИНАРНА ТА ФІТОСАНІТАРНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК

**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ З ОЦІНКИ ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИК
ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ СКРИНІНГОВОГО
ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ВЕТЕРИНАРНИХ
ПРЕПАРАТІВ ТА ЗАБРУДНЮВАЧІВ У ХАРЧОВІЙ СИРОВИНІ
ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ**

ЛЬВІВ – 2011

Методичні вказівки підготували:

І.Я. Коцюмбас – доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН України, директор ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок

Д. В. Янович - доктор сільськогосподарських наук, заступник директора з питань наукового забезпечення системи якості випробувань ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок

З. С. Засадна - кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії інструментальних методів контролю ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок

А.О. Костюк - старший науковий співробітник лабораторії інструментальних методів контролю ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок

Рецензенти: **Косенко Ю.М.** завідувач відділу наукової експертизи та фармацевтичного аналізу ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, д.б.н.

Методичні вказівки розглянуті та схвалені ТК № 132 Держспоживстандарту України “Засоби захисту тварин, корми та кормові добавки” (протокол № 11 від 10.10.2011 р.) та Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби (протокол № 4 від 21 грудня 2011 р.).

ВСТУП

Імуноферментний аналіз (ІФА) часто ототожнюється з англomовною абрeвіатурою однієї з найбільш відомих його різновидностей - ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). В той же час цей метод нараховує більше тридцяти різновидностей, які відрізняються за способом взаємодії антитіл, послідовністю виконання окремих процедур та складом реагентів, які використовуються для аналізу. Найбільш часто, при виробництві комерційних тест-систем доступних на світовому ринку, застосовується **гетерогенний твердофазний конкурентний аналіз**. Ця різновидність методу найчастіше реалізується у тест наборах які використовуються для контролю показників безпеки продуктів харчування, а також кормів для тварин.

Імуноферментний метод аналізу належить до скринінгових напівкількісних методів, які використовуються, для виявлення в зразку субстанції або класу субстанцій на очікуваному рівні. Ці методи характеризуються високою продуктивністю виконання аналізів і тому використовуються для одночасного випробування великої кількості зразків, з метою виявлення потенційно невідповідних результатів. Згідно з Директивою 96/23/ЕС для скринінгу повинні застосовуватись тільки такі аналітичні методики, для яких доведено у задокументований спосіб достовірність і межі хибної відповідності <5% (β - похибка) на очікуваному рівні. У випадку підозри про невідповідність результату, цей результат повинен бути підтверджений підтверджуючим методом [1]. Особлива увага, при розробці методик, спрямована на уникнення хибних результатів про відповідність, і досягнення такої чутливості методу, яка забезпечує нижню межу виявлення окремих небажаних сполук у зразках на рівні нижчому за 0,05 мкг/кг (або $\frac{1}{2}$ регуляторного рівня), що відповідає сучасним світовим вимогам до аналітичних методів і дорівнює чутливості таких арбітражних методів, як тандемна мас-спектрометрія (РХ/МС/МС), при значно більшій продуктивності, простоті виконання та меншій собівартості. Ефективне застосування методу ІФА описано в ряді наукових джерел, а також регламентовано для застосування в статусі офіційних скринінгових методів у країнах ЄС [1]. Разом із тим, цей метод потребує фахової оцінки одержаних результатів. В окремих випадках можливе одержання хибних результатів. Це викликано біологічною природою антитіл до аналіту, що визначається, внаслідок чого можливе їх неспецифічне зв'язування. Висока специфічність і селективність методу ІФА, залежить від здатності специфічних антитіл зв'язувати тільки досліджуваній аналіт, або, у випадку групових тестів – аналіти, які мають подібну антигенну детермінанту. Але навіть у випадках високої специфічності існує небезпека неспецифічного блокування антитіл непередбаченими факторами, які формують складну матрицю зразка. З метою уникнення одержання хибних результатів необхідно проводити оцінку придатності методик імуноферментного аналізу на типових матрицях, в яких у подальшому буде проводитись визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів та їх метаболітів.

Дані методичні вказівки узагальнюють досвід роботи лабораторій Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок (ДНДКІ) у проведенні робіт з оцінки придатності методик імуноферментного аналізу і базуються на рекомендаціях, викладених у Рішенні Єврокомісії (2002/657/ЕС) від 12 серпня 2002, щодо виконання аналітичних методів та інтерпретації їх результатів [1], та рекомендацій референс-лабораторій Євросоюзу в галузі контролю залишкових кількостей (CRLs) 20/1/2010, щодо оцінки придатності скринінгових методів при проведенні визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів [2].

У Додатку А наведено загальний перелік методичних вказівок щодо з використання ІФА тест - систем в галузі контролю безпеки тваринницької сировини, оцінка придатності яких проводилась із застосуванням критеріїв, викладених у даних методичних вказівках і які було затверджено Державним комітетом ветеринарної медицини України протягом 2002-2010 років.

1. СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ

Методичні вказівки встановлюють мінімально необхідні вимоги, які повинні виконуватись при оцінці придатності методик у лабораторіях, які будуть застосовувати їх для скринінгових досліджень з метою доведення того, що дана лабораторія може правильно застосувати даний метод. За одержаними результатами випробувань проводиться оцінка придатності методик кількісного визначення залишків ветеринарних препаратів та їх метаболітів та мікотоксинів в харчовій сировині тваринного походження (м'ясо птиці, свинина, яловичина, печінка, риба, яйця, мед і молоко) методами імуноферментного аналізу із застосуванням тест-систем.

Ці методичні вказівки призначені для фахівців державних та виробничих лабораторій ветеринарної медицини та контролюючих органів, вищих навчальних закладів та науково–дослідних інститутів та містять рекомендації з оцінки придатності методик та контролю якості результатів одержаних під час рутинних випробувань, із застосуванням ІФА скринінг-методів.

2. ТЕРМІНИ, ВИЗНАЧЕННЯ ПОНЯТЬ, ПОЗНАКИ ТА СКОРОЧЕННЯ

Нижче подано терміни, вжиті в методичних вказівках, та визначення позначених ними понять:

аналіт – (досліджувана *субстанція*) означає *субстанцію*, яку необхідно виявити, ідентифікувати і/або визначити кількісно, а також її похідні, які утворюються протягом аналізу;

антигенна детермінанта – ділянка молекули антигену (епітоп) з якою зв'язуються *моноклональні антитіла*;

валідація – (оцінка придатності) означає підтвердження, отримане шляхом випробування і забезпечення ефективних доказів того, що задовольняються особливі вимоги специфічного використання методики. Початкова валідація виконується для вперше розроблених методик у лабораторії розробника і повинна продемонструвати відповідність методу поставленій цілі. Скорочена валідація виконується в лабораторії реципієнта при передачі методики від розробника, і повинна продемонструвати можливість правильного виконання методики в умовах лабораторії і відповідність її поставленій меті;

визначення порожньої проби реагенту – означає завершену аналітичну процедуру, яка проводиться без досліджуваного зразка або використовує еквівалентну кількість підходячого розчинника замість досліджуваного зразка;

відтворюваність – означає *збіжність* за умови відтворюваності;

визначення порожньої проби зразка (“негативного контролю”) – означає завершену аналітичну процедуру, яка застосовується до досліджуваного зразка, в якому відсутня досліджувана *субстанція (аналіт)*. Зразки одержують від тварин, які не піддавалися обробці речовиною що визначається. Якщо такі зразки недоступні допускається використання

зразків в яких підтверджено відсутність *аналіту* чутливими фізико-хімічними методами;

випробувальна порція – кількість матеріалу, взятого з *випробувального зразка*, для проведення випробування або спостереження;

випробувальний зразок – зразок, який готується з *лабораторного зразка* і від якого береться випробувальна порція;

випробування в окремій лабораторії (власна перевірка правильності) – означає аналітичне вивчення окремо взятою лабораторією, з використанням одного методу аналізу, того ж, або різних випробувальних матеріалів, у різних умовах, протягом обґрунтовано-тривалого проміжку часу;

внутрішня лабораторна відтворюваність –збіжність, одержана в тій же лабораторії у наперед окреслених умовах (які охоплюють наприклад методику, випробувальні зразки, оператора, умови проведення випробувань) протягом відповідного терміну часу;

дослідна матриця – тканина або рідина представлена для аналізу (м'язи, печінка, нирки, сеча, мед, молоко). Дослідна матриця обумовлена стандартною операційною процедурою (СОП). Наприклад, коли в СОП вказано, що методика призначена для визначення аналіту в м'язах ВРХ це означає що вона може застосовуватись тільки для аналізу зразків м'язів тільки зазначеного виду тварин. У випадку відсутності конкретизації виду тварин методику можна застосовувати для визначення аналіту в м'язах тварин різної видової приналежності;

збагачений (фортифікований) зразок – зразок, який збагачений відомою для визначення кількістю *аналіту*. При проведенні оцінки придатності методики *порожні зразки* збагачують дослідним *аналітом* на рівні *цільової концентрації скринінгу* - “скринінг-позитивний контроль” . Це також можуть бути зразки одержані від тварин, які за життя були оброблені речовиною, що визначається, або тестові зразки *дослідних матриць* з встановленим вмістом *аналіту*;

збіжність – означає близькість відповідності між незалежними випробувальними результатами, які одержані в наперед передбачених умовах. Міра збіжності звичайно виражається в показниках похибки і вираховується, як середнє квадратичне відхилення випробувального результату. Гірша збіжність визначається більшим середнім квадратичним відхиленням;

здатність витягу – означає відсоток істинної концентрації субстанції, яку одержують протягом аналітичної процедури. Якщо недоступний сертифікований еталонний матеріал, це значення визначається шляхом підтвердження (*валідації*);

здатність виявлення (СС β) – означає найменший вміст *аналіту* у зразку, яку може бути виявлено, ідентифіковано і/або визначено кількісно, з достовірністю похибки β . У випадку субстанцій для яких не встановлено допустиму межу (*регуляторний межа*), здатність виявлення є найнижча концентрація, при якій метод може виявити справді забруднені зразки з статистичною упевненістю $1-\beta$. У випадку субстанцій з встановленою

дозволеною межею, здатність виявлення - це концентрація нижча за дозволена межу, яку метод може виявити з статистичною упевненістю $1-\beta$; Для *скринінгових* методів β помилка – тобто коефіцієнт помилкової достовірності має бути $<5\%$ У випадку визначення аналітів для яких не було встановлено *регуляторної межі*, СС β це найнижча концентрація при якій метод здатний визначити дійсно забруднені зразки зі статистичною вірогідністю $1-\beta$. У цьому випадку СС β повинна бути настільки низькою наскільки це можливо або нижчою ніж рекомендовані концентрації. У випадку *аналітів* з встановленою *регуляторною межею* СС β це концентрація при якій метод здатний визначити концентрацію на рівні дозволеної межі, із статистичною вірогідністю $1-\beta$. Значення СС β показує концентрацію при якій залишається $\leq 5\%$ помилкових результатів про відповідність зразка. У цьому випадку її значення повинно бути меншим або принаймні дорівнювати *регуляторній межі*;

імуноферментний аналіз (ІФА) - визначення антигенів за використання специфічних до них антитіл (переважно – *моноклональних*). В залежності від модифікації, до антитіл, або до аналіту (конкурентний метод), ковалентно пришиті молекули ферменту. Утворений імунний комплекс виявляється фотометричним визначенням оптичної густини забарвлених продуктів, що з'являються внаслідок розщеплення ферментом відповідного субстрату-барвника;

калібрувальний стандарт – засіб з встановленим вмістом *аналіту*, вимірювання якого проводиться з метою узгодження одержаного значення вимірювань;

кількісний метод – означає аналітичний метод, який визначає кількість або масову частку *субстанції* виражену у цифровому значенні відповідних одиниць;

критерії робочих характеристик – це вимоги до робочих характеристик, відповідно до яких можна окреслити придатність аналітичного методу для даної цілі, а також здатність до відтворення одержаних результатів;

лабораторний зразок – зразок, приготований для використання в лабораторії, з метою інспекції або випробування;

межа відсікання – означає межу відповіді або сигналу, одержаного при застосуванні *скринінг-методу*, що вказує на наявність в зразку *аналіту* на рівні *цільової концентрації* або вище. Якщо межа відсікання перевищена, необхідно повторити випробування зразка *підтверджуючим методом*. За проведення оцінки придатності методики, межу відсікання встановлюють проведенням аналізу порожніх зразків матриці та зразків *збагачених аналітом* на рівні *цільової концентрації скринінг-методу*. Приклади встановлення межі відсікання надані у додатках Б та В;

межа прийняття рішення (СС α) – означає межу, при якій і вище якої результат аналізу вважається за невідповідний з достовірністю похибки α ;

міжлабораторні випробування (порівняння) – це організація, виконання і оцінка випробувань одного і того ж зразка двома або більше лабораторіями,

відповідно до попередньо окреслених умов, з метою визначення способу виконання тестів. Відповідно до мети - визначення можна кваліфікувати як спільне випробування або порівняння вправності (досвідченості);

мікротитрувальний планшет – плоский пластиковий штатив (з розмірами: 128мм × 85мм × 12мм) на 96 місць для чарунок з позначеними координатною сіткою, для розміщення та утримання максимально 12 *стрипів*, необхідний для виконання імуноферментного аналізу;

мінімально необхідна межа визначення МНМВ (MRPL) – мінімальний вміст аналіту в зразку, який повинен бути виявлений і підтверджений. Ця межа не відображує даних про ступінь біологічної небезпеки встановленого вмісту аналіту, а гармонізує вимоги до аналітичних методів які повинні застосовуватись для виявлення субстанцій, для яких не встановлена дозволена межа;

моноклональні антитіла – антитіла синтезовані клонованими гібридомами, які мають однакові властивості;

підтверджуючий (еталонний) матеріал, (референсний матеріал (CRM)) – матеріал який використовується для калібрування обладнання або перевірки методу вимірювання, одна або кілька властивостей якого підтвержені затвердженим (арбітражним) методом;

підтверджуючий метод – метод, який забезпечує повну або додаткову інформацію, яка дозволяє однозначно ідентифікувати субстанцію, а при необхідності провести її кількісне вимірювання на очікуваному рівні;

повторюваність – збіжність за умови повторюваності;

похибка Альфа (α) – ймовірність того, що випробуваний зразок відповідний, навіть якщо одержано невідповідні результати (помилково невідповідний результат);

похибка Бета (β) – ймовірність того, що випробуваний зразок справді не відповідний, навіть якщо був одержаний відповідний результат (помилково відповідний результат);

правильність (точність) – відповідність між результатом випробування і загальноприйнятим еталонним значенням і окреслюється *точністю* і *збіжністю*;

регуляторна межа (межа дії для цілей валідації) – максимальний ліміт залишку, максимальний допустимий рівень (МДР) або інший максимальний допуск для *субстанцій*, які встановлені в ЄС 470/2009 ЕС (на заміну 2377/90 ЄЕС) або іншим чинним державним законодавством. Для цілей *валідації* регуляторною межею для заборонених *аналітів* може слугувати *МНМВ* або максимальні значення їх ліміту рекомендовані настановою референсних лабораторій CRL від 07. 12. 2007 [5];

робоча характеристика – функціональна якість, яка може бути надана аналітичному методу. Це може бути наприклад специфічність (**specificity**), правильність (**accuracy**), точність (**trueness**), збіжність (**precision**), повторюваність (**repeatability**), відтворюваність (**reproducibility**), здатність витягу (видобування) (**recovery**), здатність виявлення (**detection capability**) і стійкість (**ruggedness**);

систематична похибка – різниця між очікуваними результатами тесту і прийняти довідковим значенням;

скринінгові методи – методи, які використовуються, щоб виявити наявність субстанції або клас субстанцій нижче встановленого регуляторного рівня. Ці методи високопродуктивні і використовуються для випробування великої кількості зразків, щоб виявити потенційно невідповідні результати. Вони розроблені, для уникнення хибних відповідних результатів;

специфічність – здатність методу відрізнити *аналіт*, який вимірюється, від інших *субстанцій*. Ця характеристика переважно описана у методиці вимірювання, але вона може відрізнятись в залежності від класу суміші або *матриці*;

спільне випробування – аналіз того ж зразка тим же методом, щоб визначити робочі характеристики методу. Вивчення охоплює випадкову похибку вимірювання і лабораторну похибку вимірювання;

стандартна операційна процедура (СОП) – документально оформлена послідовність дій потрібних для виконання методики. СОП складається розробником методу ще до проведення його валідації і повинна охоплювати усі пункти відповідно до вимог ISO 17025:2005 . При розробці аналітичного методу визначають ціль методу (тобто перелік *аналітів* та *матриць* в яких вони можуть визначатись). Протягом етапу розробки методу усі критичні точки, які можуть вплинути на результат, мають бути визначені, ідентифіковані та внесені до СОП з метою їх контролю. У випадку передачі методу для проведення досліджень у лабораторію, обладнання якої відрізняються від того, що було запропоновано розробником, лабораторія повинна розробити власну СОП;

стандартне додавання – процедура, при якій випробувальний зразок поділяється на дві (або більше) випробувальні порції. Одна порція аналізується, як така, а до інших випробувальних порцій перед аналізом додаються відомі кількості стандартного *аналіту*. Кількості доданого стандартного *аналіту* мають бути у два-п'ять разів більші від розрахункових кількостей *аналіту* в зразку. Ця процедура розроблена, щоб визначити вміст *аналіту* в зразку з врахуванням здатності витягу аналітичної процедури;

стандартний аналіт — *аналіт* відомого і сертифікованого вмісту і чистоти, який використовується, як еталонна субстанція для збагачення зразків на етапі валідації методики;

стійкість – чутливість аналітичного методу до змін експериментальних умов, список яких включає: досліджувані зразки, досліджувані субстанції (*аналіти*), умови зберігання, умови зовнішнього середовища і/або умови приготування проб, при яких метод може бути застосований без змін або з певними незначними модифікаціями. Для всіх експериментальних умов, які на практиці можуть коливатись (наприклад стабільність реактивів, склад зразка, рН, температура), повинні бути вказані будь-які зміни, які могли б вплинути на аналітичний результат;

стрип - з'єднані між собою в прямий ряд 8 циліндричних чарунок з полістиролу, призначених для імуноферментного аналізу;

субстанція – речовина конкретної і встановленої хімічної будови та її метаболіти;

технічний поріг – найвище значення межі відповіді порожнього зразка з врахуванням похибки вимірювання. Оскільки для скринінгових методів встановлення числового значення CC_{α} не обов'язкове [1] при оцінці придатності методу значення технічного порогу встановлюється для кожної індивідуальної матриці з метою наступної оцінки можливості збагачення зразка аналітом;

точність – близькість відповідності між середнім значенням, яке одержується від великої серії випробувальних результатів і прийнятим еталонним значенням. Точність звичайно виражається, як похибка вимірювання;

умови відтворюваності – умови, при яких випробувальні результати одержуються тим же методом, на однакових випробувальних зразках в різних лабораторіях, різними операторами, за використання різного обладнання;

умови повторюваності – умови, за яких випробувальні результати одержуються однаковим методом на однакових випробувальних зразках в тій же лабораторії, тим же оператором, використовуючи теж обладнання;

цільова концентрація скринінгу – концентрація, при якій *скринінг-метод* класифікує зразок як скринінг-позитивний (той що потенційно не відповідає) та потребує додаткового дослідження із застосуванням методу підтвердження. Для зареєстрованих препаратів вона встановлюється на рівні або нижче МДР, якщо дозволяє метод вона повинна встановлюватись на рівні $\frac{1}{2}$ МДР. Для заборонених препаратів вона має бути встановлена на рівні *МНМВ*. Для *аналітів* для яких не встановлені МДР та *МНМВ*, має встановлюватись на як можливо нижчому рівні які описані в статтях CRL від 7 12 2007 [5]. Чим нижчою є *цільова концентрація скринінг-методу*, тим меншою є імовірність одержання помилкового результату про відповідність (помилково негативного результату) у зразках, які містять залишки на рівні регуляторної межі;

якісний метод – аналітичний метод, який ідентифікує субстанцію на основі хімічних, біологічних або фізичних властивостей.

3. КРИТЕРІЇ ВИКОНАННЯ ТА ІНШІ ВИМОГИ ДЛЯ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДІВ

Ці рекомендації адаптують основні положення Рішення Єврокомісії (2002/657/ЕС) від 12 серпня 2002, щодо виконання аналітичних методів та інтерпретації їх результатів, та рекомендації рефернс-лабораторій Євросоюзу в галузі контролю залишкових кількостей (CRLs) 20/1/2010, до проведення оцінки придатності імуноферментних скринінгових методів для визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів. В рекомендаціях зосереджено увагу на скороченій процедурі валідації при впровадженні імуноферментних методів у лабораторіях, які будуть проводити визначення

залишкових кількостей ветеринарних препаратів у продуктах тваринництва. Документ встановлює мінімально необхідні вимоги, які повинні виконуватись усіма уповноваженими державними лабораторіями ветеринарної медицини для проведення досліджень, передбачених Планом державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження, при впровадженні нових скринінгових методик із застосуванням методу імуноферментного аналізу.

Документ включає в себе вимоги до протоколу скороченої валідації, яка повинна продемонструвати робочі характеристики методики, опис умов, в яких методика проходила валідацію і результати валідації, яка доводить що дана лабораторія може правильно застосувати даний метод.

Документ включає в себе також рекомендації з контролю якості результатів одержаних під час рутинних випробувань, із застосуванням ІФА скринінг-методів.

3.1 Характеристика методів імуноферментного аналізу. Скринінг-методи можуть бути класифіковані, або відповідно за способом виявлення аналіту (біологічні, біохімічні, фізико-хімічні), або за точністю (якісні, напівкількісні або кількісні).

Імуноферментний аналіз (ІФА) відомий також, як ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) належить до біохімічних методів, які визначають молекулярні взаємодії (наприклад взаємодія антигену з антитілом) між аналітом та антигенною детермінантою або рецептором зв'язування. Застосування маркування аналіту або рецептора хімічними речовинами, дозволяє проводити опосередковане виявлення аналіту за кількістю маркера. Ці методи, як правило, високоселективні до окремих аналітів, або груп аналітів, які характеризуються подібністю молекулярної будови або мають специфічну дію.

У випадках застосування специфічного ІФА – тесту, застосування якого передбачає використання калібрувальної кривої, ці методи класифікуються, як напівкількісні, які дають приблизне значення кількості аналіту. У такому варіанті проведення визначення аналіту, результат не може розцінюватись, як такий, за яким дається офіційний висновок, але такий, який може бути корисним для визначення діапазону концентрацій аналіту та потрібний аналітику для ухвалення рішення про застосування тесту підтвердження. В той же час відсутність аналіту на рівні нижчому за межу відсікання встановлену за результатами оцінки придатності методики, є підставою вважати зразок таким, що відповідає вимогам.

3.2 Основні критерії оцінки придатності скринінгових методів. Головна вимога, яка має виконуватись при валідації методик скринінгового аналізу, незалежно від точності оцінки вмісту аналіту, – це оцінка їх здатності достовірно визначати потрібний аналіт на рівні, що не перевищує межі для вибраної *цільової концентрації скринінгу*. При цьому необхідно максимально

уникати *помилково* – *відповідних* результатів. Тому при виборі цільової концентрації необхідно встановити її на рівні нижчому за МДР, щоб мати достатній запас чутливості методу, який гарантує обов'язкове виявлення перевищення у зразку, встановленої *регуляторної межі*, що показує зразок, як скринінг-позитивний.

Кожна валідація, незалежно від обсягу (повна або скорочена схема) повинна охоплювати усі типові матриці та можливості комбінації аналітів обумовлених у СОП на методику. Перелік можливих варіантів перевірки придатності методики змінюється в залежності від того, на якому етапі знаходиться перевірка методики.

Як загальний принцип має бути встановлено достатній запас чутливості між *цільовою концентрацією скринінгу* та встановленою *регулятивною межею*. Тому як правило, межа значення ССВ повинна бути меншою або дорівнювати *регуляторній межі*. Слід однак зауважити, що скринінг-тест не завжди в змозі достовірно визначити усі потрібні *аналіти* на рівні *регуляторної межі* в усіх видах матриць.

3.3 Порядок вибору аналіту для валідації. При виборі *аналітів*, які будуть використовуватись для проведення валідації, з встановленням селективності методики, необхідно враховувати можливості методики, зазначені в СОП. Якщо методика нездатна розрізнити різні види аналітів в межах групи хімічно-подібних речовин (тетрацикліни, бета-лактами), *валідація* повинна виконуватись для кожного *аналіту*, який вважається доречним, тобто сполуки які реально можуть потрапити в продукцію з зареєстрованими препаратами, або іншими препаратами, з встановленими ступенями ризику, які мають бути обов'язково включеними в план моніторингу. При цьому додатково може проводитись *валідація* і з різною кількістю інших видів аналітів .

3.3.1. Порядок вибору аналітів для валідації групових методик. При валідації групових біохімічних методик, які здатні виявляти декілька *аналітів* з однієї групи зі змінною перехресною реакцією, які усі включені до галузі застосування методики, початкову *валідацію* необхідно провести так, щоб довести те що усі *аналіти* з групи можуть бути екстраговані із зразка та виявлені запропонованою методикою. Часто проблеми виникають через те, що виробники тест-систем не завжди вказують в інструкції, чи перехресна чутливість була одержана при дослідженні реальних матриць, чи у чистих буферних системах. Окрім того не завжди враховується витяг кожного індивідуального *аналіту* з матриці, що не дає можливості встановити ССВ для кожного вибраного *аналіту*. Здатність виявлення необхідно встановлювати для кожного окремого *аналіту* в груповому тесті або для репрезентативного *аналіту* (наприклад аналіту з найменшою перехресною чутливістю). У випадку, коли тест передбачає групове визначення окремих *аналітів*, наприклад, як у випадку з груповим тестом на сульфаніламід, повинні бути визначені перехресні чутливості з іншими *аналітами*. Здатність

виявлення, в такому випадку, для всіх *аналітів* групи може буде встановлена при *валідації* за репрезентативним аналітом з врахуванням відсотків перехресних реакцій.

Приклад критеріїв, які можуть бути використані при виборі аналітів, включених до валідації імунних скринінг-тестів: вибирають аналіт з найменшою перехресною чутливістю, для кількісних методик, що передбачають екстрагування *аналіту*, вибирають *аналіт*, для якого встановлено найменший відсоток *витягу*.

4. ВИКОНАННЯ ПРОЦЕДУР ПРОЦЕСУ ОЦІНКИ ПРИДАТНОСТІ МЕТОДИК

4.1 Визначення *специфічності/селективності* та *здатності виявлення ССβ* у відповідності до класичних принципів

4.1.1 Визначення кількості зразків необхідних для валідації. Кількість зразків, збагачених кожним *аналітом* на рівні *цільової концентрації*, залежить від ступеня статистичної вірогідності, якої необхідно досягнути при одержанні результату скринінгу. Статистична вірогідність тим вища, чим менша, вибрана для *валідації цільова концентрація* порівняно до *регуляторної межі*. Чим це значення менше, тим меншої кількості повторних аналізів достатньо для встановлення такого ступеня вірогідності, який правильно ідентифікує справді забруднені залишками зразки на рівні *регуляторної межі*.

Наприклад, якщо *цільова концентрація* скринінгу встановлена на рівні половини регуляторної межі $\frac{1}{2}$ МДР, це гарантує виникнення тільки одного або повну відсутність помилково-відповідних висновків (вірогідність 95%) після аналізу 20 зразків “скринінг-позитивного” контролю, що достатньо чітко дозволяє встановити межу значення ССβ та продемонструвати те, що воно є меншим за *регуляторну межу* (межу дії, МДР), а також меншою або рівною ніж $\frac{1}{2}$ МДР.

Якщо *цільову концентрацію* встановлено в діапазоні між 50 і 90 відсотків регуляторної межі, необхідно одержати результати від не менше, ніж 40 зразків “скринінг-позитивного” контролю, при цьому не більше 2 з них повинно бути неправдиво відповідні за одержаними результатами, це дозволить продемонструвати те, що ССβ є меншим за *регуляторну межу*.

Якщо межа чутливості скринінг-тесту наближається до *регуляторної межі* і є нижчою від неї не більше ніж на 10%, необхідно одержати результати від не менше, ніж 60 зразків “скринінг-позитивного” контролю, при цьому з них має бути не більше 3 неправдиво-відповідних, це дозволить продемонструвати, що значення ССβ є придатним для контролю за не перевищенням *регуляторної межі*.

Великі за об'ємом серії досліджень можуть бути проведені протягом декількох етапів, наприклад, якщо в серії з 20 контрольних зразків виявиться більше ніж 1 неправдиво-відповідний, подальшу валідацію призупиняють і збільшують *цільову концентрацію* для повторення етапу. Якщо для вибраної *цільової концентрації* скринінгу передбачається випробування 40 або 60

зразків, а перша серія з 20 зразків дає не більше ніж 1 неправдиво позитивний результат подальшу валідацію призупиняють обмежуючись дослідженням 20 зразків.

Якщо *валідація* виконується для однієї матриці, наприклад м'яса, необхідно дослідити 60 зразків від різних видів тварин, наприклад 20 свинячих, 20 яловичих, 20 домашньої птиці.

4.1.2 Встановлення межі відсікання та обчислення ССβ. Валідація напівкількісних скринінг-методів, вимагає встановлення межі відсікання на рівні або вище за який зразок вважається як "скринінг-позитивний" і підлягає підтвердженню фізико-хімічним методом. У додатках Б та В подається два підходи для встановлення рівня відсікання для скринінгових методів.

Цільова концентрація скринінгу (x_1) на рівні якої буде збагачена матриця порожнього зразка з метою встановлення рівня відсікання визначеного аналіту в ідеальному випадку повинна бути нижчою за $\frac{1}{2}$ регуляторної межі, якщо це не можливо, вона повинна бути встановлено в діапазоні 50-90% від концентрації регуляторної межі. У такому випадку відбирають 60 зразків однієї матриці, якщо це м'язи ВРХ, то кожен зразок повинен бути з іншої партії. Для достовірного визначення ССβ має бути проаналізовано не менше 60 порожніх та 60 збагачених зразків. Якщо методом визначають більше ніж один аналіт, збагачення зразка потрібно провести для кожного аналіту, або принаймні для кожного аналіту, який вважається репрезентативним (може використовуватись також багатофакторний підхід описаний в частині 4.2, а також не завжди необхідно аналізувати 60 зразків див. частину 4.1.1).

Крок 1 Збагатити 60 порожніх зразків на рівні вибраної цільової концентрації (x_1)

Крок 2 Виконати аналіз 60 порожніх та 60 збагачених зразків згідно СОП для методу. Дослідження бажано виконувати в різні дні, і бажано, різними операторами з охопленням всього можливого діапазону експлуатаційних режимів які можуть вплинути на виконання методики. Бажано проводити аналіз у «сліпих» умовах, щоб аналітик не був проінформований про вміст аналіту в зразках для валідації і не знав, які зразки є порожніми, а які збагаченими.

Крок 3 Відповідно до підходу 1 (додаток Б)

Оцінюють діапазон одержаних даних для серії порожніх та збагачених зразків. Вибирають найменший результат в серії збагачених зразків. Це значення є межею відсікання в тому випадку, якщо найнижче значення збагачених зразків не перекривається найвищим значенням порожніх зразків (додаток Б).

Відповідно до підходу 2 (додаток В) Другий підхід ґрунтується на врахуванні 5% похибки β . Значення сигналу відповіді **В1** визначається для кожного результату серії досліджень порожніх зразків. Потім обчислюється середнє значення відповіді для серії порожніх зразків **В** та стандартне відхилення **SDb** їх відповіді. Може бути обчислений «технічний поріг» **T**.

Значення сигналу відповіді Y_1 визначається для кожного результату серії досліджень збагачених зразків. Для серії збагачених зразків також обраховується середнє значення відповіді M та стандартне відхилення SD їх відповіді. Може бути обчислений “фактор відсікання” F_m . Поріг матричного впливу T і “фактор відсікання” F_m є специфічними для кожної індивідуальної матриці.

Крок 4 Проводять аналіз даних, одержаних в серії збагачених зразків. Якщо більше ніж 5% зразків з серії мають значення нижче за встановлений рівень межі відсікання, то цільова концентрація скринінгу була вибрана занадто низькою. У цьому випадку існує імовірність того, що при проведенні скринінгу будуть одержуватись неправдиво-позитивні результати. Валідація потребує корекції шляхом збільшення рівня цільової концентрації.

Примітка: Якщо x_1 встановлено на рівні регуляторної межі, і якщо більше ніж 5% зразків з серії мають значення нижче за встановлений рівень межі відсікання, валідацію методики необхідно призупинити до поліпшення її характеристик. Якщо x_1 складає половину регуляторної межі і якщо більше ніж 5% зразків з серії мають значення нижче за встановлений рівень межі відсікання, необхідно збільшити концентрацію збагачення на 25% і валідацію необхідно повторити.

Крок 5 Обчислення ССβ. Після аналізу необхідної кількості зразків (дивись п.5.1.1), збагачених *аналітом*, на рівні, при якому було виявлено не більше 5% зразків, які було ідентифіковано, як відповідні, можливо встановити здатність виявлення методу ССβ (тобто концентрацію яку метод виявляє з імовірністю $\geq 95\%$).

4.1.3 Визначення робочих характеристик методики

4.1.3.1 Визначення застосовності. Здебільшого значення МДР аналітів в однакових типах матриць (наприклад м'язи різних видів тварин), не відрізняється, але часто відрізняються для різних матриць в межах одного виду тварин (наприклад, м'ясо, молоко, нирки). Якщо ССβ було встановлено для одної матриці, наприклад м'язів ВРХ протягом початкової валідації, а метод передбачає застосування для аналогічної матриці іншого виду тварин, наприклад для м'язів свиней, не виключено, що можливе одержання додаткового матричного ефекту. Це робить неможливим застосування раніш встановленого значення ССβ для цієї матриці, що вимагає встановлення для нової матриці актуального значення ССβ. Також необхідно встановити ці показники для кожного аналіту, який включено в програму аналізу залишків, або принаймні для визначеної кількості аналітів, які є репрезентативними для даної групи (див.п. 3.3.1).

4.1.3.2 Складання схеми валідаційних досліджень. Наприклад, для одного типу матриць (м'язи) чотирьох різних видів тварин. Якщо регуляторна межа для усіх видів однакова і встановлений показник ССβ для однієї матриці, для інших видів ССβ може бути встановлений при аналізі 20 порожніх зразків (по

5 зразків кожного виду) та 20 збагачених на рівні *цільової концентрації скринінгу*, яка використовувалась при попередній валідації. Якщо всі порожні зразки не показують перевищення для раніш встановленого нульового рівня, а збагачені зразки, усі не нижчі за встановлену межу відсікання, або не більше ніж 5% з них вищі за *межу відсікання* – раніше встановлене значення ССВ використовується для всіх видів однієї матриці. Якщо у серії буде 10% або більше зразків, які виходять за встановлені межі відсікання, це означає що рівень ССВ для цих видів матриці вищий і валідацію необхідно провести окремо для м'яса кожного виду тварин із застосуванням вищої *цільової концентрації*.

У випадку розширення застосування методики на різні типи матриць, якщо ССВ було попередньо встановлено для іншого типу матриці, наприклад м'язів, можливо встановити цей показник для інших матриць, наприклад, для печінки використовуючи підхід описаний у гл.3.1.3 додатку рішення 2002\657. Альтернативний підхід можливий для встановлення ССВ, шляхом проведенням аналізу 20 порожніх зразків печінки та 20 зразків збагачених на рівні *цільової концентрації* (якщо *цільова концентрація*, яку було використано при встановленні показника ССВ для матриці м'яса, відповідає поставленому завданню з валідації для матриці печінки). Це вивчення необхідно проводити для кожного аналізу, або для вибраного репрезентативного аналізу з окремої групи аналітів. Якщо в попередній валідації вивчення було зроблено для усієї групи аналітів, розширення типів матриці необхідно також провести на усіх попередньо перевірених аналітах, або на одному репрезентативному аналіті з групи, якщо не передбачається збільшення впливу матричного ефекту. Якщо попередня валідація виконувалась за списком репрезентативних аналітів, то розширення переліку матриць можна проводити за тим же списком. В обох випадках використання тих самих аналітів доречно тільки у випадку, якщо вони стосуються даного випадку. Наприклад, якщо одна і та сама речовина є зареєстрована і для ВРХ і для овець, її використання можливе для валідації матриці м'язів.

4.1.3.3 Визначення стійкості. З метою визначення стійкості в дослідження навмисне включають зміни умов та спостерігають за наслідками цих змін. Вивчення стійкості необхідно проводити відповідно до рекомендацій рішення 2002/657/ЕС. Зміну показників, які впливають на стійкість необхідно вводити до експериментальних планів. Додаткові типи матриць та види тварин також можуть бути включені у плани, як додатковий фактор перевірки стійкості. У цьому випадку поєднуються вивчення застосовності та стійкості. При дослідженні стійкості методики бажано зосередитись на одному репрезентативному аналіті. При цьому необхідно дослідити принаймні 10 порожніх зразків і 10 збагачених аналітом на відповідно вибраному рівні. Також при цьому бажано проводити вивчення здатності виявлення і специфічності для цього вибраного аналізу у закритому «сліпому» тесті, при можливості в різний час, різними операторами. Якщо в результаті аналізу одержаних даних виявиться, що якийсь із факторів, що

знавали змін, вплинув на результати, необхідно визначити цей фактор та обумовити у СОП дотримання його стабільності протягом виконання методики, як обов'язкову вимогу СОП.

4.1.4 Визначення стабільності. У випадку коли стабільність аналіту відома з літератури, або з даних попередніх лабораторних досліджень, немає необхідності проводити вивчення цього питання повторно. З інформацією про стабільність аналіту в стандартних розчинах та в матриці необхідно бути ознайомленим до початку валідації, ця інформація повинна відповідати критеріям викладеним у 2002/657/ЕС.

4.1.5 Визначення специфічності та селективності. Специфічність, селективність та здатність виявлення має бути представлена у відповідності до всебічного матричного підходу, який описаний у главі 3.1.3 додатку до рішення 2002/657/ЕС. Використовуючи цей багатофакторний підхід можна зменшити кількість серій та комбінацій впливу факторів, необхідних для валідації.

Приклад застосування багатофакторного підходу:

В першу чергу необхідно дослідити 8 зразків, що передбачено статистичним проектом описаним у главі 3.1.3 додатка до рішення 2002/657/ЕС. Після цього початкового вивчення валідації зразки контролю якості доцільно використовувати в подальшій валідації. Також принаймні 20 зразків контролю якості щорічно мають бути досліджені (дивись частину 6.3.1). Якщо це не можливо, як мінімум, вісім зразків мають досліджуватись щорічно або стільки багато, скільки можливо. Після закінчення року одержані протягом року результати можуть бути статистично порівняні з попередніми даними та/або даними одержаними при початковій валідації методики. Приклад процедури валідації представлений відповідно до альтернативного підходу представленого у додатку Е.

5. ПЕРЕДАЧА МЕТОДИКИ ДО ЛАБОРАТОРІЇ РЕЦИПІЄНТА

При впровадженні нової методики розробник повинен підтвердити відповідність її усім критеріям зазначеним у попередніх пунктах вказівок. Вся зазначена інформація повинна бути представлена до референсної лабораторії. При передачі скринінгової методики від референсної лабораторії до лабораторії яка буде проводити рутинні визначення, ціль скороченої валідації полягає в тому, щоб продемонструвати те, що лабораторія-реципієнт в стані правильно застосувати переданий метод відповідно до СОП. СОП яка використовується в лабораторії реципієнта не повинна відрізнятись від СОП лабораторії - розробника. У випадку застосування обладнання різних виробників, необхідно звертати увагу на різниці у технічних характеристиках обладнання.

5.1 Умови передачі. При передачі методики у лабораторію реципієнт може бути використано скорочений протокол валідації за умов, що в лабораторії реципієнта наявне усе необхідне обладнання і її спеціалісти мають потрібні навички по виконанню методик, мають доступ до СОП та результатів попередньої валідації.

Якщо устаткування, або стандартні зразки відрізняються від таких що були використані у лабораторії розробника, лабораторія реципієнта повинна перевірити чи ці відмінності є критичними для проведення валідації. Якщо ці відмінності не впливають на результат можливо використання СОП лабораторії - розробника. Якщо відмінності незначні і не впливають на результат вони можуть бути зазначені у зміні СОП. Якщо відмінності значні це може вимагати проведення повної валідації при передачі методики. При виборі аналіту для валідації можливо використовувати цільовий аналіт який використовувала лабораторія – розробника, але у випадку більшої зацікавленості лабораторії реципієнта іншим аналітом, більш доцільно використовувати його для валідації. Скорочену валідацію в цьому випадку можна проводити тільки, якщо вибраний аналіт не суперечить вказаному у СОП на методику і попереднє дослідження було проведено в лабораторії розробника.

У випадку коли лабораторія-реципієнт бажає розширити можливості методики, необхідно провести повну валідацію за усіма новими матрицями та аналітами.

Ця робота має проводитись за наявними в літературі даними щодо можливості методу до вибраних аналітів та матриць та даними, що публікують ISO, AOAC, AFNOR).

Необхідно оцінити рівень підготовки персоналу, щодо їх здатності правильно виконувати методику. Персонал повинен пройти навчання з основ використання методу і перед проведенням валідації виконати серію тестів на негативних та позитивних зразках.

5.2 Скорочена схема валідації. Якщо виконані умови п.5.1, валідація у лабораторії-реципієнті може бути виконана за скороченою схемою. Протягом валідації необхідно визначити тільки специфічність та здатність виявлення на зменшеній кількості зразків (20 зразків незалежно від цільової концентрації скринінгу). Одержані дані необхідно порівняти з даними, одержаними у лабораторії розробника. Якщо одержані дані знаходяться в межах того ж порядку, що і дані лабораторії-розробника, валідація, вважається успішною.

5.3 Альтернативна концепція валідації. Для виконання скороченої валідації мають бути обов'язково виконані вимоги зазначені в п.5.1. Основний принцип скороченої валідації – це застосування комбінованого використання одержаних даних, що дозволяє значно скоротити робоче навантаження на лабораторію при впровадженні нової методики. В той же час слід зауважити, що комбіноване застосування даних можливо тільки за відсутності істотних розходжень. Якщо *внутрішня відтворюваність*,

отримана при валідації під час передачі методики, гірша ніж 1,5 кратна внутрішня відтворюваність початкової валідації, лабораторія реципієнт повинна повністю переглянути порядок виконання методики в лабораторії. Для того, щоб максимально зменшити робоче навантаження застосовується стратегія комбінованої валідації. Статистичний проект скороченої валідації еквівалентний процесу початкової валідації але виконується тільки на одному вибраному рівні концентрації. Це передбачає дослідження тільки 8 зразків. Зразки мають бути збагачені на рівні МДР або близькому для цього значення. Додатково потрібно використовувати зразки гарантії якості. Протягом року необхідно виконати контроль щонайменше 20 зразків контролю якості. У випадку відсутності такої можливості щонайменше 8 валідаційних зразків щорічно.

6. БЕЗПЕРЕРВНЕ ПІДТВЕРДЖЕННЯ

6.1 Зразки контролю якості (QC). Виконання аналізу зразків контролю якості надзвичайно важливе для отримання додаткової інформації про придатність методики одержаної при її валідації. Кожна серія зразків контролю якості повинна включати як зразки скринінг-негативного контролю так і зразки скринінг- позитивного контролю збагачені на рівні цільової концентрації. Якщо при аналізі зразків скринінг-позитивного контролю, одержується негативний результат, а при аналізі скринінг негативного контролю – позитивний результат від результатів аналізу одержаних в цій серії досліджень необхідно відмовитись та негайно провести розслідування причин невідповідності та застосувати коригувальні дії для їх виправлення. Результати досліджень повинні постійно реєструватись для підтвердження того, що кількість помилково-відповідних результатів не перевищує 5% для цільових аналітів. При виборі аналітів для рутинного контролю якості аналізів використовують такий же підхід, як і у випадку з первинною валідацією – вибирають аналіт з найгіршим витягом та найвищим рівнем межі чутливості або найбільш проблемний за результатами попереднього скринінгу аналіт (див. п.3.3.1).

Мета безперервного підтвердження полягає в тому, щоб одержати не менше ніж 20 результатів аналізу зразків контролю якості протягом року Протягом цього періоду зразки, що використовувались мають бути стабільними, що має бути підтверджено.

Дані контролю стабільності повинні зберігатись в лабораторії протягом усього періоду застосування методу в лабораторії. Ці дані також можна використовувати для доповнення даних початкової та скороченої валідації. Ці дані додатково підтверджують:

- стабільність робочих характеристик методу;
- якість комерційно-доступних серій тест-наборів;
- навички роботи операторів;
- якість та стабільність реактивів.

Протягом 12 місяців рутинного використання методу в лабораторії, необхідно статистично проаналізувати всі доступні дані валідації (від початкової, скороченої до даних рутинного контролю якості). Якщо кількість даних рутинного контролю менша за 20, повинні бути також проаналізовані додаткові

зразки валідації. Сума результатів початкової, скороченої та рутинної валідації має бути щонайменше 40 зразків протягом першого року. Потім контроль якості має сягати 20 зразків, з яких не більше ніж для одного має бути одержаний невідповідний результат. Якщо протягом тривалого періоду методика показує стабільні значення для зразків контролю якості, кількість таких зразків досліджених протягом року можна зменшити.

6.2 Професійне тестування. Участь у професійному тестуванні, яке проводять референсні лабораторії за вибраними аналітами або застосування комерційно доступних референсних матриць, також дає додаткову інформацію для оцінки придатності методу. Щоразу при одержанні сумнівних або недостовірних результатів, необхідно проводити розслідування, які повинні встановити причину невідповідностей.

7. ЗВІТ ПРО ВАЛІДАЦІЮ

При проведенні валідації необхідно скласти звіт в якому має міститись інформація про:

- діапазон методики та застосованих концентрацій методики, включаючи стійкість;
- матрицю, вид тварин, умови модифікації матриці в процесі підготовки зразка та умови лабораторії;
- описання проекту валідації, включаючи розрахунки та формули використані при розробці експериментального плану;
- ідентифікацію умов, які впливають на результат виконання аналізу;
- фактори зовнішнього впливу, які виникали протягом валідації і могли вплинути на одержані результати;
- результати контролю якості також можуть бути додані як окремий додаток до звіту;
- при складанні звіту корисно мати дані про первинну валідацію методики, додатково в звіті необхідно задокументувати джерело надходження методики та якщо існують додаткові літературні посилання на результати, одержані даною методикою в інших лабораторіях;
- результати валідації, виконані в лабораторії, які підтверджують вірогідність одержаних результатів.

Приклад оформлення звіту про валідацію наведено в додатку Г.

Висновки

Враховуючи наявність на світовому ринку широкого асортименту тест-систем для імуноферментного визначення залишкових кількостей ветеринарних препаратів та їх метаболітів, мікотоксинів та інших забруднювачів в харчовій сировині тваринного походження, та зважаючи на їх відмінності у їх застосуванні, викладені вище підходи до валідації дозволяють скласти оптимальну з точки зору аналітики послідовність дій при проведенні оцінки придатності методики.

Урахування зменшення економічних витрат, при проведенні валідації методик, покладає важливі завдання на референсні лабораторії, які повинні перевірити відповідність нових методик усім критеріям, яким повинні відповідати методики згідно міжнародних вимог [1,2]. Інформація одержана від виробника тест систем, а також при проведенні розширеного порядку валідації, може значно скоротити кількість випробувань, які можуть бути виконані в лабораторіях-реципієнта за скороченою процедурою.

9. ДОДАТКИ

Додаток А

Перелік методичних вказівок по застосуванню тест - систем ІФА для контролю показників безпеки тваринницької сировини, затверджених Державним комітетом ветеринарної медицини України протягом 2002-2010 років, які було валідовано з використанням підходів запропонованих методичними вказівками*

<i>№ n/n</i>	<i>Назва методики</i>	<i>НД на метод</i>
1	Методика з кількісного визначення тестостерону в зразках м'яса і плазми крові	МВ № 15-14/340 від 06.08.02
2	Методика з кількісного визначення 17В естрадіолу в зразках м'яса і плазми крові	МВ № 15-14/341 від 06.08.02
3	Методика з кількісного визначення кленбутеролу в зразках м'яса, печінки, очного яблука і сечі	МВ № 15-14/343 від 06.08.02
4	Методика з кількісного визначення диетилстильбестролу у зразках м'яса, печінки, жовчі, сечі та фекалій	МВ № 15-14/346 від 06.08.02
5	Методика з кількісного визначення сульфаметазину у зразках м'яса, молока та яєць	МВ № 15-14/345 від 06.08.02
6	Методика з кількісного визначення зеранолу в зразках м'яса, печінки, нирок і сечі	МВ № 15-14/319 від 31.07.03
7	Методика з кількісного визначення афлатоксину В1 у зерні, продуктах його переробки та комбікормах	МВ № 15-14/317 від 31.07.03
8	Методика з кількісного визначення метроксипрогестерону та інших ацетилгестагенів у зразках жирової тканини	МВ Наказ ДДВМ № 34 від 02.04.04
9	Методика з кількісного визначення івермектину у зразках тканин	МВ Наказ ДДВМ № 34 від 02.04.04
10	Методика з кількісного визначення фумонізину у зразках злаків	МВ Наказ ДДВМ № 34 від 02.04.04
11	Методика з кількісного визначення токсину Т2 у зразках злаків і кормах	МВ Наказ ДДВМ № 115 від 07.10.04
12	Методика з кількісного визначення деоксиніваленолу у зразках злаків, солоду, кормах	МВ Наказ ДДВМ № 115 від 07.10.04
13	Методика з кількісного визначення афлатоксину М1 у зразках цільного молока, сухого молока і сири	МВ Наказ ДДВМ № 115 від 07.10.04

<i>№ n/n</i>	<i>Назва методики</i>	<i>НД на метод</i>
14	Методика з кількісного визначення охратоксину А у зразках зерна, кормах, пиві і сироватці крові свиней	МВ Наказ ДДВМ №115 від 07.10.04
15	Методика з кількісного визначення зеараленону у зразках злаків, кормах, пиві, сироватці крові і сечі	МВ Наказ ДДВМ №115 від 07.10.04
16	Методика з кількісного визначення 19-нортестостерону в зразках м'яса і сечі.	МВ Наказ ДДВМ № 92 від 18.10.05
17	Методика з кількісного визначення метилтестостерону в зразках м'яса і сечі	МВ Наказ ДДВМ № 92 від 18.10.05
18	Методика з кількісного визначення етинілестрадіолу в сироватці і сечі	МВ Наказ ДДВМ № 92 від 18.10.05
19	Методика з кількісного визначення бета-агоністів в зразках м'яса, печінки, очного яблука і сечі	МВ Наказ ДДВМ № 92 від 18.10.05
20	Методика кількісного визначення тренболону в м'ясі, тканинах, сироватці, сечі та фекаліях	МВ Наказ ДДВМ № 92 від 18.10.05
21	Методика кількісного визначення меленгестролацетату в нирковому жирі та м'ясі.	МВ Наказ ДДВМ № 92 від 18.10.05
22	Методика кількісного визначення кортикостероїдів у молоці, сечі і кормах	МВ Наказ ДДВМ № 92 від 18.10.05
23	Методичні вказівки по застосуванню скринінг - тесту для виявлення загального афлатоксину у зразках горіхів та зернових культур тест-системою Афлокард Тотал (AFLOCARD TOTAL)	МВ ДДВМ України № 92 від 18.10.2005 року
24	Методика кількісного визначення фторхінолонів в м'ясі, яйцях та молоці.	МВ Наказ ДДВМ №98 від 15.12.06
25	Кількісне визначення сульфаніламідів у зразках м'яса, молока та меду тест-системою Рідаскрін® сульфаніламід (Ridascreen® Sulfonamidae) (виробництво фірми Р-Біофарм / R-Biopharm, Німеччина)	МВ Наказ ДКВМ від 23-24.12.09

<i>№ n/n</i>	<i>Назва методики</i>	<i>НД на метод</i>
26	Проект змін. Кількісне визначення хлорамфеніколу у зразках м'яса, молока, яєць та меду тест-системою Рідаскрін® Хлорамфенікол (Ridasgreen® Chloramphenicol) (виробництво фірми Р-Біофарм /R-Biopharm, Німеччина)	МВ Наказ ДКВМ від 23-24.12.09
27	Проект змін. Кількісне визначення стрептоміцину і дигідрострептоміцину у зразках м'яса, молока та меду тест-системою Рідаскрін® Стрептоміцин (Ridasgreen® Streptomycin) (виробництво фірми Р-Біофарм /R-Biopharm, Німеччина)	МВ Наказ ДКВМ від 23-24.12.09
28	Проект змін. Кількісне визначення тетрацикліну у зразках м'яса, молока та меду тест-системою Рідаскрін® Тетрациклін (Ridasgreen® Tetracyclin) (виробництво фірми Р-Біофарм /R-Biopharm, Німеччина)	МВ Наказ ДКВМ від 23-24.12.09
29	Проект змін. Визначення залишкових кількостей нітрофурану (АОЗ) у зразках м'яса, креветках, печінці, рибі, молоці та меді тест-системою Рідаскрін® Нітрофуран (Ridasgreen® Nitrofurantoin (AOZ)) (виробництво фірми Р-Біофарм /R-Biopharm, Німеччина)	МВ Наказ ДКВМ від 23-24.12.09
30	Проект змін. Визначення залишкових кількостей нітрофурану (АМОЗ) в зразках м'яса, креветках, печінці, рибі, молоці та меді тест-системою Рідаскрін® Нітрофуран (Ridasgreen® Nitrofurantoin (AMOZ)) (виробництво фірми Р-Біофарм /R-Biopharm, Німеччина)	МВ Наказ ДКВМ від 23-24.12.09

*- за необхідності одержання валідаційних даних необхідних для процесу скороченої валідації у лабораторії реципієнта, можна одержати в лабораторії інструментальних методів контролю ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, за адресою: 79019, вул. Донецька, 11, Львів;. Тел/факс 0322523152; yandmyt@scivp.lviv.ua

Додаток Б

Визначення рівня відсікання та графічне подання здатності виявлення - (ССВ) для напівкількісних методик.

Приклад 1.

При визначенні залишків хлорамфеніколу, за відсутності МДР *регуляторною межею* можна вважати *МНМВ*, яка згідно з рішенням Єврокомісії 2003/181 від 13.03.03 та наказу ДДВМ №52 від 04.07.03 становить 0,3 мкг/кг.

Враховуючи рекомендації п.5.1.1 вибирають *цільову концентрація скринінгу* на рівні 0,15 мкг/кг.

Готують 20 порожніх зразків та 20 зразків збагачених хлорамфеніколом на вибраному рівні *цільової концентрація скринінгу* – 0,15 мкг/кг. Одержані результати представлені в таблиці Б1

Таблиця Б1

№ зразка	Відповідь порожнього зразка	Відповідь зразка збагаченого на рівні <i>цільової концентрації скринінгу</i>
1	25,49	158,71
2	29,98	148,9
3	20,13	182,84
4	28,16	160,42
5	28,69	163,91
6	33,43	165,12
7	31,19	159,18
8	21,25	165,2
9	27,42	173,33
10	24,19	182,46
11	28,31	177,62
12	26,27	180,2
13	30,7	174,38
14	23,76	152,62
15	25,28	163,91
16	31,24	189,83
17	36,01	162,95
18	25,7	173,68
19	30,3	162,95
20	21,72	179,83

При аналізі даних представлених в табл. Б1, одержаних протягом кількох днів визначають найменші значення для збагачених зразків (148,9) та найбільші значення для порожніх зразків (36,01).

В представленому випадку жодний з результатів діапазонів відповіді порожніх та збагачених зразків не перекривається, з чого можна зробити висновок про те, що здатність виявлення - (ССβ) для даної методики менша, або дорівнює 0,15 мкг/кг.

На даному прикладі можна показати, що найменше значення відповіді збагаченого зразка становить 148,9, тому будь-який результат, що має значення більше за цей рівень і перевищує здатність виявлення - (ССβ), можна вважати скринінг-позитивним а значення 148,9 є *межею відсікання*.

Значення відповіді які дорівнюють або перебільшують значення *межі відсікання* на 0,25 одиниці ($\geq 0,25$) можна вважати такими, що не відповідають та потребують додаткового підтвердження результату підтверджуючим методом.

Приклад 2

При визначенні залишків хлорамфеніколу, *цільова концентрація скринінгу* вибрана на рівні 0,15 мкг/кг.

Готують 20 порожніх зразків та 20 зразків збагачених хлорамфеніколом на вибраному рівні *цільової концентрація скринінгу* – 0,15 мкг/кг. Одержані результати представлені в таблиці Б2

В представленому випадку відмічаємо перекривання значень з діапазонів відповіді порожніх та збагачених зразків. Кількість зразків, значення яких перекриваються складає більше ніж 5% вибірки. Встановити межу відсікання в даному випадку неможливо, з чого можна зробити висновок про те, що здатність виявлення - (ССβ) для даної методики більша за 0,15 мкг/кг. *Цільова концентрація скринінгу* 0,15 мкг/кг не може бути вірогідно виявлена даною методикою.

В даному випадку методика потребує змін з метою збільшення межі виявлення або необхідно змінити *цільову концентрацію скринінгу*, яка повинна бути встановлено в діапазоні 50-90% від концентрації *регуляторної межі* див. п.4.1.2

Таблиця Б2

№ зразка	Відповідь порожнього зразка	Відповідь зразка збагаченого на рівні цільової концентрації скринінгу
1	125,49	158,71
2	129,98	132,9
3	120,13	182,84
4	128,16	160,42
5	128,69	135,91
6	133,43	165,12
7	131,19	159,18
8	121,25	165,2
9	127,42	173,33
10	124,19	182,46
11	128,31	177,62
12	126,27	180,2
13	130,7	174,38
14	123,76	152,62
15	125,28	163,91
16	131,24	189,83
17	136,01	162,95
18	125,7	173,68
19	130,3	162,95
20	121,72	179,83

Додаток В

Визначення рівня відсікання та графічне подання здатності виявлення - (ССβ) для напівкількісних методик

Граничне значення T :

$$T = B + 1,64 \times SDb \text{ або } \text{технічний поріг.}$$

де:

B – середнє значення відповіді;

SDb - стандартне відхилення значень порожніх зразків.

Фактор відсікання Fm :

$$Fm = M - 1,64 \times SD \text{ де:}$$

M – середнє значення відповіді;

SD - стандартне відхилення значень збагачених зразків.

При використанні методу ELISA відповідь $B/B_0\%$ (відсоток відношення оптичного поглинання одержаного значення до стандартного зразка з нульовою концентрацією аналіту) обернено-пропорційно до одержаної концентрації

Тому:

$$Fm = M + 1,64 \times SD$$

Значення T та Fm є специфічними для кожної матриці

Графічне подання технічного порогу T методики та межі відсікання Fm представлено на рис.В1

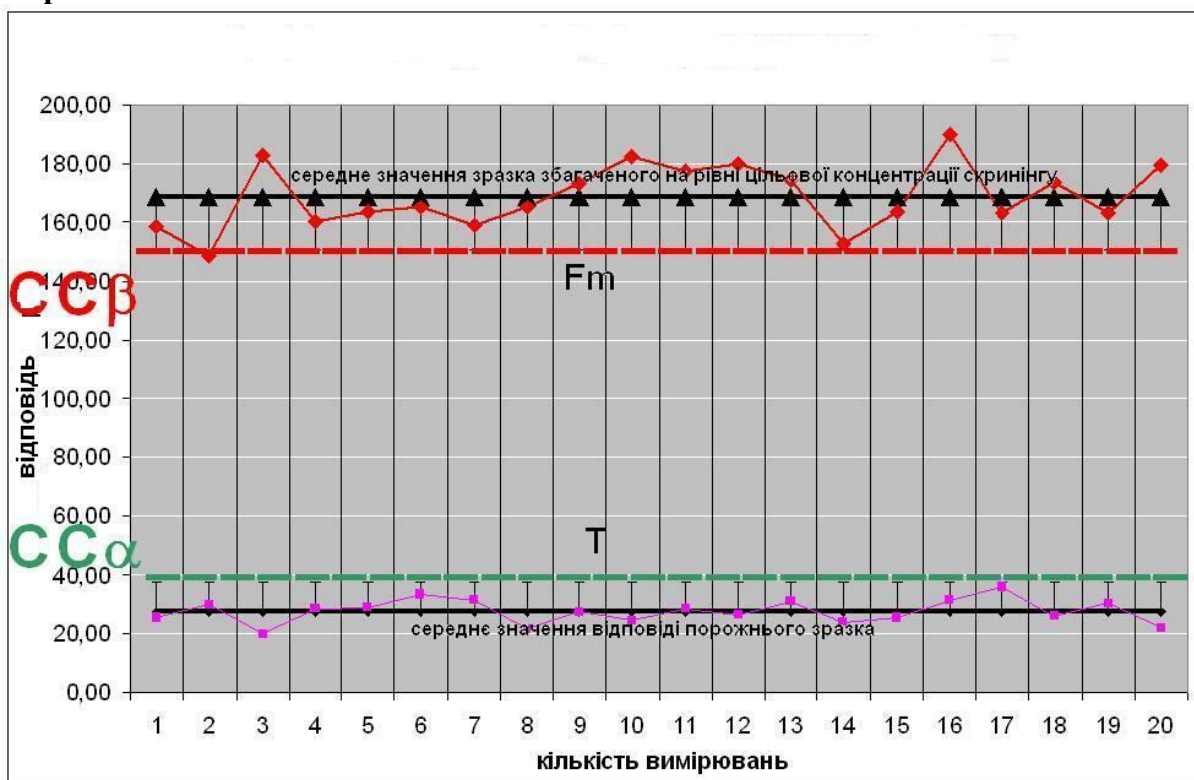


Рис.В1 Графічне подання технічного порогу T методики та межі відсікання Fm *

Між середнім значення відповіді холостих зразків B та технічним порогом T рівень помилково-позитивних результатів скринінгу більша за 5%.

Відповідно до рішення 2002/657 здатність виявлення методики відповідає критеріям коли $Fm > B$;

також важливо встановити межу помилково-позитивних результатів для методики (FP).

коли $B < Fm < T$ - рівень помилково-позитивних більший за 5%;

якщо $Fm > T$ – межа FP менша за 5%;

*** - Порядок встановлення технічного порогу - найвищого значення межі відповіді порожнього зразка з врахуванням похибки вимірювання, подібний до встановлення значення $СС\alpha$ – мінімальної виявленої кількості аналіту з достовірністю похибки α , але, оскільки для скринінгових методів встановлення числового значення $СС\alpha$ не обов'язкове [1], при оцінці придатності скринінгового методу значення технічного порогу встановлюється для кожної індивідуальної матриці з метою наступної оцінки можливості збагачення зразка аналітом;**

Додаток Г

Приклад проведення валідації тест-системи для імуноферментного визначення залишкових кількостей ветпрепаратів, передбачених Планом державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктів тваринного походження із застосуванням викладених у методичних вказівках підходів.

Приклад 1

аналіт – хлорамфенікол;

кількість видів тварин передбачених планом – 4(коні, ВРХ, свині, птиця);

загальна кількість матриць/видів – 4 типи: м'язи (4), молоко (1).

Крок 1

Розрахунок кількості зразків для проведення повної валідації тест-системи для визначення хлорамфеніколу

Мінімальна кількість зразків які треба дослідити для одержання межі відсікання та обчислення ССВ для однієї матриці – 40 (20 порожніх + 20 збагачених аналітом).

Розрахунок загальної кількості зразків для усіх видів тварин та типів матриць:

м'язи – 5 видів тварин – 100 зразків:

молоко – 1 вид – 20 зразків;

Загальна кількість зразків – 120.

Крок 2

Вибір цільового аналіту: за наявною інформацією тест-система селективна та не має перехресної чутливостями з іншими представниками групи амфеніколів. Цільовий аналіт – хлорамфенікол.

Крок 3

Вибір цільової концентрації

Спираючись на інформацію про *робочі характеристики методики*, викладені в СОП [3] та рішення Єврокомісії 2003/181 від 13.03.03 та наказу ДДВМ №52 від 04.07.03 розраховуємо цільову концентрацію:

регуляторна межа - 300 нг/кг

Чутливість методики - 50 нг/кг

Відповідно до п.3.2 та 5.1.1 вибираємо цільову концентрацію для скринінгу - 150 нг/л.

Крок 4

Відповідно до п.5.1.1 та, вибираємо кількість зразків для випробувань – 20.

Крок 5

Вибір матриці для першого кроку валідації. Вибираємо матрицю яка відповідно до описаної в СОП процедури не вимагає кроку підготовки зразка з використанням екстрагентів - (молоко незбиране).

Крок 6.

Проводимо визначення вмісту хлорамфеніколу в 20 *порожніх пробах* молока.

Крок 7

Використовуючи розчин для збагачення *Ridascreen Chloramphenicol Spiking Solution, Product Code R1599* з концентрацією 5 нг/мл. Готуємо *випробувальний збагачений лабораторний зразок* з концентрацією аналіту на рівні 150 нг/л:

- в мірну колбу об'ємом 10 мл вносимо 2 мл розчину для збагачення та доводимо об'єм дистильованою водою до мітки, перемішуємо – одержаний розчин містить 1000 нг/л хлорамфеніколу;
- в мірну колбу об'ємом 10 мл вносимо 1,5 мл розчину з концентрацією 1000 нг/л хлорамфеніколу та доводимо об'єм порожнім зразком молока до мітки, одержаний *випробувальний збагачений зразок* містить 150 нг/л хлорамфеніколу).

Крок 8

Проводимо визначення вмісту хлорамфеніколу в 20 *випробувальних порціях збагачених зразків* молока.

Крок 9

Проводимо визначення статистичних показників для серій з 20 *порожніх проб* молока та 20 *збагачених лабораторних зразків* молока.

Крок 10

За результатами одержаних статистичних даних вираховуємо значення *та здатності виявлення ССВ* (табл.Д1) та встановлюємо *межу відсікання* (рис.Д1). Відповідно до рішення 2002/657 [1] здатність виявлення методики відповідає критеріям;

Крок 11

Враховуючи результати статистичних даних щодо *здатності виявлення ССВ* для попередньої матриці та враховуючи рекомендації п.4.1.3.2 щодо можливості зменшення кількості зразків готуємо наступну серію порожніх зразків м'яса для 4 видів тварин зазначених у плані (5 зразків - ВРХ, 5 зразків – свині, 5 зразків – коні, 5 зразків – птиця).

Крок 12

Проводимо визначення вмісту хлорамфеніколу в 20 *порожніх пробах* м'яса різної видової приналежності.

Крок 13

Використовуючи розчин для збагачення *Ridascreen Chloramphenicol Spiking Solution, Product Code R1599* з концентрацією 5 нг/мл. Готуємо збагачені лабораторні зразки з концентрацією аналіту на рівні 100 нг/кг:

- в мірну колбу об'ємом 10 мл вносимо 2 мл розчину для збагачення та доводимо об'єм дистильованою водою до мітки, перемішуємо – одержаний розчин містить 1000 нг/л хлорамфеніколу;
- на етапі приготування зразка див. п.12.5.2 [3] в пробірку об'ємом 15 мл вносимо 0,3 мл розчину з концентрацією 1000 нг/л хлорамфеніколу та виконуємо процедуру підготовки зразка у відповідності до рекомендацій збагачений лабораторний зразок містить 100 нг/кг хлорамфеніколу).

Крок 14

Проводимо визначення вмісту хлорамфеніколу в 20 збагачених лабораторних зразках м'яса різної видової приналежності.

Крок 15

Проводимо визначення статистичних показників для серій з 20 порожніх проб м'яса та 20 збагачених лабораторних зразків м'яса.

Крок 16

За результатами одержаних статистичних даних вираховуємо значення та здатності виявлення ССВ (табл.Д2) та встановлюємо межу відсікання (рис.Д2).

Крок 16

Оформлення звіту про валідацію.

Таблиця Г1

RIDASCREEN No.1505, Lot No.13130, Exp.:2011-04							
2,2335				2,165			
В0				В0			
Порожній зразок (молоко ВРХ незбиране)				визначення не менше ніж 95 % зразків збагачених 150 нг/кг хлорамфеніколу			
№ Зразка	DO	% (B/B0)	нг/кг конц.	№ Зразка	DO	% (B/B0)	нг/кг конц.
	1,867	83,591	25,49	1	0,723	33,372	158,71
2	1,747	78,196	29,98	2	0,756	34,896	148,90
3	2,033	91,023	20,13	3	0,654	30,185	182,84
4	1,793	80,278	28,16	4	0,718	33,164	160,42
5	1,779	79,651	28,69	5	0,707	32,656	163,91
6	1,664	74,502	33,43	6	0,710	32,794	165,12
7	1,716	76,808	31,19	7	0,722	33,326	159,18
8	1,997	89,389	21,25	8	0,703	32,448	165,20
9	1,813	81,151	27,42	9	0,680	31,386	173,33
10	1,906	85,315	24,19	10	0,654	30,208	182,46
11	1,789	80,099	28,31	11	0,667	30,785	177,62
12	1,845	82,583	26,27	12	0,660	30,485	180,20
13	1,909	85,471	30,70	13	0,676	31,224	174,38
14	1,729	77,390	23,76	14	0,745	34,388	152,62
15	1,918	85,874	25,28	15	0,707	32,633	163,91
16	1,982	88,717	31,24	16	0,637	29,400	189,83
17	1,874	83,882	36,01	17	0,710	32,794	162,95
18	1,715	76,763	25,70	18	0,898	41,455	173,68
19	1,609	72,017	30,30	19	1,087	50,208	162,95
20	1,861	83,322	21,72	20	0,683	31,547	179,83
Середнє значення (M₁)	1,827	81,801	27,46	Середнє значення (M₂)	0,725	33,468	168,90
Стандартне відхилення (m₁)	0,113	5,054	4,15	Стандартне відхилення (m₂)	0,101	4,687	10,99
M₁ + 2,33 m₁ T*			37,13	M₂ - 1,64 m₂ (ССβ)	0,891	41,155	150,87
M₁ - 2,33 m₁ T*	1,564	70,025		M₂ + 1,64 m₂	0,558	25,781	186,93
m₁ (%)	6,179	6,179	15,12	m₂ (%)	14,005	14,005	6,51

** T – технічний поріг. Порядок встановлення технічного порогу - найвищого значення межі відповіді порожнього зразка з врахуванням похибки вимірювання, подібний до встановлення значення ССа – мінімальної виявленої кількості аналіту з достовірністю похибки α, але, оскільки для скринінгових методів встановлення числового значення ССа не обов'язкове [1], при оцінці придатності скринінгового методу значення технічного порогу встановлюється для кожної індивідуальної матриці з метою наступної оцінки можливості збагачення зразка аналітом;*

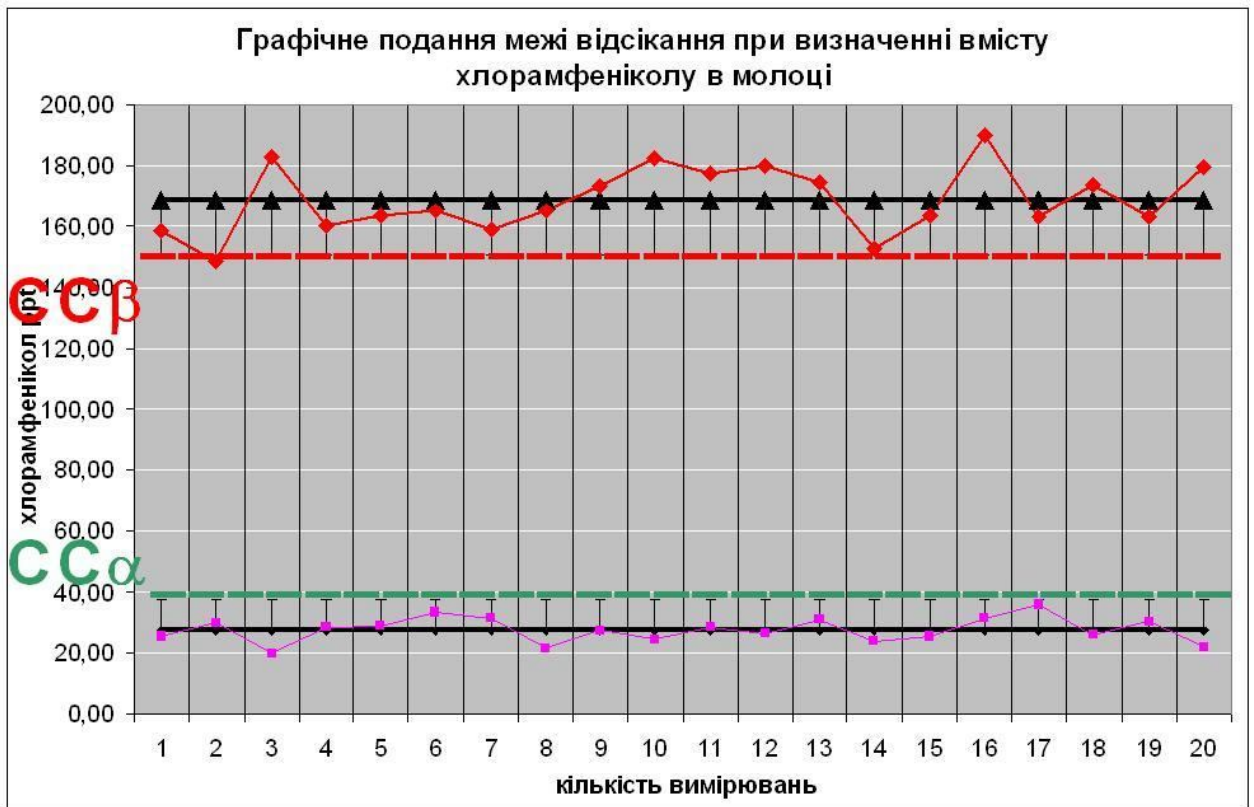


Рис.Г1 Графічне подання межі відсікання при визначенні вмісту хлорамфеніколу в молоці

Таблиця Г2

ELISA Chloramphenicol R1505 Lot: 04318							
B0 2,046				B0 1,093			
Порожній зразок (м'ясо)				визначення не мен. 95 % зразків м'яса збагачених на рівні 100,0 нг/кг хлорамфеніколу			
№ зразка	DO	% (B/B0)	Conc	№ зразка	DO	% (B/B0)	Conc
1	1,489	72,75	18,40	1	0,543	28,07	107,10
2	1,540	75,24	16,20	2	0,552	28,53	105,30
3	1,473	71,97	19,10	3	0,561	29,02	103,30
4	1,435	70,11	21,00	4	0,540	27,94	107,50
5	1,517	74,14	17,10	5	0,546	28,22	106,50
6	1,783	87,12	7,20	6	0,553	28,61	104,90
7	1,498	73,19	18,00	7	0,542	28,04	107,10
8	1,575	76,98	14,70	8	0,558	28,84	104,10
9	1,576	77,00	14,70	9	0,574	29,69	100,80
10	1,531	74,80	16,60	10	0,611	31,58	94,24
11	1,633	79,81	12,40	11	0,542	28,04	107,10
12	1,665	81,38	11,20	12	0,607	31,38	94,90
13	1,691	82,65	10,30	13	0,578	29,88	100,30
14	1,670	81,62	11,00	14	0,605	31,27	95,30
15	1,611	78,71	13,30	15	0,581	30,03	99,70
16	1,206	58,94	34,11	16	0,573	29,64	101,00
17	1,249	61,02	31,40	17	0,623	32,23	92,00
18	1,247	60,92	31,40	18	0,539	27,88	107,70
19	1,068	52,17	44,50	19	0,579	29,93	100,10
20	1,257	61,44	30,80	20	0,605	31,30	95,10
Середнє значення (M1)	1,485	72,60	19,67	Середнє значення (M2)	0,570	29,51	101,70
Стандартне відхилення (m1)	0,189	9,23	9,71	Стандартне відхилення (m2)	0,027	1,41	5,14
M+ 2,33 m T	1,925	94,10	42,30	M2 - 1,64 m (CCb)	0,526	27,19	93,27
M- 2,33 m T	1,045	51,10	-2,96	M2 + 1,64 m	0,615	31,82	110,13
m1 (%)	12,712	12,71	49,37	m2 (%)	4,778	4,78	5,05

Відповідно до рішення 2002/657 [1] здатність виявлення методики відповідає критеріям;

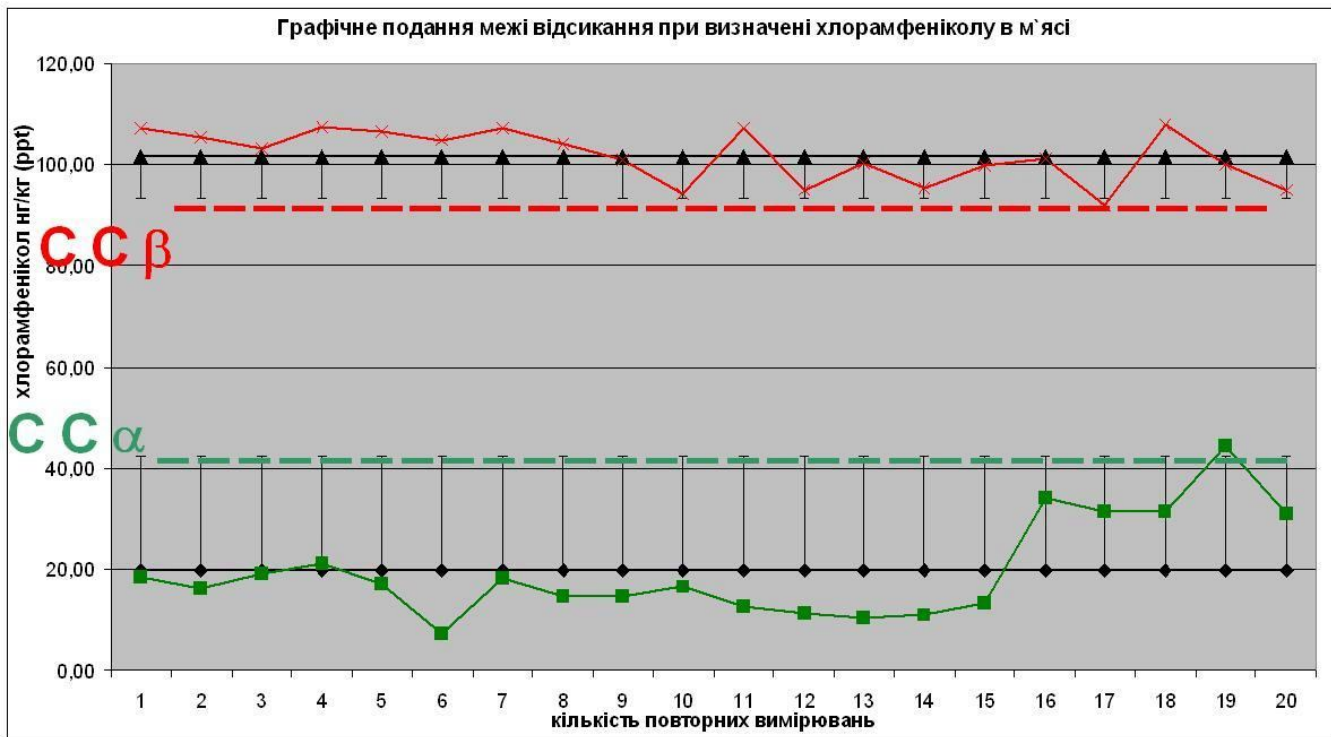


Рис.Г2 Графічне подання межі відсікання при визначенні вмісту хлорамфеніколу в м'ясі різної видової приналежності: зразки 1-5- яловичина; 6-10 – свинина; 11-15 – конина; 16-20 – курятина.

Звіт про оцінку придатності методики

Дата заповнення _____ Оператор _____

Метод підготовки проби _____ Довжина хвилі (нм) _____

Прилад _____ Серійний номер _____

Набір _____ Серія / Придатний _____

Дата проведення аналізу _____ Адреса первинного файлу _____

Матриця _____ Аналіт _____

Температура прим ° С. _____ Атм. тиск. _____ Відн. Вологість% _____

Мета: Встановлення відповідності критеріям (2002/657/ЕС)

Аналіз 2 дослідних зразків (А, Б)

А: 0.0 (порожня проба)

Б: ССа (збагачена проба нг/кг(ppt))

МНМВ - 300 нг/кг (ppt)

I. Розрахунок технічного порогу шляхом аналізу нульової матриці

Схема розташування проб 1

1.) Для зразка А

	1	2	3	4	5	6	7	8
А	Std1		А		А		А	
В	Std2		А		А		А	
С	Std3		А		А			
Д	Std4		А		А			
Е	Std5		А		А			
Ф	Std6		А		А			
Г	А		А		А			
Н	А		А		А			

**Розрахунок технічного порогу
(протокол аналізу від)**

Повтор	Концентрація нг/кг
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
Середнє значення	
Стандартне відхилення (S.D.)	
2,33 * S.D.	
CV	
СС_α	

**II. Розрахунок ССВ шляхом фортифікації нульової матриці
_____ концентрацією на рівні (_____ нг/кг, (ppt))
Схема розташування проб 2**

2.) Для зразка Б

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Std1		Б		Б		Б	
B	Std2		Б		Б		Б	
C	Std3		Б		Б			
D	Std4		Б		Б			
E	Std5		Б		Б			
F	Std6		Б		Б			
G	Б		Б		Б			
H	Б		Б		Б			

Розрахунок ССВ
(протокол аналізу від _____)

Повтор	Концентрація $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
Середнє значення	
Стандартне відхилення (S.D.)	
1,64 * S.D.	
CV	
ССВ	

Методика відповідає критеріям (2002/657/ЕС) для скринінгових методик при межі чутливості встановленому законодавством на рівні МНМВ –300 нг/кг (ppt)

Виконавці: _____

9. ПОСИЛАННЯ

1. ISO 17025: 1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories. COMMISSION DECISION of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (*notified under document number C(2002) 3044*) (Text with EEA relevance) (2002/657/EC) Official Journal of the European Communities 17.8.2002.
2. COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES RESIDUES (CRLs) 20/1/2010 GUIDELINES FOR THE VALIDATION OF SCREENING METHODS FOR RESIDUES OF VETERINARY MEDICINES (INITIAL VALIDATION AND TRANSFER)
3. Кількісне визначення хлорамфеніколу у зразках м'яса, молока, яєць та меду тест-системою Рідаскрін® Хлорамфенікол (Ridascreen® Chloramphenicol) (виробництво фірми Р-Біофарм /R-Biopharm, Німеччина), методічні вказівки затверджені Наказом ДДВМ від 23-24.12.09.
4. ISO Guide 43-1: 1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1 : Development and operation of proficiency testing schemes.
5. ISO Guide 43-2: 1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 2 : Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.
6. ISO 5725: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions; ISO 5725-2 Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method; Part 4: Basic methods for the determination of trueness of a standard measurement method.
7. ISO 31-0: 1992 Quantities and units – Part 0: General principles