

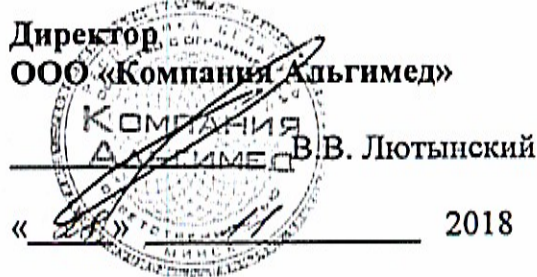
СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора по науке
БелГИМ



УТВЕРЖДАЮ

Директор
ООО «Компания Альгимед»



СИСТЕМА ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЕДИНСТВА ИЗМЕРЕНИЙ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Методика выполнения измерений массовой доли стрептомицина в
продукции животного происхождения методом ИФА с
использованием набора реагентов MaxSignal® Streptomycin ELISA
Test Kit и ИФА антибиотик-стрептомицин

МВИ.МН 4894-2018

(взамен МВИ.МН 4894-2014)

Республиканское унитарное предприятие «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)	
Свидетельство №	1145 / 2018
об аттестации МВИ от	28.11.2018 г.

РАЗРАБОТЧИК:

ООО «Компания Альгимед»



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель директора БелГИМ

В.П. Лобко

2018

ЭКСПЕРТНОЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

по результатам метрологической экспертизы
методики выполнения измерений (МВИ)

Наименование МВИ: Методика выполнения измерений массовой доли стрептомицина в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием набора реагентов MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit и ИФАантибиотик-стрептомицин

Разработчик: ООО «Компания Альгимед»

На метрологическую экспертизу представлены следующие документы:

- 1 Методика выполнения измерений
- 2 Отчет об экспериментальных исследованиях метрологических характеристик

По результатам метрологической экспертизы установлено:

- 1 Представленная методика устанавливает методику выполнения измерений массовой доли стрептомицина в продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» или набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин» и обладает следующими метрологическими характеристиками:

Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, сухая молочная сыворотка, масло сливочное, сыр, творог, молочная сыворотка, йогурт, кефир, сметана	от 5,00 до 250 вкл.	3,4	8,5

Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 5,00 до 375 вкл.	5,9	7,9
Йогурт, кефир, сметана, сухая молочная сыворотка, молочная сыворотка, коктейли на молочной основе, мороженое, творог, масло сливочное, сыр	от 7,50 до 375 вкл.		
Жир, сало, в т.ч. шпик, субпродукты (почки)	от 10,0 до 1200 вкл.		
Сгущенное молоко, мед	от 20,0 до 600 вкл.	2,3	7,7
Мясо, мясные продукты, яйца, субпродукты (печень), консервы мясные и мясорастительные	от 10,0 до 1200 вкл.		

- 2 Методика соответствует требованиям ТКП 8.006-2011 «Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь. Метрологическое подтверждение пригодности методик выполнения измерений. Правила проведения работ».
- 3 Методика может быть использована для выполнения измерений массовой доли стрептомицина в продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit или набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин».

Начальник отдела испытаний
пищевой и с/х продукции



Г.В. Артеменко

**Республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт метрологии»
(БелГИМ)**

**СВИДЕТЕЛЬСТВО О МЕТРОЛОГИЧЕСКОМ ПОДТВЕРЖДЕНИИ ПРИГОДНОСТИ
МЕТОДИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ (МВИ) № 1145МП/2018**

Обозначение и наименование методики выполнения измерений:

МВИ.МН 4894-2018 «Методика выполнения измерений массовой доли стрептомицина в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием набора реагентов MaxSignal®Streptomycin ELISA Test Kit и ИФАантибиотик-стрептомицин»

Заявитель: ООО «Компания Альгимед»

Разработчик: ООО «Компания Альгимед»

Методика выполнения измерений соответствует требованиям, установленным в ТКП 8.006-2011 «Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь. Метрологическое подтверждение пригодности методик выполнения измерений. Правила проведения работ».

Свидетельство о метрологическом подтверждении пригодности методики выполнения измерений выдано на основании экспертного заключения по результатам метрологической экспертизы от 28.11 2018 г.

Первый заместитель директора



В.П. Лобко



На № _____ от _____
28.11.2018 г. № 28-12/18446

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 1145/2018 об аттестации МВИ

**Методика выполнения измерений массовой доли стрептомицина
в продукции животного происхождения методом ИФА
с использованием набора реагентов MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit
и ИФАантибиотик-стрептомицин**

Методика выполнения измерений, разработанная ООО «Компания Альгимед», и регламентированная в МВИ.МН 4894-2018 «Методика выполнения измерений массовой доли стрептомицина в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием набора реагентов MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit и ИФАантибиотик-стрептомицин», аттестована в соответствии с ТКП 8.006-2011.

Аттестация осуществлена по результатам метрологической экспертизы материалов по разработке и экспериментальному исследованию МВИ.

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает следующими основными метрологическими характеристиками при принятой доверительной вероятности $P=0,95$:

Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, сухая молочная сыворотка, масло сливочное, сыр, творог, молочная сыворотка, йогурт, кефир, сметана	от 5,00 до 250 вкл.	3,4	8,5

Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин»

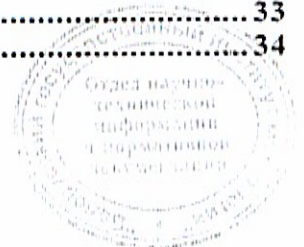
Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 5,00 до 375 вкл.	5,9	7,9
Йогурт, кефир, сметана, сухая молочная сыворотка, молочная сыворотка, коктейли на молочной основе, мороженое, творог, масло сливочное, сыры	от 7,50 до 375 вкл.		
Жир, сало, в т.ч. шпик, субпродукты (печень)	от 40,0 до 1200 вкл.		
Сгущенное молоко, мед	от 20,0 до 600 вкл.	2,3	7,7
Мясо, мясные продукты, яйца, субпродукты (печень), консервы мясные и мясорастительные	от 10,0 до 1200 вкл.		

Первый заместитель директора

В.П. Лобко

СОДЕРЖАНИЕ

1	Область применения	3
2	Точность измерений	3
3	Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы	5
4	Метод измерений	8
5	Требования безопасности и требования к квалификации операторов	8
5.1	Общие требования безопасности.....	8
5.2	Требования к квалификации операторов.....	9
6	Условия выполнения измерений	9
7	Условия инкубации микротитровальных планшетов (иммуносорбентов) в помещении	9
8	Условия хранения набора реагентов	9
9	Подготовка к выполнению измерений	9
9.1	Отбор образцов.....	9
9.2	Подготовка лабораторной посуды.....	10
9.3	Приготовление растворов.....	10
9.4	Подготовка набора реагентов.....	12
9.5	Подготовка проб.....	14
10	Выполнение измерений	22
10.1	Общие требования.....	22
10.2	Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа.....	22
11	Обработка результатов измерения	24
11.1	Расчет массовой доли.....	24
11.2	Определение массовой доли стрептомицина при получении результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки.....	25
11.3	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости.....	26
12	Оформление результатов измерений	26
12.1	Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности.....	26
12.2	Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли стрептомицина с использованием предела измерения.....	27
12.3	Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли стрептомицина с использованием значения верхней границы диапазона измерений.....	27
13	Контроль точности измерений	27
13.1	Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости.....	27
13.2	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности.....	27
13.3	Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости.....	28
13.4	Контроль правильности.....	29
13.5	Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК).....	31
14	Нормативные ссылки	33
	Библиография	34



1 Область применения

Методика предназначена для проведения измерений массовой доли стрептомицина в указанной ниже продукции животного происхождения методом конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина», каталожный номер 1014-01B («MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit», Reference # 1014-01B) производства BIOO Scientific Corporation (США), или набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин», каталожный номер С004-01, производства ООО «Компания Альгимед» (Республика Беларусь), далее набор реагентов

Настоящая методика распространяется на:

- молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, сухую молочную сыворотку¹, масло сливочное, сыр, творог, молочную сыворотку, йогурт, кефир, сметану при использовании обоих вышеуказанных наборов реагентов;
- коктейли на молочной основе, мороженое, сгущенное молоко, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, яйца, мед, мясо, готовые к употреблению мясные продукты, субпродукты (печень, почки), консервы мясные и мясорастительные, сало, в т.ч. шпик, жиры животные, при использовании только набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин».

Диапазон измерений методики приведен в разделе 2, таблицы 1, 2. Предел измерения для данной методики приведен в разделе 2, таблицы 1, 2 как нижняя граница диапазона измерений.

Настоящая методика разработана в соответствии с требованиями ГОСТ 8.010 и может применяться в сфере законодательной метрологии, а также вне её, в том числе в следующих областях:

- обеспечение защиты жизни и охраны здоровья человека;
- проведение испытаний и осуществление контроля за соответствием продукции и сырья требованиям законодательства;
- проведение лабораторно-диагностических исследований.

2 Точность измерений

Настоящая методика обеспечивает измерение массовой доли стрептомицина в диапазонах и с показателями прецизионности, указанными в таблицах 1, 2.

Таблица 1 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{(10)}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, сухая молочная сыворотка, масло сливочное, сыр, творог, молочная сыворотка, йогурт, кефир, сметана	от 5,00 до 250 включ.	3,4	8,5

¹ Результат измерений массовой доли стрептомицина в сухом молоке и сухой молочной сыворотке относится к восстановленному согласно данной методике продукту

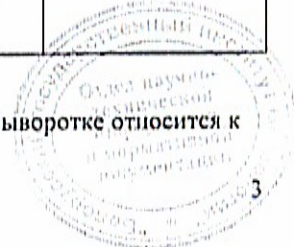


Таблица 2 – Относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин»

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания	от 5,00 до 375 включ.	5,9	7,9
Йогурт, кефир, сметана, сухая молочная сыворотка, молочная сыворотка, коктейли на молочной основе, мороженое, творог, масло сливочное, сыр	от 7,50 до 375 включ.		
Жир, сало, в т.ч. шпик, субпродукты (почки)	от 10,0 до 1200 включ.		
Сгущенное молоко, мед	от 20,0 до 600 включ.	2,3	7,7
Мясо, мясные продукты, яйца, субпродукты (печень), консервы мясные и мясорастительные	от 10,0 до 1200 включ.		

В результате оценки показателя правильности при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» установлена статистическая значимость смещения для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого и масла сливочного, которая была учтена при оценивании неопределенности. Для остальных видов продукции при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» и для всех видов продукции при использовании наборов реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин» была установлена незначимость смещения во всем диапазоне измерений.

Значения оценок относительной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности приведены в таблицах 3, 4.

Указанные в таблицах 1 – 4 метрологические характеристики получены на основании данных эксперимента в соответствии с:

- показатели прецизионности – СТБ ИСО 5725-2;
- показатели правильности – [1];
- оценки неопределенности – [1], [2].

Таблица 3 – Неопределенность результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

Виды продукции	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K = 2, P = 95\%$
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, сухая молочная сыворотка, масло сливочное, сыр, творог, молочная сыворотка, йогурт, кефир, сметана	11	22



Таблица 4 – Неопределенность результатов измерений, выполняемых в соответствии с МВИ при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин»

Виды продукции	Относительная стандартная неопределенность u , %	Относительная расширенная неопределенность U , %, $K = 2, P = 95\%$
Молоко (сырое, пастеризованное, стерилизованное), молоко сухое, восстановленные сухие молочные смеси для детского питания, йогурт, кефир, сметана, сухая молочная сыворотка, молочная сыворотка, коктейли на молочной основе, мороженое, творог, масло сливочное, сыр, жир, сало, в т.ч. шпик, субпродукты (почки)	11	22
Сгущенное молоко, мед, мясо, мясные продукты, яйца, субпродукты (печень), консервы мясные и мясорастительные	10	20

3 Средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование, материалы, реактивы

Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ OIML R 76–1 высокого класса точности с максимальной нагрузкой 200 г и допускаемой погрешностью $\pm 0,01$ г.

Автоматический микропланшетный фотометр с фильтром на 450 нм (допускаемая погрешность измерения оптической плотности не более $\pm 5\%$), например iMark Microplate Absorbance Reader, производства Bio-Rad Laboratories, Inc., США.

Программное обеспечение «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System», разработанное BIOO Scientific Corporation, версия не ниже 1.0 (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»), программное обеспечение на базе Microsoft Office Excel «Шаблон для обчета результатов ИФАантибиотик-стрептомицин», разработанное ООО «Компания Альгимед», версия не ниже 1.0 (при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин»).

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

Секундомер электронный «Интеграл С-01» по [3], производства ОАО «Интеграл» – управляющая компания холдинга «Интеграл», Республика Беларусь.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение не менее 4000 g (пробирки вместимостью 1,5 – 2 см³ и 15 см³) и охлаждение до температуры 10 °C, например 1236R, производства LaboGene Aps, Дания.

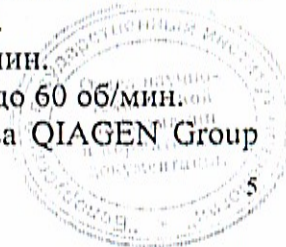
Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру от плюс 2 °C до плюс 8 °C в холодильной камере и не выше минус 18 °C в морозильной камере.

Лабораторный вортекс, обеспечивающий скорость вращения не менее 1800 об/мин, например MSV-3500, производства BioSan Ltd, Латвия.

Лабораторный шейкер, обеспечивающий скорость до 300 об/мин.

Лабораторный ротатор, обеспечивающий скорость вращения до 60 об/мин.

Гомогенизатор лабораторный типа TissueRuptor производства QIAGEN Group



(Германия) или бытовой блендер.

Баня водяная или термостат (сушильный шкаф), обеспечивающие поддержание температур $(52 \pm 2)^\circ\text{C}$, $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$, $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$.

Дозаторы пипеточные с комплектом одноразовых наконечников, например Acura manual 825, Acura manual 835, Acura manual 855 производства Socorex ISBA S.A., Швейцария:

- с диапазоном объемов дозирования от 10 до 100 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,5\%$;
- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5\%$;
- с диапазоном объемов дозирования от 1 до 10 см³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 2,0\%$;
- многоканальный с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм³ и относительным отклонением фактического объема дозы от номинального $\pm 1,5\%$.

Использование следующего оборудования не является обязательным, но рекомендуется для увеличения производительности и повышения точности измерений:

- инкубатор для микротитровальных планшетов, обеспечивающий поддержание температуры от плюс 20 °С до плюс 25 °С с точностью $\pm 1^\circ\text{C}$, например PST-60HL производства BioSan Ltd, Латвия;
- устройство отмывки иммунологических планшетов автоматическое с диапазоном объемов моющего раствора, заливаемого в каждую микроловушку от 100 мм³ до 350 мм³, например ELx 50/8, производства BioTek Instruments, Inc., США.

Пленка «парафильм» или скотч.

Микрофибровые салфетки для очистки оптических поверхностей.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Шпатели пластиковые.

Штатив для пробирок.

Пробирки полипропиленовые для центрифугирования вместимостью 15 см³, 50 см³.

Пробирки для центрифугирования с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 1,5 – 2 см³ или аналоги.

Пробирки стеклянные вместимостью от 1 см³ до 5 см, 10 см³.

Колбы конические вместимостью 100 см³, 250 см³, 500 см³ типа Кн-2-100-14/23 ХС, Кн-2-250-14/23 ХС, Кн-2-500-29/32 ХС по ГОСТ 25336.

Колбы мерные вместимостью 50 см³, 100 см³ типа 2-50-2, 2-100-2 по ГОСТ 1770.

Воронки типа В-56-80 ХС, В-75-110 ХС по ГОСТ 25336.

Стаканы Н-1 - 100 или Н-1 - 150 по ГОСТ 25336.

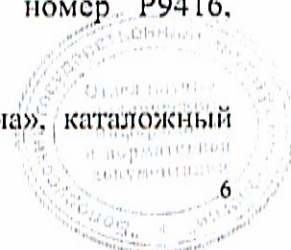
Цилиндры мерные вместимостью 25 см³, 100 см³ типа 3-25-2, 3-100-2 по ГОСТ 1770.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Твин-20 (полисорбат-20), например, твин-20, каталожный номер P9416, производства SIGMA

Лабораторный детергент, например Triton X-100.

Набор реагентов «MaxSignal®» для определения стрептомицина, каталожный



номер 1014-01B («MaxSignal® Streptomycin ELISA Test Kit», Reference # 1014-01B) производства BIOO Scientific Corporation (США) – набор реактивов и микротитровальный планшет, или набор реагентов «ИФА антибиотик – стрептомицин» по [4], каталожный номер C004-01, производства ООО «Компания Альгимед» (Республика Беларусь) – набор реактивов и микротитровальный планшет (иммуносорбент), необходимые для выполнения измерений по определению стрептомицина методом иммуноферментного анализа в составе (таблицы 5, 6).

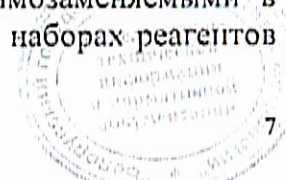
Таблица 5 – Состав набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

Компонент набора	Количество в комплекте
Микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок, покрытых стрептомицином)	1 шт
Градуировочные растворы стрептомицина с концентрацией 0 нг/см ³ , 0,5 нг/см ³ , 1 нг/см ³ , 2,5 нг/см ³ , 5 нг/см ³ , 10 нг/см ³	6 × 0,6 см ³
Антитела к стрептомицину №1	12 см ³
HRP-конъюгат антител № 2 (100× концентрат)	0,25 см ³
Растворитель для антител № 2	20 см ³
Экстракционный буфер для образцов (200× концентрат)	25 см ³
Промывочный раствор (20× концентрат)	28 см ³
Стоп-реагент	14 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Буфер для доведения проб	0,5 см ³
PBS буфер(10× концентрат)	25 см ³
Реагент для очистки	12 см ³
Буфер для доведения проб № 1 (1X Balance Buffer)	28 см ³

Таблица 6 – Состав набора реагентов «ИФА антибиотик – стрептомицин»

Компонент набора	Количество в комплекте
Иммуносорбент (микротитровальный планшет, включающий 12 стрипов по 8 лунок, покрытых стрептомицином)	1 шт
Градуировочные растворы стрептомицина с концентрацией 0.0 нг/см ³ , 0.5 нг/см ³ , 1.0 нг/см ³ , 2.5 нг/см ³ , 5.0 нг/см ³ , 15.0 нг/см ³	6 × 0,6 см ³
Раствор антител к стрептомицину	12 см ³
Конъюгат, готовый к применению	16 см ³
200× концентрат экстракционного буферного раствора	25 см ³
10× концентрат натрий-фосфатного буферного раствора	3 × 25 см ³
20× концентрат промывочного раствора	28 см ³
Стоп-реагент	12 см ³
ТМБ субстрат	12 см ³
Буферный раствор для доведения проб	0,5 см ³
Экстракционный буферный раствор А	12 см ³
Экстракционный буферный раствор В	28 см ³

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера в наборах реагентов производства BIOO Scientific Corporation:



- растворитель для антител № 2;
- концентрат экстракционного буфера для образцов;
- промывочный раствор;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат;
- буфер для доведения проб;
- концентрат PBS буфера.

Следующие компоненты набора реагентов являются взаимозаменяемыми в пределах их срока хранения при условии совпадения их номера серии в наборах реагентов производства ООО «Компания Альгимед»:

- 200× концентрат экстракционного буферного раствора;
- 10× концентрат натрий-фосфатного буферного раствора;
- 20× концентрат промывочного раствора;
- стоп-реагент;
- ТМБ субстрат;
- буферный раствор для доведения проб;
- экстракционный буферный раствор А;
- экстракционный буферный раствор В.

Допускается использовать другие средства измерений, испытательное и вспомогательное оборудование по метрологическим и техническим характеристикам, а материалы и реактивы (кроме наборов реагентов) по качеству не хуже указанных.

4 Метод измерений

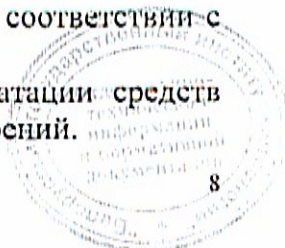
Используемый метод основан на конкурентном иммуноферментном анализе. В ходе анализа в лунки иммуносорбента (планшета), покрытого стрептомицином, вместе с пробой или градуировочным раствором добавляют первичные антитела, специфичные к стрептомицину. Присутствующий в пробе стрептомицин конкурирует со стрептомицином, нанесенным на стенки лунок, за связывание с первичными антителами. После внесения вторичных антител, конъюгированных с ферментом пероксидазой, последние связываются с первичными антителами, связанными со стрептомицином на стенках лунок. После добавления субстрата, а затем стоп-реагента, измеряется оптическая плотность раствора при 450 нм. Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от концентрации стрептомицина в градуировочном растворе или подготовленном растворе пробы. Массовая доля стрептомицина в образце определяется по градуировочной зависимости, построенной с использованием 6 градуировочных растворов.

5 Требования безопасности и требования к квалификации операторов

5.1 Общие требования безопасности

При выполнении работ в соответствии с данной методикой 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 при работе в химической лаборатории в соответствии с инструкциями, утвержденными в установленном порядке;
- техники безопасности, изложенные в инструкции по эксплуатации средств измерений и оборудования, применяемых при проведении измерений.



5.2 Требования к квалификации операторов

К проведению работ по данной методике допускаются лица, имеющие высшее специальное или среднее специальное образование по профилю выполняемых работ, прошедшие обучение приемам работы на оборудовании, освоившие выполнение всех операций, предусмотренных методикой, владеющие техникой постановки иммуноферментного анализа.

6 Условия выполнения измерений

При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от плюс 20 °С до плюс 25 °С;
- температура при приготовлении растворов (20 ± 2) °С;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре 25 °С.

7 Условия инкубации микротитровальных планшетов (иммуносорбентов) в помещении

При отсутствии инкубатора микротитровальные планшеты (иммуносорбенты) могут инкубироваться в помещении при выполнении следующих условий:

- температура окружающего воздуха должна быть от плюс 20 °С до плюс 25 °С;
- не должно происходить попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на котором находится планшет, рекомендуется помещать под него теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце;
- при низкой относительной влажности воздуха и наличии воздушных потоков с целью устранения возможности испарения содержимого лунок рекомендуется покрывать планшет (иммуносорбент) пленой «парафилм» или заклеивать скотчем;
- в особых случаях, которые оговорены по тексту МВИ, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например в ящик стола.

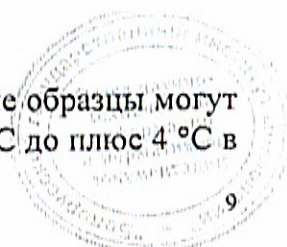
8 Условия хранения набора реагентов

Хранение набора реагентов осуществляется в холодильнике при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С в оригинальных флаконах и упаковке. Микротитровальные планшеты (иммуносорбенты) должны храниться в плотно закрытой упаковке. Дополнительные рекомендации по хранению набора реагентов приведены в инструкции производителя.

9 Подготовка к выполнению измерений

9.1 Отбор образцов

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036. Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С в



течение 2-х дней или в замороженном виде при температуре не выше минус 18 °С в течение 14 дней. Перед проведением подготовки проб по п. 9.5 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 °С до плюс 4 °С.

9.2 Подготовка лабораторной посуды

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

Запрещается:

- многократное использование одноразовой лабораторной посуды;
- использование бытовых моющих средств для мойки лабораторной посуды.

9.3 Приготовление растворов

9.3.1 Приготовление 1 % раствора твин-20

В мерную колбу вместимостью 100 см³ дозатором помещают навеску твин-20 массой 1,00 г, взвешенную с погрешностью не более 0,01 г, навеску растворяют в 20 – 25 см³ дистиллированной воды, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

1 % раствор твин-20 хранят защищенным от действия света в плотно закрытой стеклянной посуде при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более 3 месяцев.

Допускается использовать готовый 1 % раствор твин-20, который хранят в соответствии с инструкцией производителя.

9.3.2 Растворы, используемые при работе с наборами реагентов «MaxSignal ® для определения стрептомицина» и «ИФАантибиотик - стрептомицин»

9.3.3 Растворы, используемые при работе с набором реагентов «MaxSignal ® для определения стрептомицина»

9.3.3.1 Приготовление PBS-буфера

В коническую колбу вместимостью 100 см³ или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или мерным цилиндром аликвоту 10× концентрата PBS-буфера, добавляют мерным цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

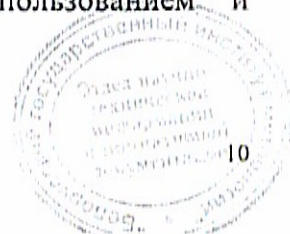
Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата PBS-буфера рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{6N_1 + V_1}{10}, \quad (1)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов молочной сыворотки, сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны;

V_1 – объем PBS-буфера, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 1 см³).

PBS-буфер приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.



9.3.3.2 Приготовление PBS-буфера с твином

В коническую колбу вместимостью 100 см³ или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или мерным цилиндром аликвоту 10х концентрата PBS-буфера, добавляют мерным цилиндром в 8 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают. Затем в колбу добавляют дозатором 1 % раствор твин-20, приготовленный по п. 9.3.1, объемом, равным объему добавленной аликвоты концентрата, и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата PBS-буфера рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{0,8N_2 + 8N_3 + V_1}{10}, \quad (2)$$

где N_2 — количество анализируемых образцов молока;

N_3 — количество анализируемых образцов масла, сыра, творога;

V_1 — объем PBS-буфера с твином, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 1 см³).

PBS-буфер с твином приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.3.4 Растворы, используемые при работе с набором реагентов «ИФАантибиотик - стрептомицин»

9.3.4.1 Приготовление фосфатного буферного раствора

В коническую колбу вместимостью 100 см³ или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или мерным цилиндром аликвоту 10х концентрата натрий-фосфатного буферного раствора, добавляют мерным цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, 10х концентрата натрий-фосфатного буферного раствора рассчитывается на основании количества анализируемых образцов мяса, мясных продуктов, печени, консервов мясных и мясорастительных по следующей формуле

$$V = \frac{8,4 \cdot N_1 + V_1}{10}, \quad (3)$$

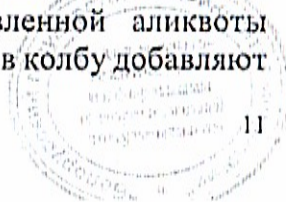
где N_1 — количество анализируемых образцов мяса, мясных продуктов, печени, консервов мясных и мясорастительных, яиц;

V_1 — объем фосфатного буферного раствора, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 3 см³).

Фосфатный буферный раствор приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.3.4.2 Приготовление фосфатного буферного раствора с твином

В коническую колбу вместимостью 100 см³ или 250 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) приливают дозатором или мерным цилиндром аликвоту 10х концентрата натрий-фосфатного буферного раствора, добавляют мерным цилиндром в 9 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают. Затем в колбу добавляют



дозатором 1 % раствор твин-20, приготовленный по п.9.3.1, объемом в 4 раза меньшим по отношению к объему добавленной аликвоты 10× концентрата натрий-фосфатного буферного раствора, и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата натрий-фосфатного буферного раствора рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{0,8N_1 + 8N_2 + V_1}{10}, \quad (4)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов молока (сырого, пастеризованного, стерилизованного), сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, сгущенного молока;

N_2 – количество анализируемых образцов масла сливочного, сыра, творога;

V_1 – объем фосфатного буферного раствора с твином, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 3 см³).

Фосфатный буферный раствор с твином приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.3.4.3 Приготовление экстракционного буферного раствора

В коническую колбу вместимостью 100 см³ приливают дозатором аликвоту 200× концентрата экстракционного буферного раствора, добавляют мерным цилиндром в 199 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем дистиллированной воды и перемешивают раствор.

Объем используемой аликвоты V , см³, концентрата экстракционного буферного раствора рассчитывается на основании количества анализируемых образцов по формуле

$$V = \frac{9N_1 + 38N_2 + V_1}{200}, \quad (5)$$

где N_1 – количество анализируемых образцов субпродуктов (почек), сала, в т.ч. шпика, жиров животных;

N_2 – количество анализируемых образцов меда;

V_1 – объем экстракционного буферного раствора, приготавливаемого в запас, см³ (не менее 5 см³).

Экстракционный буферный раствор приготавливается непосредственно перед использованием и хранению не подлежит.

9.4 Подготовка набора реагентов

9.4.1 Предварительная подготовка и правила обращения с наборами реагентов

Набор реагентов извлекают из холодильника, не открывая упаковку микротитровального планшета (иммуносорбента), выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С от 1 до 2 ч, доводят температуру остальных реагентов от плюс 20 °С до плюс 25 °С.

При работе необходимо исключить прямое попадание солнечных лучей на компоненты набора реагентов.

Растворы из набора реагентов следует готовить непосредственно перед проведением ИФА. Перед использованием жидкие реагенты необходимо перемешать

путем осторожного вращения или переворачивания флаконов. Не допускается переливать остатки реагентов обратно в оригинальные флаконы.

9.4.2 Подготовка микротитровального планшета (иммуносорбента)

Количество лунок микротитровального планшета (иммуносорбента), необходимых для проведения измерений N_w , рассчитывается по формуле

$$N_w = 12 + 2N_{\text{смп}}, \quad (6)$$

где $N_{\text{смп}}$ — количество образцов;

12 — количество лунок для градуировочных растворов.

Микротитровальный планшет со стрипами, предварительно подготовленными в соответствии с п. 9.4.1, вынимают из упаковки. В микротитровальный планшет помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок N_w . Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, закрывают и хранят в соответствии с разделом 8.

Распределение лунок для градуировочных растворов и проб проводят с учетом выполнения по два параллельных измерения градуировочных растворов и образцов согласно схеме, предлагаемой программным обеспечением «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System» (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина») или программным обеспечением на базе Microsoft Office Excel «Шаблон для обчета результатов ИФАантибиотик-стрептомицин» (при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин»).

Не следует одновременно использовать более шести стрипов. Если необходимо провести измерение более 18 образцов, ИФА выполняется несколько раз.

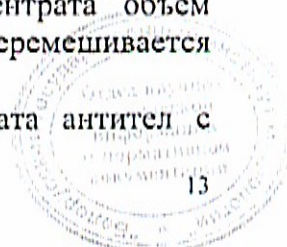
9.4.3 Приготовление промывочного раствора

Отмеренную мерным цилиндром или дозатором аликвоту 20×конcentрата промывочного раствора объемом от 1 до 14 см³ приливают в коническую колбу вместимостью 250 см³ или 500 см³ и добавляют отмеренную мерным цилиндром вместимостью 25 см³ или 100 см³ (в зависимости от добавляемого объема) дистиллированную воду. Объем добавляемой дистиллированной воды должен быть в 19 раз больше, чем объем концентрата промывочного раствора. После перемешивания содержимое колбы переливают в емкость с закручивающейся пробкой. Если приготовленный объем раствора не превышает 50 см³, то для его приготовления и хранения могут использоваться пробирки для центрифугирования вместимостью 50 см³. Полученный раствор хранят при температуре от плюс 2 °С до плюс 8 °С не более одного месяца в стеклянной или полистиленовой посуде.

9.4.4 Приготовление конъюгата антител с пероксидазой № 2 (при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»)

В стеклянную пробирку вместимостью 5 см³ или 10 см³ (в зависимости от объема приготавливаемого раствора) отбирают дозатором аликвоту концентрата конъюгата антител с пероксидазой № 2 объемом не менее 20 мм³, добавляют дозатором в 99 раз больший по отношению к объему добавленной аликвоты концентрата объем растворителя для антител № 2. Содержимое пробирки тщательно перемешивается путем вращения закрытой пробирки.

Объем используемой аликвоты V , мм³, концентрата конъюгата антител с



пероксидазой № 2 рассчитывается на основании количества используемых лунок микротитровального планшета по формуле

$$V = \frac{150N_w + V_1}{100}, \quad (7)$$

где N_w – количество лунок микротитровального планшета, используемых при проведении измерений, рассчитывается по п. 9.4.2;

V_1 – объем конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготавливаемого в запас, мм³ (не менее 200 мм³).

Конъюгат антител с пероксидазой № 2 приготавливается непосредственно перед проведением ИФА и хранению не подлежит.

9.5 Подготовка проб

9.5.1 Подготовка проб при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

9.5.1.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Образец молока переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³ в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, и тщательно перемешивают на вортексе.

От образца молока с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробирки с пробами в следующем режиме: 4000 g, 5 мин. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм³ и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм³ PBS-буфера с твином, приготовленного по п. 9.3.3.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение трех часов.

9.5.1.2 Подготовка проб сухого молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. От образца сухого молока отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в стеклянные пробирки вместимостью 10 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные с помощью дозатора 9 см³ дистиллированной воды. Содержимое пробирок встряхивают до полного растворения, после чего выдерживают в течение 15 мин и перемешивают.

От восстановленного как описано выше сухого молока с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см³ и помещают в пробирки для

центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробирки с пробами в следующем режиме: 4000 g, 5 мин. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм³ и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм³ PBS-буфера с твином, приготовленного по п. 9.3.3.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение трех часов.

9.5.1.3 Подготовка проб йогурта, кефира, сметаны, молочной сыворотки, сухой молочной сыворотки

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру представленного образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают 2 параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. К навеске приливают небольшими порциями по 10–20 см³ дистиллированную воду, перемешивая содержимое вращением колбы до полного растворения, затем доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

При наличии в образце йогурта частиц твердой консистенции их отбрасывают. Перед взятием навески испытуемый образец тщательно перемешивают.

От образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки с пробами добавляют отмеренные дозатором 125 мм³ реагента для очистки и перемешивают на вортексе в течение 30 с на максимальной скорости.

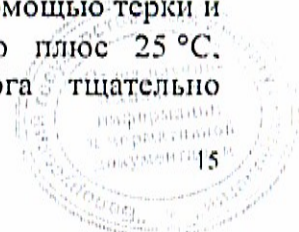
Пробирки с пробами центрифугируют в следующем режиме: 4000 g, 5 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 100 мм³ из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нее верхнего слоя жира и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью от 1 до 5 см³. В пробирки дозатором добавляют 344 мм³ буфера для доведения проб № 1 и тщательно перемешивают на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение трех часов.

9.5.1.4 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Образец масла, охлажденный до температуры не выше минус 10 °С, измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре. Образец творога тщательно



гомогенизируют, избегая отделения сыворотки.

От гомогенизированного образца отбирают две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Навески помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³ и в каждую пробирку добавляют отмеренные дозатором 4 см³ PBS-буфера с твином, приготовленного по п. 9.3.3.2. Пробирки с пробами выдерживают на водяной бане при температуре $(52 \pm 2)^\circ\text{C}$ до расплавления пробы, но не менее 2 мин.

Затем пробирки с пробами интенсивно встряхивают на шейкере или вручную в течение 5 мин, после чего центрифугируют в следующем режиме: 4000 г, 10 мин.

Дозатором отбирают аликвоты объемом 1 см³ из нижнего (водного) слоя, избегая попадания в нес верхнего слоя жира, и переносят их в стеклянные пробирки вместимостью от 1 до 5 см³.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °C до плюс 25 °C в течение трех часов.

9.5.1.5 Получение разбавленных растворов проб

При получении результатов измерений проб больших, чем значение, соответствующее верхней границе диапазона градуировки (10,0 нг/см³), согласно п. 11.2 проводят разбавление приготовленных по п.9.5.1.1 – 9.5.1.4 растворов проб следующими растворителями:

- пробы масла сливочного, сыра, творога, молока, сухого молока – PBS-буфер с твином;
- пробы йогурта, кефира, сметаны, молочной сыворотки, сухой молочной сыворотки – буфер для доведения проб № 1.

Разбавлению должны подвергаться свежеприготовленные растворы проб.

При проведении разбавления отобранные дозатором аликвоты растворов проб объемом V_a , мм³, переносят в стеклянные пробирки вместимостью от 1 до 5 см³. В пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом V_b , мм³, и перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Коэффициент разбавления K рассчитывается по формуле

$$K = \frac{V_a + V_b}{V_a} \quad (8)$$

Величины V_a , V_b должны соответствовать условию (9), и выбираются таким образом, чтобы концентрация стрептомицина в разбавленном растворе пробы находилась в диапазоне градуировки.

$$500 \leq (V_b + V_a) \leq 1000 \quad (9)$$

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °C до плюс 25 °C в течение трех часов.

9.5.2 Подготовка проб при использовании набора реагентов «ИФА антибиотик-стрептомицин»

9.5.2.1 Подготовка проб сырого, стерилизованного и пастеризованного молока

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °C до плюс 25 °C, выдерживая его при

комнатной температуре и тщательно перемешивают.

Образец молока переносят в коническую колбу вместимостью 100 см³ в таком количестве, чтобы колба заполнилась примерно до половины своей вместимости, и тщательно перемешивают на вортексе.

От образца молока с помощью дозатора отбирают две параллельные пробы объемом 5 см³ и помещают в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробирки с пробами в следующем режиме: 10 °С, 4000 g, 5 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10 – 15 мин, охлаждая пробы до температуры от плюс 7 °С до плюс 8 °С, контролируя температуру термометром. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренного молока объемом 100 мм³ и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью 1,5 – 2 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм³ фосфатного буферного раствора с твином, приготовленного по п. 9.3.4.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение трех часов.

9.5.2.2 Подготовка проб сухого молока, сухих молочных смесей для детского питания

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при комнатной температуре.

В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают две параллельные навески образца, взвешенные с погрешностью не более 0,1 г. Массы навесок сухого молока в зависимости от содержания жира составляют:

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;
- 10,0 г сухого молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше.

Массы навесок сухих молочных смесей для детского питания рассчитывают, используя отношение массы смеси к объему воды, указанное в инструкции производителя.

Затем в колбы с навесками порциями по 10 – 20 см³ приливают нагретую до температуры 40 °С дистиллированную воду объемом 80 – 90 см³, перемешивая содержимое до полного растворения образца. После растворения навесок растворы в колбах охлаждают до температуры окружающей среды, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Пробы выдерживают при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение 15 мин.

От каждой из восстановленных как описано выше проб с помощью дозатора отбирают аликвоту объемом 10 см³ и помещают их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. Центрифугируют пробирки с пробами в следующем режиме: 10 °С, 4000 g, 5 мин. При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение 10 – 15 мин, охлаждая пробы до температуры от плюс 7 °С до плюс 8 °С, контролируя

температуру термометром. Шпателем или наконечником дозатора удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности молока после центрифугирования. Для обезжиренного молока описанную выше процедуру по удалению жира не производят.

Отбирают дозатором аликвоты обезжиренных проб объемом 100 мм^3 и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5 - 2 \text{ см}^3$ (перед тем, как вылить раствор в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления возможных следов жира). В пробирки добавляют отмеренные дозатором 400 мм^3 фосфатного буферного раствора с твином, приготовленного по п. 9.3.4.2, и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C в течение трех часов.

9.5.2.3 Подготовка проб сгущенного молока

Доводят температуру образца от плюс 20°C до плюс 25°C , выдерживая его при температуре окружающей среды и тщательно перемешивают.

Отбирают две параллельные навески массой $12,5 \text{ г}$, взвешенные с погрешностью не более $0,1 \text{ г}$, и помещают в мерные колбы вместимостью 50 см^3 . В мерные колбы с навесками приливают отмеренную дозатором дистиллированную воду порциями по $10 - 20 \text{ см}^3$, нагретую до температуры 40°C , перемешивая содержимое колб вращением до полного растворения навески. После охлаждения до температуры окружающей среды растворы в колбах доводят до метки дистиллированной водой. Из каждой колбы отбирают дозатором аликвоты объемом 10 см^3 и переносят в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см^3 .

Пробирки с аликвотами центрифугируют в следующем режиме: 10°C , 4000 g , 20 мин . При отсутствии центрифуги с охлаждением пробирки перед центрифугированием выдерживают в морозильной камере холодильника в течение $10 - 15 \text{ мин}$, охлаждая пробы до температуры от плюс 7°C до плюс 8°C , контролируя температуру термометром. Шпателем или пипеткой Пастера удаляют верхний жировой слой, образовавшийся на поверхности после центрифугирования.

Аликвоты объемом 100 мм^3 обезжиренных разбавленных проб, полученных как описано выше, отбирают дозатором и переносят в пробирки для центрифугирования типа Эппендорф вместимостью $1,5 - 2 \text{ см}^3$ (перед тем, как вылить раствор в пробирку, наконечник пипет-дозатора вытирают фильтровальной бумагой для удаления возможных следов жира). Затем в пробирки добавляют 400 мм^3 фосфатного буферного раствора с твином, приготовленного по п. 9.3.4.2, и перемешивают содержимое пробирок на вортексе.

Полученные растворы проб используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20°C до плюс 25°C в течение трех часов.

9.5.2.4 Подготовка проб масла сливочного, сыра, творога

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1. Образец масла, охлажденный до температуры не выше минус 10°C , измельчают с помощью терки и перемешивают. У образца сыра отделяют тесто от корки, полимерно-парафинового или воскового сплава, измельчают тесто с помощью терки и перемешивают. Доводят температуру образца от плюс 20°C до плюс 25°C , выдерживая его при температуре окружающей среды. Образец творога тщательно

9.5.2.8 Подготовка проб молочной сыворотки, сухой молочной сыворотки, йогурта, кефира, сметаны, коктейлей на молочной основе, мороженого

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с п. 9.1.

От образца йогурта или мороженого предварительно отделяют твердые немолочные компоненты и отбрасывают. Доводят температуру образца от плюс 20 °С до плюс 25 °С, выдерживая его при температуре окружающей среды, и тщательно перемешивают. При необходимости для обеспечения однородности применяют гомогенизатор.

Сухую молочную сыворотку восстанавливают следующим образом. В мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают две параллельные навески образца массой 6,25 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г. Затем в колбы с навесками добавляют порциями по 10–20 см³ дистиллированную воду объемом 80–90 см³, перемешивая содержимое до полного растворения образца. После растворения навесок растворы доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Пробы выдерживают при температуре окружающей среды в течение 15 мин.

От подготовленных, как описано выше, образцов йогурта, кефира, сметаны, коктейлей на молочной основе, мороженого отбирают по две параллельные навески массой 1,00 г, взвешенные с погрешностью не более 0,01 г, молочной сыворотки и восстановленной, как описано выше, сухой молочной выворотки – по две параллельные аликвоты объемом 1,0 см³, и переносят их в пробирки для центрифугирования вместимостью 15 см³. В пробирки добавляют по 125 мм³ экстракционного буферного раствора А, отмеренного дозатором и перемешивают на вортексе в течение 30 с на максимальной скорости.

Центрифугируют пробирки с пробами в следующем режиме: 4000 g, 5 мин. Отбирают дозатором аликвоты объемом 100 мм³ из нижнего (водного) слоя, избегая попадания верхнего слоя жира, и переносят в стеклянные пробирки вместимостью от 1 до 5 см³. В пробирки добавляют отмеренные дозатором по 344 мм³ экстракционного буферного раствора В и тщательно перемешивают содержимое на вортексе.

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение трех часов.

9.5.2.9 Получение разбавленных растворов проб

При получении результатов измерений проб больших, чем значение, соответствующее верхней границе диапазона градуировки ($15,0 \text{ нг/см}^3$), согласно п. 11.2 проводят разбавление приготовленных по п. 9.5.2.1 – 9.5.2.8 растворов проб следующими растворителями:

- пробы молока, сухого молока, восстановленных сухих молочных смесей для детского питания, сгущенного молока, сыра, сливочного масла, творога - фосфатным буферным раствором с твином, приготовленным по п. 9.3.4.2;
- пробы мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, печени, консервов мясных и мясорастительных, яиц - фосфатным буферным раствором, приготовленным по п. 9.3.4.1;
- пробы животных жиров, сала, шпика, почек, меда, йогурта, кефира, сметаны, коктейлей на молочной основе, мороженого, молочной сыворотки, сухой молочной сыворотки - дистиллированной водой.

Разбавлению должны подвергаться свежеприготовленные растворы проб.

При проведении разбавления отобранные дозатором аликвоты растворов проб

объемом V_a , мм³, переносят в стеклянные пробирки вместимостью от 1 до 5 см³. В пробирки добавляют отмеренный дозатором буфер для разбавления проб объемом V_6 , мм³, и перемешивают на вортексе в течение 30 с.

Коэффициент разбавления K рассчитывается по формуле

$$K = \frac{V_a + V_6}{V_a} \quad (10)$$

Величины V_a , V_6 должны соответствовать условию (11), и выбираются таким образом, чтобы концентрация стрептомицина в разбавленном растворе пробы находилась в диапазоне градуировки.

$$500 \leq (V_6 + V_a) \leq 1000 \quad (11)$$

Полученные подготовленные пробы используются для проведения ИФА. Допускается хранение подготовленных проб при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С в течение трех часов.

10 Выполнение измерений

10.1 Общие требования

Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с п. 9.5. Компоненты набора реагентов подготавливают в соответствии с п. 9.4.

10.2 Дозирование компонентов набора реагентов и последовательность операций при выполнении анализа

10.2.1 Внесение градуировочных растворов и растворов проб

В лунки микротитровального планшета (иммуносорбента), размеченного согласно п. 9.4.2, вносят отобранные дозатором две аликвоты объемом 50 мм³ каждого градуировочного раствора. Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку, внесение производится в порядке возрастания концентраций градуировочных растворов:

- 0,0 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 нг/см³ (при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения стрептомицина»);
- 0,0 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 15,0 нг/см³ (при использовании набора реагентов ИФАантибиотик-стрептомицин).

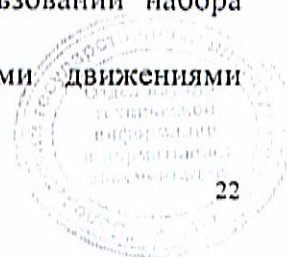
Затем в соответствующие лунки микротитровального планшета вносят отобранные дозатором аликвоты объемом 50 мм³ двух параллельных проб каждого образца.

10.2.2 Добавление антител

В каждую лунку микротитровального планшета (иммуносорбента) вносят дозатором:

- по 100 мм³ раствора антител №1 (при использовании набора реагентов «MaxSignal ® для определения стрептомицина»);
- по 100 мм³ раствора антител к стрептомицину (при использовании набора реагентов ИФАантибиотик-стрептомицин).

Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.



10.2.3 Инкубация

Помещают микротитровальный планшет (иммуносорбент) в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора планшет инкубируют в течение 30 мин в помещении при условиях, указанных в разделе 7.

10.2.4 Промывка планшета (иммуносорбента)

По окончании инкубации аккуратно удаляют пленку, закрывающую лунки (если инкубация проводилась в помещении). Выливают содержимое лунок микротитровального планшета (иммуносорбента) путем его резкого переворачивания. Промывают планшет три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 250 мм³ промывочного раствора, приготовленного по п. 9.4.3, и затем выливая его резким переворачиванием планшета.

Рекомендуется проводить процедуру промывки планшета с помощью устройства для отмывки планшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывки – от 3 до 4, объем заливаемого моющего раствора – 250 мм³.

После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости легким постукиванием по поверхности стола, накрытого сухим листом фильтровальной бумаги.

10.2.5 Добавление конъюгата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки микротитровального планшета (иммуносорбента) добавляют:

- по 150 мм³ конъюгата антител с пероксидазой № 2, приготовленного по п. 9.4.4 (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»);
- по 150 мм³ конъюгата (при использовании набора реагентов ИФАантибиотик-стрептомицин).

После добавления конъюгата аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

10.2.6 Инкубация

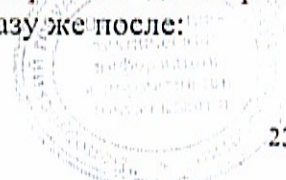
Сразу же после добавления конъюгата антител с пероксидазой № 2 микротитровальный планшет (иммуносорбент) помещают в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 30 мин. При отсутствии инкубатора планшет инкубируют в течение 30 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

10.2.7 Промывка

Промывают микротитровальный планшет (иммуносорбент) в соответствии с п. 10.2.4.

10.2.8 Добавление ТМВ-субстрата

Немедленно после удаления остатков промывочного раствора в лунки микротитровального планшета (иммуносорбента) добавляют отмеренные дозатором 100 мм³ ТМВ-субстрата. Отсчет времени инкубации начинают сразу же после:



- добавления ТМБ–субстрата во все лунки при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»;
- добавления ТМБ–субстрата в первую лунку при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин».

Перемешивают содержимое лунок медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 1 мин.

Не допускается выливать обратно в оригинальный флакон остатки субстрата во избежание его контаминации.

10.2.9 Инкубация

Микротитровальный планшет (иммуносорбент) помещают в инкубатор при температуре от плюс 20 °С до плюс 25 °С и инкубируют в течение 15 мин. При отсутствии инкубатора планшет инкубируют в течение 15 мин в защищенном от света месте при условиях, указанных в разделе 7.

10.2.10 Завершение реакции окрашивания

Сразу же после окончания времени инкубации в лунки микротитровального планшета (иммуносорбента) вносят по 100 мм³ стоп-реагента, отмеренных дозатором, и аккуратными круговыми движениями планшета перемешивают содержимое лунок.

10.2.11 Измерение оптической плотности

Немедленно после перемешивания вытирают микрофибровой салфеткой нижнюю наружную поверхность лунок микротитровального планшета (иммуносорбента) и измеряют оптическую плотность лунок с помощью автоматического микропланшетного фотометра при длине волны 450 нм. Измерения проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора.

11 Обработка результатов измерения

11.1 Расчет массовой доли

Программное обеспечение «MaxSignal® ELISA Detection Analysis System» (при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина») и программное обеспечение на базе Microsoft Office Excel «Шаблон для обсечета результатов ИФАантибиотик-стрептомицин» (при использовании набора реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин»), далее «программное обеспечение» производит обработку результатов измерений оптической плотности, введенных оператором с помощью интерфейса программного обеспечения.

Программное обеспечение выполняет построение градуировочной зависимости относительной оптической плотности B/B_0 от натурального логарифма концентрации стрептомицина вида

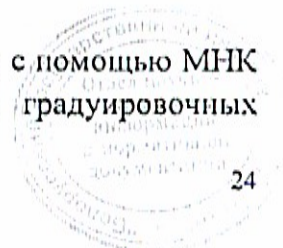
$$B/B_0 = a + b \cdot \ln C, \quad (12)$$

где B – оптическая плотность раствора стрептомицина;

B_0 – оптическая плотность 1-го градуировочного раствора с концентрацией стрептомицина 0,00 нг/см³;

C – концентрация стрептомицина в растворе, нг/см³.

Расчет коэффициентов линейной регрессии a, b производится с помощью МНК на основании пар значений B_i/B_0 , $\ln C_i$ полученных для пяти градуировочных



растворов, где ($i = 2..6$). C_i — концентрация i -го градуировочного раствора, B_i — среднее значение оптической плотности, рассчитанное по двум значениям оптической плотности параллельных измерений i -го градуировочного раствора.

Массовая доля стрептомицина в пробе рассчитывается на основании результатов измерений оптической плотности раствора подготовленной пробы, коэффициентов линейной регрессии и фактора разбавления по формуле

$$X = F \cdot \exp\left(\frac{B_x/B_0 - a}{b}\right), \quad (13)$$

где X — массовая доля стрептомицина в пробе, мкг/кг;

B_x — оптическая плотность, полученная при измерении раствора пробы;

F — фактор разбавления пробы, имеющий следующие значения:

- 10 — для мяса, готовых к употреблению мясных продуктов, субпродуктов, консервов мясных и мясорастительных, яиц, сала, в т.ч. шпика, жиров животных;
- 20 — для меда, сгущенного молока;
- 5 — для остальных видов продукции согласно области применения, указанной в разделе 1.

При получении результатов измерений проб выше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки (10 нг/см³ при использовании набора реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина», 15,0 нг/см³ при использовании набора реагентов ИФАнтибиотик-стрептомицин), выполняются действия согласно п. 11.2.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб при выполнении условия повторяемости по п. 11.3

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (14)$$

где X_1, X_2 — результаты двух измерений массовой доли стрептомицина в параллельных пробах, мкг/кг.

Окончательный результат измерений округляют до трех значащих цифр.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерений, то дается односторонняя оценка массовой доли стрептомицина в образце с использованием предела измерения согласно п. 12.2.

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений, то дается односторонняя оценка массовой доли стрептомицина в образце с использованием значения верхней границы предела измерений согласно п. 12.3.

11.2 Определение массовой доли стрептомицина при получении результатов измерений больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки

При получении результатов измерений проб больше значения, соответствующего верхней границе диапазона градуировки, проводят разбавление растворов проб согласно п. 9.5.1.5.

В этом случае при обработке результатов измерений массовой доли стрептомицина в вышеупомянутых пробах при расчете по формуле (13) для

разбавленных растворов проб в качестве фактора разбавления используется значение величины F' , рассчитываемой по формуле

$$F' = F \cdot K \quad (15)$$

где K – коэффициент разбавления, рассчитываемый по формуле (8);
 F – значение фактора разбавления, указанное в п. 11.1.

11.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Рассчитывают расхождение между результатами измерений параллельных проб одного образца $|X_1 - X_2|$, значение которого сравнивают с абсолютным значением предела повторяемости r_{abs} . Если выполняется условие

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (16)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое значение $\bar{X}$, рассчитанное по формуле (14).

Абсолютное значение предела повторяемости r_{abs} , мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (17)$$

где $\bar{X}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений параллельных проб одного образца, мкг/кг;

r – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблицах 7, 8, %.

При невыполнении условия (16) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

12 Оформление результатов измерений

12.1 Форма представления результатов измерения с использованием расширенной неопределенности

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(X)), \text{ мкг/кг}$$

при доверительной вероятности $P = 0,95$, $K=2$

где $\bar{X}$ – результат измерений, мкг/кг, полученный в соответствии с настоящей методикой и рассчитанный согласно разделу 11;

$U(X)$ – расширенная неопределенность результатов измерений, мкг/кг.

Расширенную неопределенность результата измерений $U(X)$, мкг/кг, рассчитывают по формуле

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (18)$$

где U – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с МВИ, %, приведенная в таблицах 3, 4.

При необходимости может быть проведена оценка расширенной неопределенности измерений, выполняемых в соответствии с данной МВИ при ее реализации в конкретной лаборатории.

12.2 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли стрептомицина с использованием предела измерения

Если окончательный результат измерений $\bar{X}$ оказывается меньше, чем предел измерения X_{LQ} , указанный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой доли стрептомицина в образце с использованием предела измерения, в мкг/кг

менее X_{LQ} ,

где X_{LQ} – значение предела измерений, приведенное в разделе 1.

12.3 Форма представления результатов в виде односторонней оценки массовой доли стрептомицина с использованием значения верхней границы диапазона измерений

Если конечный результат измерений $\bar{X}$ оказывается больше, чем значение верхней границы диапазона измерений X_{UL} , указанный в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой доли стрептомицина в образце с использованием значения верхней границы диапазона измерений, в мкг/кг

более X_{UL} ,

где X_{UL} – значение верхней границы диапазона измерений, приведенное в разделе 1.

13 Контроль точности измерений

Контроль точности измерений выполняется с периодичностью, установленной системой менеджмента качества в лаборатории, но обязательно:

- при внедрении методики;
- при появлении факторов, влияющих на стабильность процесса по результатам анализа контрольных карт;
- при значимых изменениях в условиях измерений (другая партия реагентов, новые средства измерений, ремонт оборудования и т.д.);
- при любых выявленных несоответствиях в работе лаборатории, применительно к методике выполнения измерений.

13.1 Оперативный контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Оперативный контроль повторяемости выполняется для каждой пробы после измерения концентрации стрептомицина при расчете конечного результата измерений по результатам двух параллельных определений в соответствии с п. 11.3.

13.2 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами оператор-время, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений $\bar{X}_1, \bar{X}_2$ согласно разделу 10.

варьируя факторы промежуточной прецизионности (оператор, время) и обеспечивая контроль повторяемости по п. 11.3. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение двух результатов $\bar{X}_1, \bar{X}_2$

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (19)$$

при их соответствии условию (20)

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{abs}, \quad (20)$$

где CD_{abs} – абсолютное значение критической разности, мг/кг, рассчитываемое по формуле

$$CD_{abs} = 0,01 \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (21)$$

где CD – относительное значение критической разности, приведенное в таблицах 7, 8, %.

13.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Проверку приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 10 и получает результат измерений, обеспечивая контроль повторяемости по п. 11.3.

Рассчитывают среднее арифметическое значение $\bar{\bar{X}}$, мг/кг, результатов измерений двух лабораторий $\bar{X}_1$ и $\bar{X}_2$ соответственно

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2} \quad (22)$$

Рассчитывают абсолютное расхождение между результатами измерений $|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$, полученными в двух лабораториях, значение, которого сравнивают с абсолютным значением критической разности CD_R . Если выполняется условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_R, \quad (23)$$

то оба конечных результата, полученные двумя лабораториями считаются приемлемыми и общее среднее значение $\bar{\bar{X}}$, рассчитанное по формуле (22), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Абсолютное значение критической разности CD_R , мг/кг, рассчитывают по формуле

$$CD_R = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (24)$$

где $\bar{\bar{X}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений двух лабораторий, мг/кг;

k – коэффициент, равный 1,2;

CD – относительное значение критической разности, %, приведенное в таблицах 7, 8.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры,

Таблица 7 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина»

Таблица 8 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности при использовании наборов реагентов «ИФАантибиотик-стрептомицин»

13.4 Контроль правильности

Контроль правильности проводится с использованием добавок стрептомицина. Неопределенность приписанного значения массовой доли стрептомицина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

13.4.1 ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавкой

$$X_{am} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (25)$$

где C_{st} – концентрация раствора стрептомицина, нг/см³;

V_{st} – объем раствора стрептомицина, см³;

m – масса навески пробы, г.

Величина массовой доли стрептомицина в пробе с добавкой должна находиться в диапазоне измерений.

Значение концентрации в растворе для добавки должно обеспечивать возможность внесения добавки стрептомицина во всем диапазоне измерений МВИ. Относительная стандартная неопределенность массовой концентрации стрептомицина в растворе для добавки должна быть не более 3 %, относительная стандартная неопределенность добавляемого объема раствора – не более 1,5%.

13.4.2 Проведение контрольной процедуры

При проведении контрольной процедуры для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого и масла сливочного при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» получают серию из шести результатов измерений ОК в условиях повторяемости в соответствии с требованиями раздела 10. При проведении контрольной процедуры в остальных случаях получают два результата измерений параллельных проб ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения, $\overline{X_K}$, мкг/кг, принимают:

- при проведении контрольной процедуры для молока сырого, пастеризованного, стерилизованного, молока сухого и масла сливочного при использовании наборов реагентов «MaxSignal® для определения стрептомицина» – результат измерения массовой доли стрептомицина в ОК, рассчитанный по формуле (26), при выполнении условия повторяемости по п. 11.3 с использованием вместо относительного предела повторяемости r , приведенного в таблице 7, значения $1,43 \cdot r$;
- при проведении контрольной процедуры в остальных случаях – результат измерения массовой доли стрептомицина в ОК, рассчитанный по формуле (22) при выполнении условия повторяемости по п. 11.3.

$$\overline{X_K} = \frac{\sum_{i=1}^6 X_i}{6}, \quad (26)$$

где X_i – i -ый результат измерений ОК, мкг/кг.

Критерием приемлемости является условие

$$|\overline{X_K} - X_{am}| \leq 0,01 \cdot K_{omn} \cdot \overline{X_K}, \quad (27)$$

где K_{omn} – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблицах 7, 8.

X_{am} – установленное значение массовой доли стрептомицина в ОК, мкг/кг.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (27) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.5 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта (КК)

С помощью КК контролируют следующие показатели точности:

- повторяемость (R-карта или карта размахов);
- наличие смещения или правильность (Recovery-карта).

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [5] и СТБ ИСО 5725-6-2002, раздел 6.

Для проверки стабильности соответствия результатов испытаний показателям повторяемости, установленным данной методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для построения КК используют показатели повторяемости в соответствии с таблицами 1, 2.

Примечание: При применении КК в течение длительного времени, для расчета границ КК могут быть использованы данные измерений, накопленные в процессе ведения и обработки КК. Однако соответствие результатов измерений требованиям данной методики может быть заявлено только в том случае, если показатель повторяемости, рассчитанный по накопленным лабораторией данным, статистически не превышает установленных методикой значений.

Для построения и ведения R-карт в качестве образцов для контроля (ОК) могут использоваться рабочие образцы.

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками раствора стрептомицина, приготовленного из стрептомицина сульфата в соответствии с прилагаемой инструкцией. Предварительно установленная массовая доля стрептомицина в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения данной МВИ. Рекомендуется вносить добавку стрептомицина в образцы для контроля на уровне значений массовой доли в рабочих пробах.

13.5.1 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация КК размахов для контроля стабильности СКО повторяемости

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (28)$$

где σ_r – относительное СКО повторяемости, %, приведенное в таблице 1.

- Предупреждающие границы

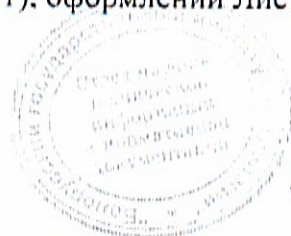
$$UCL = D_2' \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r, \quad (29)$$

- Границы регулирования

$$UCL = D_2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r, \quad (30)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.

Ведение КК предусматривает набор данных X_1, X_2 при выполнении испытаний ОК в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой, расчета фактических относительных значений размаха W по формуле (31), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.



$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (31)$$

где X_1, X_2 – значение результатов измерений в условиях повторяемости.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5], п. 7.

Оценку СКО повторяемости S_r за контролируемый период получают по формулам (31), (32)

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N W_i / N}{d_2}, \quad (32)$$

где N – общее число измерений (точек) на КК, для получения значений центральной линии и границ необходимо, чтобы $N = 15..20$;

d_2 – коэффициент, $d_2 = 1,128$.

13.5.2 Расчет параметров, ведение и оформление данных, интерпретация Recovery-карт для контроля стабильности правильности

Рассчитываются значения центральной линии, границ регулирования и предупреждающих границ по формулам

- Центральная линия

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N}, \quad (33)$$

где N – количество измерений для расчета значений центральной линии и границ КК;

Rec_i – значение извлечения (Recovery), %, рассчитываемое по результатам i -го измерения пробы с добавкой стрептомицина, по формуле

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{exp}} \cdot 100, \quad (34)$$

где X_i – массовая доля стрептомицина в пробе с добавкой, полученное для i -го измерения, мкг/кг;

X_{exp} – рассчитанное значение массовой доли стрептомицина в пробе с добавкой, мкг/кг.

- Предупреждающие границы

$$UCL = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC}, \quad (35)$$

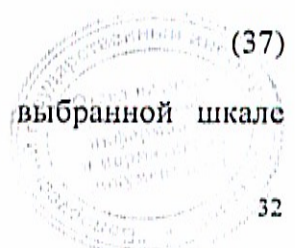
- Границы регулирования

$$UCL = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC} \quad LCL = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC} \quad (36)$$

где S_{REC} – стандартное отклонение извлечения, %, рассчитываемое по формуле

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N-1}} \quad (37)$$

Графическое построение КК состоит в проведении на выбранной шкале центральной линии и контрольных границ.



Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений X_i при выполнении испытаний ОК в соответствии с МВИ, расчета фактических значений коэффициента извлечения Rec_i по формуле (34), оформлении Листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [5], п. 7.

14 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие документы:

ГОСТ 8.010–2013	Государственная система обеспечения единства измерений. Методика выполнения измерений. Основные положения
ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ OIML R 76-1-2011	Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
ГОСТ 24104–2001	Весы лабораторные. Общие технические требования
ГОСТ 25336–82 Е	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 28498–90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний
ГОСТ 29227-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования
СТБ 1036–97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности.
СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6 Использование значений точности на практике
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры
ГОСТ 29169-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой



Библиография

[1]	VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data. V.J. Barwick and S.L.R. Ellison, LGC/VAM/1998/088
[2]	ISO 21748:2010 Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценивании неопределенности измерения
[3]	ТУ ВУ 100231303.011-2002 Секундомер электронный «Интеграл С-01»
[4]	ТУ ВУ 191218537.004-2015 Набор реагентов для определения содержания антибиотика стрептомицина в продуктах животного происхождения методом иммуноферментного анализа «ИФА антибиотик – стрептомицин»
[5]	ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта

