

**УТВЕРЖДАЮ**

**Управляющий  
ОДО «КомПродСервис»**



Кучинский Д.Ч.

09

2016 г.

**Методика обнаружения остаточных количеств тетрациклических и бета-лактамных антибиотиков в молоке и молочной сыворотке с использованием тест-наборов «Продоскрин® Лактест-2» производства  
Института биоорганической химии НАН Беларусь**

**РАЗРАБОТАНО**

Отдел испытаний пищевой и  
с/х продукции БелГИМ

Г.В. Артеменко

« 01 » 09

2016 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1</b>	<b>Область применения .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Сущность метода .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Аналитические характеристики методики .....</b>	<b>3</b>
3.1	Предел обнаружения .....	3
3.2	Аналитический диапазон .....	4
3.3	Специфичность .....	4
3.4	Робастность .....	4
<b>4</b>	<b>Оборудование и материалы .....</b>	<b>4</b>
4.1	Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование .....	4
4.2	Материалы .....	5
<b>5</b>	<b>Условия хранения тест-наборов .....</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>Требования безопасности и требования к квалификации операторов.....</b>	<b>5</b>
6.1	Требования безопасности.....	5
6.2	Требования к квалификации операторов.....	5
<b>7</b>	<b>Условия выполнения анализа.....</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	<b>Отбор образцов .....</b>	<b>6</b>
<b>9</b>	<b>Подготовка к проведению анализа .....</b>	<b>6</b>
9.1	Подготовка лабораторной посуды.....	6
9.2	Подготовка тест-наборов .....	6
9.3	Приготовление контрольных проб .....	6
9.4	Подготовка образцов для анализа .....	7
<b>10</b>	<b>Проведение анализа.....</b>	<b>7</b>
<b>11</b>	<b>Получение результата анализа и его интерпретация.....</b>	<b>7</b>
11.1	Получение результата анализа .....	7
11.2	Интерпретация результатов анализа .....	8
<b>12</b>	<b>Форма представления результатов анализа.....</b>	<b>9</b>
<b>13</b>	<b>Процедуры контроля качества .....</b>	<b>9</b>
13.1	Процедура контроля качества с использованием отрицательных и положительных контролей тест-набора .....	9
<b>14</b>	<b>Минимальные требования к проведению валидации при внедрении методики в лаборатории.....</b>	<b>10</b>
<b>15</b>	<b>Нормативные ссылки .....</b>	<b>11</b>
<b>16</b>	<b>Библиография .....</b>	<b>12</b>
	<b>Приложение А (обязательное). Результаты валидации .....</b>	<b>13</b>

## **1      Область применения**

Настоящая методика устанавливает иммунохроматографический экспресс-метод обнаружения антибиотиков группы тетрациклических и бета-лактамов согласно таблицы 1 (далее – целевых антибиотиков) в сыром, пастеризованном, стерилизованном, сухом восстановленном молоке, молочной сыворотке, восстановленной сухой молочной сыворотке с помощью тест-наборов «Продоскрин® Лактест-2» производства Института биоорганической химии НАН Беларусь.

## **2      Сущность метода**

Данная методика основана на иммунохроматографическом методе анализа с использованием конкурентной реакции антиген-антитело.

После внесения пробы в лунку иммунострипа целевые антибиотики образуют комплекс со специфическими антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, которые окрашены в сиренево-розовый цвет. При помещении тест-полоски в лунку пробы поднимается под действием капиллярных сил. При попадании пробы на аналитические линии с иммобилизованным антигеном (производным соответствующего антибиотика), свободные меченные антитела связываются с соответствующими им производными антибиотиков, а меченные иммунные комплексы не задерживаются на этих линиях. Несвязавшийся избыток меченных антител и иммунные комплексы с одинаковым средством продолжают движение и связываются на контрольной линии с реагентами, не являющимися целевыми антибиотиками, например с антивидовыми антителами. Связывание меченных золотом антител приводит к окрашиванию одной или нескольких линий на тест-полоске.

Появление окраски контрольной линии свидетельствует о правильном проведении анализа. При наличии в пробе целевых антибиотиков в концентрации выше предела обнаружения интенсивность окраски соответствующей линии такая же или меньше, чем у контрольной линии, при более высокой концентрации линия становится неокрашенной. Если целевой антибиотик в пробе отсутствует или его концентрация меньше предела обнаружения наблюдается окрашивание соответствующих линий, более интенсивное, чем окраска контрольной линии.

По результатам анализа, полученным путем визуального осмотра тест-полосок, делают заключение об обнаружении целевых антибиотиков в образце.

## **3      Аналитические характеристики методики**

Приведенные далее аналитические характеристики методики были подтверждены в процессе валидации. Результаты, полученные при проведении валидации, представлены в Приложении А.

### **3.1    Предел обнаружения**

Значения пределов обнаружения целевых антибиотиков приведены в таблице 1.

**Таблица 1 – Пределы обнаружения целевых антибиотиков**

Антибиотики группы тетрациклических антибиотиков		Антибиотики группы бета-лактамов			
Антибиотики	Предел обнаружения (мкг/дм <sup>3</sup> )	Антибиотики (пенициллины)	Предел обнаружения (мкг/дм <sup>3</sup> )	Антибиотики (цефалоспорины)	Предел обнаружения (мкг/дм <sup>3</sup> )
Тетрациклин	7-10	Пенициллин G	1,5-2	Цефекином	5-7
Окситетрациклин	7-10	Ампициллин	2-3	Цефацетрил	20-25
Доксициклин	2-5	Амоксициллин	2-3	Цефалониум	3-5
Хлортетрациклин	5-7	Оксациллин	5-7	Цефазолин	15-20
		Клоксациллин	3-6	Цефоперазон	3-5
		Диклоксациллин	3-6	Цефапирин	5-8
		Нафциллин	8-10	Цефтиофур	10-15
		Бензциллин	3-5	Цефалексин	400-600
		Гетациллин	5-8	Цефадроксил	3-5
		Пиперациллин	5-6	Цефоксазол	50-55
		Прокайн-пенициллин	2-3	Цефотаксим	10-12
		Тикарциллин	4-5	Цуфуроксим	10-12

### 3.2 Аналитический диапазон

Аналитический диапазон данной методики, в котором обеспечивается надежное обнаружение целевых антибиотиков, составляет от  $LOD$  до  $100LOD$ , где  $LOD$ , мкг/дм<sup>3</sup> – предел обнаружения, приведенный в таблице 1.

### 3.3 Специфичность

Отсутствует перекрестная чувствительность с сульфаниламидами, хлорамфениколом, фторхинолонами, хинолонами, аминогликозидами, а также перекрестная чувствительность между бета-лактамами и тетрациклическими антибиотиками.

### 3.4 Робастность

При нахождении температуры и времени инкубации в пределах диапазонов, установленных в методике, отсутствует их влияние на результаты анализа.

## 4 Оборудование и материалы

### 4.1 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование

Пипет-дозатор с переменным или фиксированным объемом дозирования, позволяющий дозировать объем 200 мкм<sup>3</sup>, предел допускаемой систематической составляющей основной относительной погрешности не более 1,5 %, предел допускаемого СКО случайной составляющей относительной погрешности не более 1,5 %.

Секундомер механический по [ 1 ] или таймер.

Термометр лабораторный частичного погружения класса точности I с ценой деления 1 °C по ГОСТ 28498.

Инкубатор или термостат, обеспечивающий поддержание температуры 40°C ± 1 °C, например портативный инкубатор MiniT, производства Shenzhen Bioeasy Biotechnologies Co. Ltd, Китай. Допускается проводить инкубацию в помещении при температуре окружающей среды от 18°C до 25 °C.

Холодильник бытовой, поддерживающий температуру от +2 °C до + 8 °C.

Стаканы лабораторные вместимостью 50, 150 см<sup>3</sup> или колбы Кн-1-100-14/23 по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные по ГОСТ 25336.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деионизированная.

Допускается применение средств измерений, испытательного и вспомогательного оборудования с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных.

## 4.2 Материалы

Тест-набор «Продоскрин® Лактест-2» по [ 2 ], производства Института биоорганической химии НАН Беларусь, включающий в себя:

- 12 пластиковых туб, содержащих по 8 тест-полосок и один иммунострип из 8 лунок;
- один флакон вместимостью 2 см<sup>3</sup>, содержащий отрицательный контроль;
- один флакон вместимостью 2 см<sup>3</sup>, содержащий положительный контроль на тетрациклины и бета-лактамы.

По запросу пользователей могут быть внесены следующие изменения в комплектацию поставляемых тест-наборов:

- вместо флаконов с положительным и отрицательным контролем тест-наборы могут комплектоваться по одной пластиковой тубе со стрипом из 8 лунок, содержащей отрицательный контроль и положительный контроль соответственно;
- может поставляться дополнительное количество флаконов с положительным и отрицательным контролем или пластиковых туб со стрипом из 8 лунок с отрицательным и положительным контролями.

## 5 Условия хранения тест-наборов

Тест-набор следует хранить в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С. Недопустимо замораживать тест-набор или его компоненты.

Не допускается использовать тест-наборы после истечения срока годности.

## 6 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

### 6.1 Требования безопасности

При выполнении работ обслуживающий персонал должен знать и строго соблюдать на рабочем месте требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;
- техники безопасности, изложенные в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при выполнении работ по данной методике.

### 6.2 Требования к квалификации операторов

К проведению работ по данной методике допускаются лица, имеющие специальное образование по профилю выполняемых по методике работ, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой.

## 7 Условия выполнения анализа

При выполнении анализа в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура воздуха от 18 °C до 25 °C;
- влажность воздуха не более 80% при температуре +25°C.

## 8 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят в соответствии с действующими ТНПА. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °C до плюс 8 °C в течение дня. Для сырого молока промежуток времени между доением и проведением анализа должен составлять не менее 2 ч.

## 9 Подготовка к проведению анализа

### 9.1 Подготовка лабораторной посуды

Сильнозагрязненную лабораторную посуду предварительно обрабатывают хромовой смесью. Лабораторную посуду после мойки в растворе моющего средства промывают водопроводной, ополаскивают дистиллированной водой 2 раза и высушивают.

Запрещается:

- повторное использование одноразовой лабораторной посуды;
- использование моющих средств для мойки лабораторной посуды, содержащих ферменты и окислители.

### 9.2 Подготовка тест-наборов

Тест-набор достают из холодильника. Необходимое для проведения анализа количество лунок и тест-полосок оставляют при температуре от 18 °C до 25 °C не менее, чем на 15 мин. Компоненты тест-набора должны быть использованы для проведения анализа в течение 24 ч от начала их нагрева (с момента извлечения из холодильника). Все неиспользованные компоненты убирают в холодильник и хранят при температуре от 2 °C до 8 °C.

Подготавливают инкубатор к работе, устанавливая температуру 40 °C.

### 9.3 Приготовление контрольных проб

Для приготовления отрицательной контрольной пробы во флакон с отрицательным контролем добавляют по 1,2 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и аккуратно перемешивают содержимое вращением флакона, не допуская образования пены. Из флакона отбирают дозатором 0,8 см<sup>3</sup> приготовленной отрицательной контрольной пробы и переносят во флакон с положительным контролем, после чего аккуратно перемешивают содержимое вращением флакона, не допуская образования пены. Приготовленные контрольные пробы хранят во флаконах при температуре от 2 °C до 8 °C в течение 12 ч. Перед использованием флаконы с контрольными пробами выдерживают при температуре от 18 °C до 25 °C 15 мин.

При использовании контролей в лунках необходимое количество лунок с отрицательными и положительными контролями вынимают из тубы. Для приготовления отрицательной контрольной пробы в лунки с отрицательным контролем добавляют по 200 мм<sup>3</sup> дистиллированной воды и перемешивают содержимое лунок пятикратным набором и сливом жидкости из пипет-дозатора, не допуская образования пены. Для приготовления положительной контрольной пробы отбирают из лунок по 0,2 см<sup>3</sup> приготовленной отрицательной контрольной пробы и переносят в лунки с положительными контролями, после чего перемешивают содержимое лунок пятикратным набором и сливом жидкости из пипет-дозатора, не допуская образования пены. Контрольные пробы в лунках приготавливают

непосредственно перед проведением анализа.

Приготовленные контрольные пробы используют при проведении анализа согласно разделу 10.

#### 9.4 Подготовка образцов для анализа

Сухое молоко и сухую молочную сыворотку восстанавливают в соответствии с ГОСТ 29245, используя навеску сухой молочной сыворотки массой 6,25 г.

Перед взятием аликвоты для проведения анализа по разделу 10 испытуемый образец тщательно перемешивают. Подготовленные образцы не должны иметь сгустков и осадка.

### 10 Проведение анализа

**10.1** От образцов, подготовленных по п. 9.4, а также приготовленных по п. 9.3 положительных и отрицательных контрольных проб при проведении контроля качества по п. 13.1, пипет-дозатором отбирают аликвоты проб объемом 200 мм<sup>3</sup> и переносят в лунки иммунострipsа.

**10.2** Содержимое лунок перемешивают пятикратным набором и сливом жидкости из пипет-дозатора. После перемешивания смесь в лунке должна быть однородной розового цвета. Помещают лунки с пробами в инкубатор, настроенный на температуру 40 °C, и выдерживают их в течение 3 мин. Допускается проводить инкубацию в помещении при температуре окружающей среды от 18°C до 25 °C в течение 3 мин.

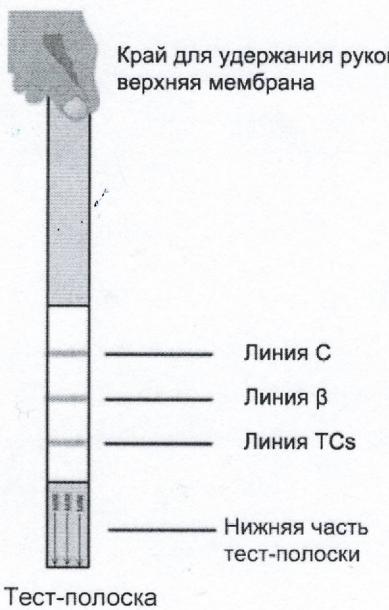
**10.3** Сразу же после проведения инкубации по п. 10.2 помещают тест-полоски в лунки нижней частью с меткой «↓». Выдерживают лунки с тест-полосками в инкубаторе, настроенном на температуру 40 °C, в течение 3 мин. Допускается проводить инкубацию в помещении при температуре окружающей среды от 18°C до 25 °C в течение 5 мин.

**10.4** Вынимают тест-полоски из лунок и в течение не более 5 мин получают результаты анализа в соответствии с п. 11.1.

**Примечание:** при проведении инкубации при температуре от 18°C до 25 °C интенсивность окраски линий и контрастность будет меньше, чем при температуре 40 °C.

### 11 Получение результата анализа и его интерпретация

#### 11.1 Получение результата анализа



Для получения результата анализа производят визуальный осмотр тест-полосок.

По результатам осмотра фиксируют наличие окрашенных зон в следующих областях тест-полоски:

- контрольной линии (линия С);
- линии бета-лактамов (линия β);
- линии тетрациклических антибиотиков (линия TCs).

Расположение указанных выше областей на тест-полоске приведено на рисунке 1.

Для каждого образца фиксируют наличие окрашенных зон на тест-полосках, полученных при проведении анализа проб согласно разделу 10. Интерпретацию результатов анализа проводят согласно п. 11.2.

**Рисунок 1 Расположение областей на тест-полоске**

## 11.2 Интерпретация результатов анализа

11.2.1 Интерпретация результатов анализа, полученных по п. 11.1, производится согласно схеме, приведенной в таблице 2.

**Таблица 2 – Схема интерпретации результатов анализа**

Наличие окраски линии			Результат анализа	
Контрольной	Тетрациклических	Бета-лактамов	Антибиотики группы тетрациклических	Антибиотики группы бета-лактамов
Есть	Есть	Есть	не обн.	не обн.
Есть	Есть	Нет	не обн.	обн.
Есть	Нет	Есть	обн.	не обн.
Есть	Нет	Нет	обн.	обн.
Нет	Есть	Есть	Получен некорректный результат анализа	
Нет	Есть	Нет		
Нет	Нет	Есть		
Нет	Нет	Нет		

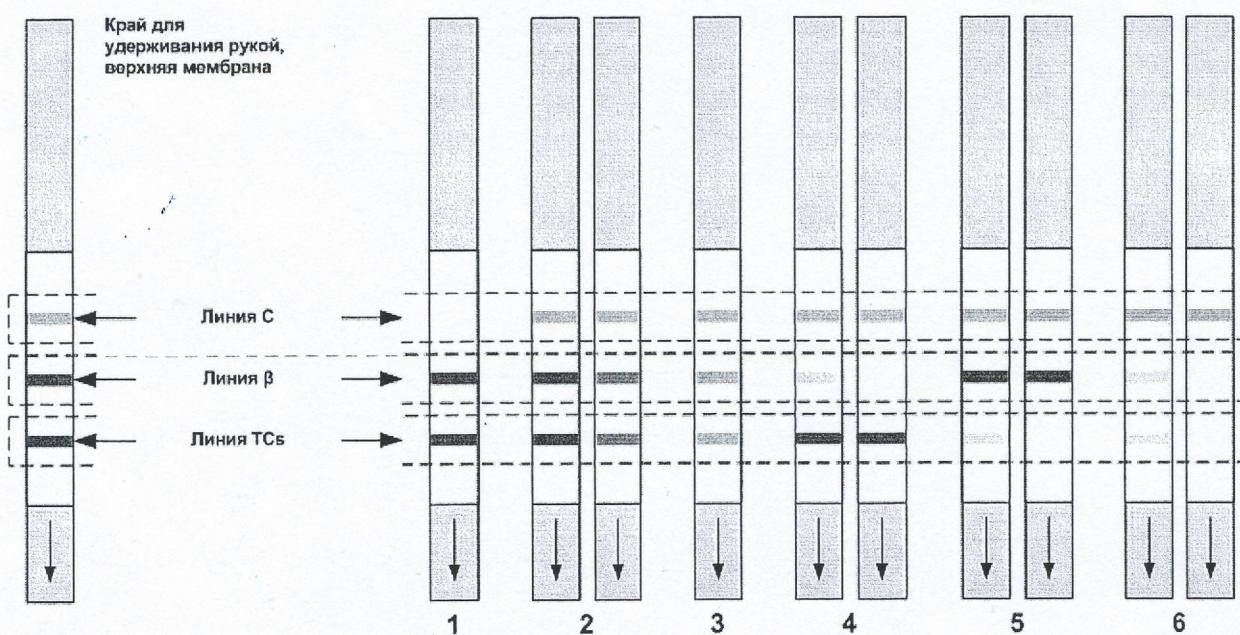
В таблице 2 использованы следующие обозначения:

Для линий тетрациклических, бета-лактамов «Есть» – означает наличие окраски соответствующей линии, более яркой, чем контрольная линия, «Нет» – означает отсутствие окраски или одинаковую, а также слабую окраску по сравнению с контрольной линией.

Для контрольной линии «Есть» – означает наличие окраски, соответствующей указанной в инструкции (на упаковке), «Нет» – означает отсутствие окраски.

«Не обн.» – означает получение отрицательного результата по соответствующим антибиотикам (группам антибиотиков). «Обн.» – означает получение положительного результата по соответствующим антибиотикам (группам антибиотиков).

Некоторые наиболее вероятные варианты окрашивания линий тест-полоски после проведения анализа приведены на рисунке 2. Соответствующая им интерпретация результатов анализа проводится, как описано ниже:



**Рисунок 2 Возможные варианты окрашивания линий тест-полоски после проведения анализа**

- 1 – некорректный результат анализа;
- 2 – отрицательный результат анализа по антибиотикам группы тетрациклических и бета-лактамов;
- 3 – положительный результат анализа по антибиотикам группы тетрациклических и бета-лактамов (значение концентрации антибиотиков находится несколько выше предела обнаружения);
- 4 – положительный результат по антибиотикам группы бета-лактамов;
- 5 – положительный результат по антибиотикам группы тетрациклических;
- 6 – положительный результат по антибиотикам группы тетрациклических и бета-лактамов.

**11.2.2** Если при анализе пробы получен некорректный результат, то следует выполнить действия согласно (а), при повторном получении некорректного результата анализа следует последовательно выполнить действия согласно (б) и (в):

- а) повторно провести анализ согласно разделу 10;
- б) повторно отобрать образец согласно разделу 8, подготовить его для анализа по п. 9.4 и провести анализ в соответствии с разделом 10;
- в) заменить тест-набор на новый, повторно отобрать образец согласно разделу 8, подготовить его для анализа по п. 9.4 и провести анализ в соответствии с разделом 10.

**11.2.3** Если получен отрицательный результат по соответствующим группам антибиотиков, то делается вывод, что антибиотики этих групп в образце отсутствуют (их концентрации ниже пределов обнаружения, указанных в таблице 1), что соответствует отрицательному результату обнаружения.

**11.2.4** Если получен положительный результат по соответствующим группам антибиотиков, делается вывод, что антибиотики этих групп в образце обнаружены (их концентрации выше или равны пределам обнаружения, указанным в таблице 1), что соответствует положительному результату обнаружения.

## **12 Форма представления результатов анализа**

При получении положительного результата обнаружения соответствующих групп антибиотиков в соответствии с данной методикой выдают результат в следующем виде с указанием значений предела обнаружения согласно таблице 1:

- «антибиотики группы тетрациклических обнаружены»;
- «антибиотики группы бета-лактамов обнаружены»;

При получении отрицательного результата обнаружения групп антибиотиков в соответствии с данной методикой выдают результат в следующем виде с указанием значений предела обнаружения согласно таблице 1:

- «антибиотики группы тетрациклических не обнаружены»;
- «антибиотики группы бета-лактамов не обнаружены».

К форме представления результатов анализа могут предъявляться и другие требования в соответствии с системой менеджмента качества лаборатории.

## **13 Процедуры контроля качества**

### **13.1 Процедура контроля качества с использованием отрицательных и положительных контролей тест-набора**

Для проведения процедуры используют входящие в состав тест-наборов положительные и отрицательные контроли. Процедура контроля качества состоит в

выполнении анализа в соответствии с разделом 10 контрольных проб, подготовленных из положительных и отрицательных контролей в соответствии с п. 9.3, и получении результатов анализа в соответствии с разделом 11.

Если полученные результаты обнаружения целевых антибиотиков соответствуют таблице 3, то результат выполнения процедуры контроля качества признается удовлетворительным, в противном случае – неудовлетворительным.

**Таблица 3 – Результаты анализа, соответствующие удовлетворительному проведению процедуры контроля качества с использованием контрольных проб**

Результаты обнаружения антибиотиков группы	Отрицательная контрольная проба	Положительная контрольная проба, содержащая антибиотики группы тетрациклических и бета-лактамов
Тетрациклинов	Не обн.	Обн.
Бета-лактамов	Не обн.	Обн.

При получении неудовлетворительного результата процедуры контроля качества производится поиск и устранение причин его появления, а результаты анализа серии образцов, полученные одновременно с проведением процедуры признаются недействительными. После устранения причин данную процедуру контроля качества выполняют повторно.

Описанная выше процедура контроля качества должна выполняться один раз в начале цикла непрерывного использования\* тест-набора.

#### **14 Минимальные требования к проведению валидации при внедрении методики в лаборатории**

При внедрении данной методики в лаборатории необходимо провести валидацию, как минимум, следующих характеристик по указанным ниже критериям соответствия.

Перечень валидационных характеристик, критерии соответствия, предъявляемые к ним, и количество выполняемых в эксперименте анализов проб приведены в таблице 4.

\* цикл непрерывного использования тест-набора – это последовательность анализов, выполняемая с использованием тест-набора после его нагрева до температуры от 18 °C до 25 °C до момента помещения его в холодильник для последующего хранения

**Таблица 4 – Валидационные характеристики, критерии для них и количество анализов проб**

Валидационная характеристика	Критерий соответствия	Количество анализов проб
Аналитический диапазон в части подтверждения доли ложно-положительных результатов для образца, не содержащего целевых антибиотиков	Доля ложно-положительных результатов должна составлять 0 %	не менее 20
Предел обнаружения. Подтверждается для одного антибиотика из каждой группы (пенициллины, цефалоспорины, тетрациклины). Допускается использовать один образец, содержащий все антибиотики	Доля ложно-отрицательных результатов должна составлять не более 5 % на уровне концентрации целевых антибиотиков, соответствующей пределу обнаружения, указанному в п. 3.1	не менее 20

Валидация указанных выше характеристик должна проводиться с использованием образцов молока и/или молочной сыворотки согласно области применения (раздел 1) с учетом фактически анализируемых испытательной лабораторией видов молочных продуктов.

Проведение валидации и оформление отчета должно выполняться в соответствии с документами системы менеджмента качества лаборатории.

## 15 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

- |                  |  |
|------------------|--|
| ГОСТ 12.1.004–91 | Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования                         |
| ГОСТ 12.1.005-88 | Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны |
| ГОСТ 12.2.003–91 | Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности    |
| ГОСТ 6709–72     | Вода дистиллированная. Технические условия   |
| ГОСТ 25336-82    | Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры                      |
| ГОСТ 28498–90    | Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний                       |
| ГОСТ 29245-91    | Консервы молочные. Методы определения физических и органолептических показателей.                      |

## **16 Библиография**

[ 1 ]	ТУ 25-1819.0021-90 Секундомеры механические
[ 2 ]	ТУ BY 100185129.156-2016 Тест-набор для обнаружения остаточных количеств тетрациклинов и бета-лактамов в молоке иммунохроматографическим экспресс-методом «Продоскрин® Лактест-2»
[ 3 ]	Отчет по валидации методики обнаружения остаточных количеств тетрациклинов и бета-лактамов в молоке и молочной сыворотке с использованием тест-наборов «Продоскрин® Лактест-2» производства Института биоорганической химии НАН Беларуси

## Приложение А (обязательное). Результаты валидации

### A.1 Информация о результатах валидации

В данном приложении приведена информация о проведении и результатах валидации методики, выполненной при ее разработке. Критерии соответствия, предъявляемые к аналитическим характеристикам методики, описание эксперимента, результаты, полученные при его проведении, а также их обработка и интерпретация, приведены в [ 3 ]. Валидационный эксперимент проводился в лаборатории химии белковых гормонов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

### A.2 Область применения

Согласно спецификации изготовителя область применения тест-набора распространяется на молоко и молочную сыворотку. При проведении валидации подтверждена пригодность методики для обнаружения целевых антибиотиков применительно к коровьему молоку и молочной сыворотке, полученной из коровьего молока.

### A.3 Предел обнаружения

При валидации методики были подтверждены указанные в спецификации производителя тест-наборов пределы обнаружения целевых антибиотиков. Эксперимент по оценке предела обнаружения выполнялся для шести представительных анализов, относящихся к каждой группе целевых антибиотиков, в одной лаборатории. В ходе эксперимента было проведено по 20 анализов проб образцов с концентрациями представительных анализов на четырех уровнях, включая образец, не содержащий целевых антибиотиков. Оценивание предела обнаружения производилось с использованием зависимости доля положительных результатов – концентрация анализа. Результаты были получены для двух используемых согласно инструкции режимов инкубации (режим инкубации № 1 – температура от 16 °C до 25 °C и режим инкубации № 2 – 40 °C ± 1 °C).

Результаты, полученные в ходе валидации, приведены в таблицах A.1 – A.4.

**Таблица А.1 – Молоко. Результаты оценки предела обнаружения для режима инкубации № 1**

Антибиотик	Предел обнаружения, специфицированный изготовителем тест-наборов $LOD_{SPEC}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	Оценки предела обнаружения, полученные в эксперименте $LOD_{EXP}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	$LOD_{EXP} - LOD_{SPEC}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	Оценки расширенной неопределенности концентрации антибиотиков в образцах для проведения эксперимента, мкг/дм <sup>3</sup>
Пенициллин G	1,5-2	1,45	-0,55	0,07
Ампициллин	2-3	1,96	-1,04	0,09
Цефазолин	15-20	14,70	-5,30	0,64
Цефапирин	5-8	4,90	-3,10	0,21
Тетрациклин	7-10	7,77	-2,23	0,34
Окситетрациклин	7-10	7,85	-2,15	0,35

**Таблица А.2 – Молоко. Результаты оценки предела обнаружения для режима инкубации № 2**

Антибиотик	Предел обнаружения, специфицированный изготовителем тест-наборов $LOD_{SPEC}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	Оценки предела обнаружения, полученные в эксперименте $LOD_{EXP}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	$LOD_{EXP} - LOD_{SPEC}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	Оценки расширенной неопределенности концентрации антибиотиков в образцах для проведения эксперимента, мкг/дм <sup>3</sup>
Пенициллин G	1,5-2	1,44	-0,56	0,07
Ампициллин	2-3	1,96	-1,04	0,09
Цефазолин	15-20	14,70	-5,30	0,64
Цефапирин	5-8	4,89	-3,11	0,21
Тетрациклин	7-10	7,73	-2,27	0,34
Окситетрациклин	7-10	7,83	-2,17	0,35

**Таблица А.3 – Молочная сыворотка. Результаты оценки предела обнаружения для режима инкубации № 1**

Антибиотик	Предел обнаружения, специфицированный изготовителем тест-наборов $LOD_{SPEC}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	Оценки предела обнаружения, полученные в эксперименте $LOD_{EXP}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	$LOD_{EXP} - LOD_{SPEC}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	Оценки расширенной неопределенности концентрации антибиотиков в образцах для проведения эксперимента, мкг/дм <sup>3</sup>
Пенициллин G	1,5-2	1,45	-0,55	0,07
Ампициллин	2-3	1,97	-1,03	0,09
Цефазолин	15-20	14,75	-5,25	0,64
Цефапирин	5-8	4,89	-3,11	0,21
Тетрациклин	7-10	7,76	-2,24	0,34
Окситетрациклин	7-10	7,84	-2,16	0,35

**Таблица А.4 – Молочная сыворотка. Результаты оценки предела обнаружения для режима инкубации № 2**

Антибиотик	Предел обнаружения, специфицированный изготовителем тест-наборов $LOD_{SPEC}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	Оценки предела обнаружения, полученные в эксперименте $LOD_{EXP}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	$LOD_{EXP} - LOD_{SPEC}$ , мкг/дм <sup>3</sup>	Оценки расширенной неопределенности концентрации антибиотиков в образцах для проведения эксперимента, мкг/дм <sup>3</sup>
Пенициллин G	1,5-2	1,45	-0,55	0,07
Ампициллин	2-3	1,96	-1,04	0,09
Цефазолин	15-20	14,70	-5,30	0,64
Цефапирин	5-8	4,89	-3,11	0,21
Тетрациклин	7-10	7,74	-2,26	0,34
Окситетрациклин	7-10	7,84	-2,16	0,35

Для молока и молочной сыворотки по всем представительным аналитам разность между значением оценки предела обнаружения, полученным в эксперименте, и специфицированным изготовителем тест-наборов не превышала оценки расширенной неопределенности концентрации антибиотиков в образцах для проведения эксперимента при использовании двух вышеуказанных режимов инкубации.

#### A.4 Аналитический диапазон

Аналитический диапазон методики представляет собой диапазон, в котором обеспечивается надежное обнаружение целевых антибиотиков.

При проведении валидации подтвержден аналитический диапазон с нижней и верхней границами на уровне  $LOD_{SPEC}$  и  $100LOD_{SPEC}$  соответственно.

Нижняя граница аналитического диапазона подтверждена при валидации предела обнаружения. Верхняя граница подтверждена в эксперименте, который выполнялся для шести представительных анализаторов, относящихся к каждой группе целевых антибиотиков, в одной лаборатории. В ходе эксперимента для двух режимов инкубации было проведено по 10 анализов проб образцов с концентрациями представительных анализаторов на уровне, соответствующем  $100LOD_{SPEC}$ . На основании результатов анализа, полученных в эксперименте, рассчитывалась доля ложноотрицательных результатов,  $FNR$ , %. На данном уровне концентраций также была проведена валидация специфичности в отношении взаимного влияния целевых антибиотиков разных групп (см. п. А.5).

Результаты, полученные в ходе валидации для двух режимов инкубации, приведены в таблице А.5.

**Таблица А.5 – Молоко и молочная сыворотка. Результаты валидации верхней границы аналитического диапазона**

Антибиотик	Концентрация антибиотиков в образцах для проведения эксперимента, мкг/дм <sup>3</sup>	Доля ложноотрицательных результатов, $FNR$ , %
Пенициллин G	197	0
Ампициллин	305	0
Цефазолин	1986	0
Цефапирин	803	0
Тетрациклин	995	0
Окситетрациклин	1012	0

Для всех представительных анализаторов при двух вышеуказанных режимах инкубации полученные оценки  $FNR$  равны нулю, что соответствует установленному критерию.

#### A.5 Специфичность

В ходе валидации методики было подтверждено отсутствие перекрестной чувствительности для двух групп интерферентов:

- представительных нецелевых антибиотиков, относящихся к разным группам (аминогликозиды, амфениколы, фторхинолоны, хинолоны), а также сульфаниламидам.
- представительных анализаторов, относящихся к группам тетрациклинов и бета-лактамов (взаимное влияние).

В ходе эксперимента для двух режимов инкубации было проведено по 2 анализа проб образцов, содержащих представительные нецелевые антибиотики и сульфаниламиды при их концентрации, в 10 раз превышающей допустимый уровень содержания нецелевых антибиотиков согласно действующим ТНПА.

Для представительных анализаторов (взаимное влияние) были использованы результаты эксперимента по валидации аналитического диапазона на уровне концентраций  $100LOD_{spec}$ .

На основании результатов анализа, полученных при проведении описанных

выше экспериментов, были рассчитаны доли ложноотрицательных результатов  $FPR$  для интерферентов первой группы и доли положительных результатов анализа  $PR$  для интерферентов второй группы.

Результаты, полученные в ходе валидации для двух вышеуказанных режимов инкубации для молока и молочной сыворотки, приведены в таблицах А.6, А.7.

**Таблица А.6 – Молоко и молочная сыворотка. Результаты валидации специфичности по первой группе интерферентов**

Нецелевые антибиотики (сульфаниламиды)		Хлорамфеникол	Стрептомицин	Сульфаметазин	Энрофлоксацин	Ципрофлоксацин
Концентрация нецелевых антибиотиков (сульфаниламидов), мкг/дм <sup>3</sup>		3,04	2000	1010	1010	1010
Доля ложно-положительных результатов $FPR$ , %	по бета-лактамам	0	0	0	0	0
	по тетрациклином	0	0	0	0	0

**Таблица А.7 – Молоко и молочная сыворотка. Результаты валидации специфичности по второй группе интерферентов**

Антибиотики	$PR$ , %, рассчитанное по результатам анализа на:	
	бета-лактамы	тетрациклины
Пенициллин G	100	0
Ампициллин	100	0
Цефазолин	100	0
Цефапирин	100	0
Тетрациклин	0	100
Окситетрациклин	0	100

Все рассчитанные значения  $FPR$  для интерферентов первой группы и  $PR$  для интерферентов второй группы для молока и молочной сыворотки при двух вышеуказанных режимах инкубации соответствовали установленным критериям.

#### A.6 Робастность

При валидации робастности исследовалось влияние температуры и времени инкубации на результаты анализа.

В ходе эксперимента для двух вышеуказанных режимов инкубации было проведено по 20 анализов проб образцов с концентрацией на уровне предела обнаружения двух антибиотиков, один из которых относится к бета-лактамам, второй к тетрациклином, а также образца, не содержащего целевых антибиотиков. В эксперименте были использованы пенициллин G и тетрациклин.

Оценка влияния варьируемых в эксперименте факторов производилась на основании рассчитанных по данным эксперимента доли ложноположительных ( $FPR$ ) и ложноотрицательных ( $FNR$ ) результатов анализа.

Результаты, полученные в ходе валидации для двух вышеуказанных режимов инкубации, приведены в таблицах А.8, А.9.

**Таблица А.8 – Молоко и молочная сыворотка. Результаты валидации робастности для режима инкубации № 1**

Условия проведения анализа	Образец, не содержащий целевых антибиотиков		Образец, содержащий два целевых антибиотика	
	<i>FPR, %</i>		<i>FNR, %</i>	
	Бета-лактамы	Тетрациклины	Бета-лактамы	Тетрациклины
Согласно методике	0	0	0	0
Температура инкубации 13 °C	0	0	25 (молоко) 40 (молочная сыворотка)	35 (молоко) 45 (молочная сыворотка)
Температура инкубации 28 °C	0	0	0	0
Время инкубации с тест-полосками 10 мин.	0	0	0	0

**Таблица А.9 – Молоко и молочная сыворотка. Результаты валидации робастности для режима инкубации № 2**

Условия проведения анализа	Образец, не содержащий целевых антибиотиков		Образец, содержащий два целевых антибиотика	
	<i>FPR, %</i>		<i>FNR, %</i>	
	Бета-лактамы	Тетрациклины	Бета-лактамы	Тетрациклины
Согласно методике	0	0	0	0
Температура инкубации 37,5 °C	0	0	0	0
Температура инкубации 42,5 °C	0	0	0	0
Время инкубации с тест-полосками 10 мин.	0	0	0	0

Для режима инкубации № 2 установлено отсутствие значимых влияний на результаты анализа при изменении температуры по сравнению с номинальной на 2,5 °C, и увеличении времени инкубации с тест-полосками до 10 мин. Для режима инкубации № 1 установлено отсутствие значимых влияний на результаты анализа при увеличении температуры по сравнению с номинальной (согласно инструкции) на 3 °C, и увеличении времени инкубации с тест-полосками до 10 мин. При уменьшении температуры по сравнению с номинальной (согласно инструкции) на 3 °C наблюдались ложноотрицательные результаты по тетрациклинам и бета-лактамам для образцов молока и молочной сыворотки с добавками антибиотиков. Так как на основании данных эксперимента для режима инкубации № 1 установлено значимое влияние на результаты анализа понижения температуры на 3 °C по сравнению с номинальной, то принято решение увеличить значение нижней границы диапазона температур при инкубации до 18 °C.

По результатам эксперимента по валидации робастности подтверждены установленные в методике номинальные значения варьируемых в эксперименте факторов для режима инкубации с № 2 – температура инкубации 40°C ± 1 °C, время инкубации с тест-полосками – 3 мин. Для режима инкубации № 1 подтверждено установленное в методике время инкубации с тест-полосками – 5 мин, установлен диапазон температур от 18 °C до 25 °C.



УТВЕРЖДАЮ

Управляющий  
ОДО «КомПродСервис»



Д.Ч.Кучинский  
2018 г.

**Извещение №1 об изменении**

**Методика обнаружения остаточных количеств тетрациклинов и бета-лактамов в молоке и молочной сыворотке с использованием тест-наборов «Продоскрин®Лактест-2» производства Института биоорганической химии НАН Беларусь**

Пункт 9.4 «Подготовка образцов для анализа» изложить в следующей редакции:

«Испытуемые образцы молока тщательно перемешивают.

Сухое молоко и сухую молочную сыворотку восстанавливают в соответствии с ГОСТ 29245.

Для анализа жидкой молочной сыворотки доводят содержание сухих веществ до значения 6-8% путем добавления дистиллированной воды. Для жидкой сыворотки с содержанием сухих веществ менее 8% разбавление не требуется. Значение pH жидкой сыворотки должно быть на уровне 6,8 – 6,9. При необходимости корректируют pH подготовленной молочной сыворотки раствором гидроокиси натрия молярной концентрации 1 моль/л.

Перед взятием аликовты для проведения анализа по разделу 10 подготовленные образцы тщательно перемешивают.

Подготовленные образцы молока и молочной сыворотки не должны иметь сгустков и осадка».

Раздел 11 дополнить пунктом 11.2.5 в следующей редакции:

«Допускается инструментальная обработка результатов визуального анализа с использованием считывающего устройства и последующей обработкой данных при помощи специального программного обеспечения, поставляемого со считывающим устройством.»

ОДО «КомПродСервис» отвечает за своевременную актуализацию данной методики обнаружения.