

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

ПРОЦЕДУРА ПО АККРЕДИТАЦИИ ООС

РУКОВОДСТВО ПО ВАЛИДАЦИИ И ВЕРИФИКАЦИИ МЕТОДОВ

Дата введения	№ издания	Весь документ или № страниц	Разработчики	Согласовано	Одобрено	Утверждено
01.10.2021	№3	П.3 П.4	Котова Е.В. Момукулова А. Д.	Таранчиева М.Ю	На заседании ТК ЛАБ (№57-4-2021 от 03.09.2021г.)	Чапаев Ж.Ж.
01.11.2022	№4	Структура документа	Котова Е.В. Ибраева С. Б. Соразработчики: Сайдалимов М.Т. Полевая А.В.	Таранчиева М.Ю Момукулова А. Д.	На заседании ТК ЛАБ (№59-1-2022 от 23.09.2022 г.)	Жунушакунов К.Ш.
15.01.2024	№5	П.3 Раздел II, Раздел III Раздел IV, Раздел V, Раздел VIII, Раздел IX, Приложения Ж, И	Котова Е.В. Ибраева С. Б. 	Таранчиева М.Ю Момукулова А. Д. 	На заседании ТК ЛАБ (№63-3-2023 от 19.12.2023 г.)	Чапаев Ж.Ж.
15.11.2024	№6	Раздел I Раздел II Раздел IV	Котова Е.В. 	Бегалиева Г.А. 	На заседании ТК ЛАБ (ТК ЛАБ (66-3-2024) от 21.10.2024	Ахмеджанова А.Т.
01.01.2025	№7	Раздел I Раздел II Раздел IV Раздел VIII	Котова Е.В. 	Дюшеналиева Ч.К. Бегалиева Г.А. Кадырбеков А.А. 	На совм. засед. ТК ЛАБ (67-4-2024) и ПК ТК ЛАБ, ТК ОК (№ 26- 3- 2024) от 23.12.2024г.	Ахмеджанова А.А.
С правом досрочного внедрения ООС						

Настоящий документ не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения КЦА.

РАЗДЕЛ I, предназначен для всех пользователей документа.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 1 из 161
-----------	---	---------------	------------	---------------

Содержание

1. Область применения	4
2. Обозначения и сокращения	4
3. Нормативные ссылки	4
4. Термины и определения	7
I. СВЯЗЬ МЕЖДУ ВАЛИДАЦИЕЙ / ВЕРИФИКАЦИЕЙ МЕТОДОВ ИСПЫТАНИЙ И ОБЛАСТЬЮ АККРЕДИТАЦИИ	10
I.I УСТАНОВЛЕННАЯ И ГИБКАЯ ОБЛАСТЬ АККРЕДИТАЦИИ	11
I.II МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ ИСПЫТАНИЙ	11
I.III ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДОВ	12
I.IV ВАЛИДАЦИЯ И ВЕРИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ	15
I.V РАЗРАБОТКА ПЛАНА ВАЛИДАЦИИ / ВЕРИФИКАЦИИ МЕТОДОВ	20
I.VI КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ	27
II. ВАЛИДАЦИЯ/ВЕРИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	29
II.I МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПЛУАТАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК (ВАЛИДАЦИЯ)	29
1. Предел обнаружения (LOD)	29
2. Повторяемость	36
3. Воспроизводимость	37
4. Линейность диапазона	37
5. Правильность. Степень извлечения. Матричные эффекты	47
6. Селективность/специфичность	49
7. Робастность	50
8. Стабильность	51
II.II ВЕРИФИКАЦИЯ РАНЕЕ ВАЛИДИРОВАННЫХ МЕТОДОВ	51
II.III КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ	56
9. Оценка неопределённости измерений	59
III. ВАЛИДАЦИЯ / ВЕРИФИКАЦИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ	59
III.I МЕТОДОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА	59
III.II ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПЛУАТАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК	60
III.III ВЕРИФИКАЦИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ	62
III.IV ОЦЕНКА ЭКСПЛУАТАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КАЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ, ВЫРАЖЕННЫХ ПО ПОРЯДКОВОЙ ШКАЛЕ	62
IV ВАЛИДАЦИЯ СУБЪЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ	63
VI.I ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ПАРАМЕТРЫ СУБЪЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ	63
VI.II АНАЛИЗ РИСКОВ И ПРЕДПРИНИМАЕМЫЕ МЕРЫ	68
V МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	71
V.I. ВЕРИФИКАЦИЯ РЕФЕРЕНТНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	72

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

V. II ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД	74
Верификация эксплуатационных характеристик питательных сред.....	78
V. III. ВЕРИФИКАЦИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ РЕФЕРЕНТНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	83
V. IV. ВЕРИФИКАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ РЕФЕРЕНТНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	84
V. V. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ.....	100
V. VI ВЕРИФИКАЦИЯ КОММЕРЧЕСКИ ДОСТУПНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ	102
V. VII ВАЛИДАЦИЯ РАСШИРЕНИЯ ПИЩЕВОЙ МАТРИЦЫ/ БИОМАТЕРИАЛА ТЕСТ- СИСТЕМЫ	102
VI ОСОБЫЕ АСПЕКТЫ ВАЛИДАЦИИ/ ВЕРИФИКАЦИИ НЕКОТОРЫХ ГРУПП МЕТОДОВ .	103
VI. I МЕТОДЫ КАЛИБРОВКИ	103
VI. II МЕТОДЫ ФИЗИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ	104
КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ.....	104
КАЧЕСТВЕННЫЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ	106
VI. III СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	106
VI. IV МЕТОД ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ	107
VI. V ВЕРИФИКАЦИЯ МЕДИЦИНСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ	120
VI. VII РЕФЕРЕНТНЫЙ МАТЕРИАЛ / РЕФЕРЕНТНАЯ ПАНЕЛЬ	129
VII ВЕРИФИКАЦИЯ РЕФЕРЕНТНЫХ ИНТЕРВАЛОВ	133
VIII ВАЛИДАЦИЯ ОТБОРА ПРОБ.....	143
IX ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ВАЛИДАЦИИ / ВЕРИФИКАЦИИ МЕТОДОВ	148
IX. I РАСЧЕТ ПРЕДЕЛА ПРИНЯТИЯ РЕШЕНИЯ	148
IX. II ЦЕЛЕВАЯ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ	149
X ОСОБЕННОСТИ ПОДХОДА ПЛАНИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА ВЕРИФИКАЦИИ МЕТОДОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДО ВВЕДЕНИЯ ТРЕБОВАНИЙ ISO/IEC17025:2017	149
Приложение А Рекомендуемая форма плана валидации/верификации методов.....	150
Приложение Б Пример плана верификации для определения следовых количеств веществ.....	151
Приложение В Рекомендуемый отчёт о валидации/верификации метода (пример)	153
Приложение Г Статистический план эксперимента по валидации /верификации метода [14]..	154
Приложение Д Рекомендуемое содержание изложения стандартной операционной процедуры на методы.....	154
Приложение Е Сертификат стандартного образца штамма микроорганизма	156
Приложение Ж Представление результатов проверки квалификации для количественных микробиологических методов.....	159
Приложение И Пример представления информации о верификации методов медицинских исследований	160

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

1. Область применения

Настоящее руководство предназначено для испытательных, калибровочных лабораторий, а также медицинских лабораторий, применяющих количественные, качественные и субъективные методы испытаний (исследований) и методы отбора проб.

Настоящее руководство может быть применимо другими органами по оценке соответствия, включая органы контроля.

Руководство сконструировано таким образом, что первый раздел является общим для всех областей деятельности, и устанавливает общие подходы для валидации и верификации методов. Остальные разделы предназначены для конкретных видов методов.

Настоящее руководство является документом рекомендательного характера и является своего рода справочником по в части подходов к валидации в различных областях испытаний. Тем не менее, “золотого стандарта” валидации и верификации не существует, и органы оценки соответствия могут применять и другие, не установленные в настоящем руководстве подходы при условии их соответствующего обоснования.

2. Обозначения и сокращения

В настоящей процедуре использованы следующие сокращенные обозначения:

КЦА – Кыргызский центр аккредитации;

ЕС – Европейский Союз;

ЕАЭС – Евро Азиатский экономический союз;

ПДК – предельно допустимая концентрация;

НД – нормативный документ;

ТР ЕАЭС – технический регламент Евро-Азиатского Экономического союза;

ООС – орган оценки соответствия;

CRM – сертифицированный стандартный образец;

RM – стандартный образец.

3. Нормативные ссылки

- Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods/NATA/ Technical Note 17 — June 2012
- Horwitz Trumpet) W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, J. Assoc. Off. Chem., 63, 1344 (1980)
- ГОСТ Р ЕН 13804-2010. Продукты пищевые. Определение следовых элементов. Критерии эффективности методик выполнения измерений, общие положения и способы подготовки проб
- DS/EN 13804, 2013-04-11, Determination of elements and their chemical species – General considerations and specific requirements
- РЕГЛАМЕНТКОМИССИИ(ЕС) № 333/2007 от 28 марта 2007 г., устанавливающий методы отбора образцов и анализа в целях государственного контроля уровней свинца, кадмия, ртути, неорганического олова, 3-МСПД и бензопирена в пищевых продуктах.
- РЕГЛАМЕНТ КОМИССИИ (ЕС) № 1881/2006 от 19 декабря 2006 года, устанавливающий максимальные уровни некоторых контаминантов в пищевых продуктах
- ГОСТ ISO/IEC 17043-2013 Оценка соответствия. Основные требования к проведению проверки квалификации.
- ГОСТ ИСО 5725-1 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Основные положения и определения.
- ГОСТ ИСО 5725-2 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 4 из 161
-----------	---	---------------	------------	---------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

10. Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials/Stefanka Bratinova, Barbara Raffael, Catherine Simoneau/EUR 24105 EN - 1st edition 2009
11. ОФС проект Валидация микробиологических методик/
12. ISO/IEC Guide 99 Международный словарь по метрологии. Основные и общие понятия и соответствующие термины (VIM3)
13. Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics Second edition, 2014/ Пригодность аналитических методов для конкретного применения Руководство для лабораторий по валидации методов и смежным вопросам Под редакцией Б. Магнуссона и У. Эрнемарка Киев – 2016 Издано ООО "Юрка Любченка"
14. Eurachem Guide Planning and Reporting Method Validation Studies Supplement to Eurachem Guide on the Fitness for Purpose of Analytical Methods First edition 2019
15. EA 4/16 - EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing, 2003
16. ГОСТ ISO 16140-2011 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов.
17. Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis. FEM Document Number 2009-01 October 7, 2009, REVISION: December 21, 2016.
18. ГОСТ Р 54502-2011/ISO/TS 19036:2006 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководство по оценке неопределенности измерений при количественных определениях.
19. ГОСТ ISO 22118-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения и количественного учета патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Технические характеристики.
20. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. / О микробиологических показателях для пищевых продуктов.
21. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds. Edition 3.0. U.S. Food and Drug Administration Foods Program. October 2019. <https://www.fda.gov/media/83812>
22. ГОСТР 53022.2-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность)
23. CLSI EP15-A3: User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline - Third Edition, 2017
24. Клименкова О.А., Турковский Г., Проведение верификационных экспериментов на практике согласно протоколу CLSI EP15-A3.
25. ГОСТ ISO 13299-2015 Органолептический анализ. Методология. Общее руководство по составлению органолептического профиля.
26. ISO 17468:2016 Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Технические требования и руководство по установлению и пересмотру стандартных референтных методов – **на русском языке отсутствует**)
27. ISO 16140-1:2016 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Валидация методов. Часть 1. Словарь- **на русском языке отсутствует**)
28. ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных - Валидация методов -

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 5 из 161
-----------	---	---------------	------------	---------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

Часть 2. Протокол для валидации альтернативных методов по сравнению с референтным методом - **на русском языке отсутствует)**

29. ISO/FDIS 16140-3:Underdevelopment. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. (В процессе пересмотра. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных - Валидация методов - Часть 3: Протокол для верификации референтных методов и валидации альтернативных методов в единичной лаборатории - **на русском языке отсутствует)**
30. ISO/FDIS 16140-4.2:2019 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных - Валидация методов - Часть 4.2: Протокол для валидации альтернативных (разработанных лабораторией) методов для микробиологического подтверждения и процедур типирования ISO/FDIS 16140-5 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных - Валидация методов - Часть 5.Протокол для факторной межлабораторной валидации для неутвержденных методов - **на русском языке отсутствует)**
31. ISO 16140-6:2019 Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных – Валидация методов - Часть 6. Протокол для валидации альтернативных (разработанных лабораторией) методов для микробиологического подтверждения и процедур типирования - **на русском языке отсутствует)**
32. ГОСТ ISO 11133-2016 Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред.
- 33.WADA Technical Document TD2014DL, Decisionlimits for the confirmatory Quantification of thresholdsubstances (Пределы принятия решения для подтверждающих документов количественного определение пороговых веществ), 17.05.2014
- 34.Report EUR 22756 EN Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories. S. Trapmann, M. Burns, H. Broll, R. Macarthur, R. Wood, J. Zel, European Communities, 2007
- 35.Eurachem / CITAC Guide. Measurement uncertainty arising from sampling A guide to methods and approaches Second Edition 2019. (Руководство Eurachem / CITAC Неопределенность измерения, связанная с отбором пробы. Руководство по методам и подходам. Второе издание. 2019 г)
36. Report EUR 22756 EN / Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories S. Trapmann, M. Burns, H. Broll, R. Macarthur, R. Wood, J. Zel/ European Communities, 2007
37. Приказ МЗ КР № 274 от 25.05.2010 Методические указания по хранению, приготовлению, проведению контроля качества и расчету норм расхода питательных сред в бактериологических лабораториях.
38. Eurachem/CITAC Guide Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement First edition 2015.
39. ГОСТ 8.010-2013 Государственная система обеспечения единства измерений (ГСИ). Методики выполнения измерений. Основные положения.
40. ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3 Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 6 из 161
-----------	---	---------------	------------	---------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

41. ГОСТ Р ИСО 21748 — 2012 Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределённости измерений.
42. Питательные среды для клинической бактериологии в странах с низким и средним уровнем дохода: проблемы, передовой опыт подготовки и рекомендации по улучшению доступа. Жанна Орекан и др. Журнал «Clinical Microbiology and Infection», 27 (2021) 1400-1408.
43. ГОСТ Р 54502-2011/ISO/TS 19036:2006 Выражение неопределенности измерений в отчетах по испытаниям.
44. Современные теория и практика референтных интервалов, Журнал: Лабораторная служба. 2019;8(2): 36-44.
45. G108 - Guidelines for Estimating Uncertainty for Microbiological Counting Methods, A2LA 07.23.19 (Руководство по оценке неопределенности измерений в микробиологических количественных методах, руководств американского органа аккредитации A2LA, 07.23.19)
46. Обеспечение и внутрилабораторный контроль качества в иммуоферментном анализе. Методическое руководство. НПО “Профилактическая медицина”, Бишкек, 2005 г. Кучук Т.Э. и др.
47. ГОСТ ISO 4833—2015 Микробиология пищевой продукции и кормов. Горизонтальный метод подсчета микроорганизмов. Методика подсчета колоний после инкубации при температуре 30 °C (ISO 4833:2003, ИОТ)
48. [Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing - Part 1 \(inserted / modified 20/04/2015\), document valid from 20/10/2015.](#)
Определение минимальных требований к аналитическим методам тестирования ГМО. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidance-documents>
49. [Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods - version 2 \(inserted / modified 13/02/2018\)](#)
Верификация аналитических методов тестирования на ГМО при внедрении межлабораторных валидированных методов <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidance-documents>
50. [Guidance document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories - 3rd Edition](#)
Руководящий документ по оценке неопределенности измерений для лабораторий испытывающих ГМО. Третье издание. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidance-documents>

4. Термины и определения

Метод испытания (Test Method) [1] - совокупность процедур и приемов для выполнения той или иной деятельности. Термин "метод испытания" применяется ко всем методам испытаний, включая субъективные методы и процедуры экспертизы, такие как проверка отпечатков пальцев и почерковедческая экспертиза.

Примечание разработчиков:

Ранее на территории стран СНГ для количественных методов более широко применяемым был термин «методика выполнения измерений» (МВИ): Установленная логическая последовательность операций и правил при измерении, выполнение которых обеспечивает получение результатов измерений в соответствии с принятым методом измерений» [39].

Данное определение, согласно области применения стандарта распространяется на методики выполнения измерений (МВИ), включая методики количественного химического анализа (МКХА) и количественные методики микробиологического анализа, и устанавливают общие положения и требования, относящиеся к разработке, стандартизации, методик выполнения измерений и метрологическому надзору (контролю) за ними и не распространяется на методики, предназначенные для выполнения измерений методом непосредственной оценки, т.е. методики, в соответствии с которыми искомое значение величины получают

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 7 из 161
-----------	---	---------------	------------	---------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

непосредственно от средства измерений. Однако, в настоящее время, несмотря на наличие данного стандарта, наиболее употребительным является термин «метод испытания».

Качественный метод (Qualitative Method) [16] - Метод анализа, результатом которого является установление наличия или отсутствия аналита*, обнаруживаемого прямо или косвенно в определенном количестве образца.

Количественный метод (Quantitative Method) [16] - метод анализа, результатом которого является количество аналита, измеренное прямо (подсчет по массе или объему) или косвенно (поглощение цвета, импеданс и т.д.) в определенном количестве образца.

Количественные результаты испытаний (Qualitative test results)[1] - результаты испытаний, полученные численно.

Качественные результаты испытаний (Quantitative test results) [2] - результаты испытаний, которые не были получены численно (например, визуальные исследования или бинарные классификационные тесты, такие как отсутствие / присутствие, положительный / отрицательный, реактивный / неактивный и т. д.).

Измеряемая величина (Measurand)[12] – величина, подлежащая измерению.

Аналит (Analyte)- компонент образца или испытываемый объект, который воплощает в себе количество или качество, которое в конечном счете определяется прямо или косвенно, т.е. определяемый показатель.

Матрица (Matrix) - преобладающий материал, компонент или субстрат, который содержит интересующий аналит.

Матричные эффекты (Matrix Effects) - прямое или косвенное изменение или наложение в отклике измерительной системы из-за присутствия непреднамеренных аналитов (для анализа) или других мешающих веществ в пробе.

Холостая проба, бланк, чистая матрица (Blank) [13] (от слова «бланк» - пустой, незаполненный) – значение, которое получается в результате анализа образца, который, насколько это возможно, не содержит рассматриваемого аналита (ов).

Использование различных типов бланков (к которым не были добавлены анализируемые вещества) позволяет оценить, какая часть измеренного отклика прибора связана с анализируемым веществом, а какая-с другими причинами.

В практике используют различные типы бланков:

- **бланки реагентов (Samples blanks) [13]** - реагенты, используемые во время аналитического процесса (включая растворители, используемые для экстракции или растворения), анализируются изолированно, чтобы увидеть, вносят ли они вклад в измерительный сигнал. Результат измерения, вытекающий из анализируемого вещества, может быть скорректирован соответствующим образом.

- **бланки образцов (Reagent blanks) [13]** - это, по существу, матрицы без аналита. Их может быть трудно получить, но такие материалы дают наилучшую оценку эффектов помех, которые могли бы возникнуть при анализе испытываемых образцов.

Затравленный образец, контаминированный образец (spiked material) [13] - искусственно загрязненный образец (спайк, спайкированный образец), к которому была добавлена известная концентрация аналита. Используется для проверки смещения (степени извлечения) аналитического метода.

Точность (accuracy) [8] - степень близости результата измерений к принятому опорному значению.

Правильность (trueness) [8]-степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений (или результатов испытаний), к принятому опорному значению.

Смещение (bias) [8] -оценка систематической погрешности измерения.

Прецизионность (precision) [8] - степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях.

Повторяемость (repeatability) [8] - прецизионность в условиях повторяемости

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 8 из 161
-----------	---	---------------	------------	---------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

Условия повторяемости (сходимости) (repeatability conditions) [8] - условия, при которых независимые результаты измерений (или испытаний) получаются одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени.

Воспроизводимость (reproducibility) [8]- Прецизионность в условиях воспроизводимости.

Условия воспроизводимости (reproducibility conditions) [8] - Условия, при которых результаты измерений (или испытаний) получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования.

Промежуточная прецизионность (Intermediate Precision) [8] - прецизионность измерения в условиях промежуточной прецизионности.

Условия промежуточной прецизионности (Intermediate Precision Condition) [8]- условие измерений из набора условий, который включает в себя одну и ту же процедуру измерения, одно и то же местоположение и повторные измерения на одних и тех же или похожих объектах в течение длительного периода времени (но могут включать и другие изменяемые условия).

Внутрилабораторная воспроизводимость = промежуточная прецизионность (Intra-laboratory reproducibility, within-laboratory reproducibility или intermediate precision) - это термины, используемые для описания точности, относящейся к условиям воспроизводимости, ограниченными одним участком проведения испытаний.

Неопределенность измерения (Measurement Uncertainty)[12]- неотрицательный параметр, характеризующий дисперсию количественных значений, приписываемых измеряемой величине, на основе использованной информации.

Целевая неопределенность измерений (Target Measurement Uncertainty) - неопределенность измерений, указанная в качестве верхнего предела и определяемая на основе предполагаемого использования результатов измерений [12]. Представляет собой наибольшую допустимую неопределенность для конкретного использования этого результата.

Калибровка (Calibration) [12] - операция, которая при определенных условиях на первом этапе устанавливает связь между величинами величин с неопределенностями измерений, предусмотренными стандартами измерений, и соответствующими показаниями с соответствующими неопределенностями измерений, а на втором этапе использует эту информацию для установления связи для получения результата измерения из индикации. Калибровка может быть выражена выражением, функцией калибровки, диаграммой калибровки, калибровочной кривой или калибровочной таблицей.

Калибровку не следует путать ни с регулировкой измерительной системы (юстировка, настройка), часто ошибочно называемой "самокалибровкой", ни с проверкой калибровки (промежуточные проверки оборудования).

Интервал измерения, рабочий интервал [12] - набор значений величин одного вида, которые могут быть измерены данным измерительным прибором или измерительной системой с заданной инструментальной неопределенностью в определенных условиях.

Примечание: **нижний предел интервала измерения** не следует путать с пределом обнаружения.

Сертифицированный стандартный образец (Certified Reference Material CRM) [12] - материал, сопровождаемый документацией, выданной уполномоченным органом и предоставляющий одну или несколько указанных значений свойств с соответствующими неопределенностями и прослеживаемостью, с использованием действительных процедур.

Пригодность для назначения (Fitness for Purpose) [14] - степень, в которой данные, полученные в процессе измерения, позволяют пользователю принимать технически и административно правильные решения для заявленной цели.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 9 из 161
-----------	---	---------------	------------	---------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Валидация (Validation) - подтверждение путем экспертизы и предоставления объективных доказательств того, что конкретные требования для конкретного предполагаемого использования выполнены.

Верификация (Verification) - подтверждение путем экспертизы и предоставления объективных доказательств того, что указанные требования выполнены.

Критерий приемлемости (Acceptance criteria) – заданное значение или ожидаемый результат определения эксплуатационного параметра, которое используют для оценки адекватности методики путем сравнения с полученными экспериментальными данными.

Органолептический профиль (Sensory profile) [25] - Описание органолептических свойств образца, включающее органолептические характеристики в порядке их восприятия с указанием значения интенсивности для каждой характеристики.

Отбор пробы (Sampling) [35] - процесс извлечения или составления пробы.

Метод бинарной классификации (Binary Classification Test) [1] - это задача классификации членов данного набора объектов на две группы на основании того, обладают ли они каким - либо свойством или нет (например, применительно к медицинскому тестированию бинарный классификационный тест используется для определения наличия у пациента определенного заболевания или нет-классификационным свойством является заболевание). Может также упоминаться как тест присутствия/отсутствия, или положительный / отрицательный тест.

Прогностичесность положительных и отрицательных результатов (Positive and Negative Predictive Values) [1] Термины «прогностичесность положительных и отрицательных результатов» часто применяются к диагностическим двоичным классификационным тестам и относятся к степени точности. **Прогностичесность положительных результатов** (отношение истинных положительных результатов к совокупным истинным и ложным положительным результатам) - это доля пациентов с положительными результатами теста, которым правильно поставили диагноз. Это самая важная мера диагностического метода, поскольку она отражает вероятность того, что положительный тест отражает основное состояние, которое испытывается.

Прогностичесность отрицательных результатов - это доля пациентов с отрицательными результатами теста, которым правильно поставили диагноз (соотношение истинных отрицательных значений к совокупным истинным и ложным отрицательным).

Истинно отрицательные (True Negative) - отрицательный результат теста бинарной классификации, когда истинный результат отрицателен.

Истинно положительные (True Positive) - положительный результат теста бинарной классификации, когда истинный результат является положительным.

Ложно негативные (False Negatives) - отрицательный результат теста бинарной классификации, когда истинный результат положителен.

Ложные позитивные (False Positives) положительный результат теста бинарной классификации, когда истинный результат отрицателен.

Золотой стандарт (Goldstandard) [1] - термин, часто применяемый в медицинской и ветеринарной областях тестирования. Относится к диагностическому методу тестирования или эталону, который считается окончательным.

Целевая неопределенность измерений [12] - неопределенность измерений, заранее установленная как верхний предел и принятая исходя из предполагаемого использования результатов измерений.

I. СВЯЗЬ МЕЖДУ ВАЛИДАЦИЕЙ / ВЕРИФИКАЦИЕЙ МЕТОДОВ ИСПЫТАНИЙ И ОБЛАСТЬЮ АККРЕДИТАЦИИ

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 10 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

I.1 УСТАНОВЛЕННАЯ И ГИБКАЯ ОБЛАСТЬ АККРЕДИТАЦИИ

Для лабораторий область аккредитации может быть установленной и гибкой (виды гибкости установлены в Политике КЦА-ПЛ-12 ООС).

Установленная область аккредитации означает, что комплекс **аналит /матрица/метод/диапазон (определяемый показатель/категория объектов/конкретный НД на метод испытаний/установленный диапазон измерений)** – **определен и не может быть расширен/изменен ООС самостоятельно без предварительной заявки и оценки со стороны КЦА.**

Гибкая область аккредитации означает, что комплекс **аналит /матрица/метод/диапазон (определяемый показатель/категория объектов/конкретный НД на метод испытаний/установленный диапазон измерений)** – **может быть расширен/изменен ООС самостоятельно без предварительной заявки и оценки со стороны КЦА.**

В контексте валидации/верификации методов испытаний это означает, что метод испытаний согласно конкретному НД, применяемый для определения конкретного аналита (определяемого показателя) в типовой матрице (группе однородной продукции/объектов) в определенном диапазоне должен быть валидирован/верифицирован перед применением, независимо от того сформулирована область аккредитации в качестве установленной или гибкой.

Ссылка на аккредитацию не может быть использована для невалидированных/неверифицированных методов. Если на момент выдачи результатов испытаний метод не является валидированным/верифицированным, результаты испытаний могут быть выданы без ссылки на аккредитацию (см. КЦА-ПА 6 ООС, [КЦА-ПЛ 14](#)).

Нужно понимать, что при принципиальной возможности валидировать/верифицировать все, находящиеся в области аккредитации методы испытаний, для конкретного ООС может оказаться нецелесообразным, например вследствие отсутствия заказчиков, валидировать/верифицировать все возможные варианты матриц.

I.2 МЕТОДЫ И МЕТОДИКИ ИСПЫТАНИЙ

С помощью методов испытаний устанавливается величина (содержание) интересующего компонента или свойства в каком-либо материале (типе образца, объекте, категории пищевого продукта).

Метод испытания - совокупность процедур и приемов для выполнения той или иной деятельности. Термин "метод испытания" применяются ко всем методам испытаний, включая субъективные методы и процедуры экспертизы, такие как проверка отпечатков пальцев и почерковедческая экспертиза.

Методы испытаний могут быть количественными, качественными, субъективными. Методы испытаний как правило оформляют в виде организационно-методических документов и опубликовывают в виде **методики испытаний**.

ПРИМЕР: ГОСТ 31954-2012 Вода питьевая. Методы определения жесткости – описывает **две методики испытаний**. В то время как в основу этих методик положены определённые физические и химические принципы – методы испытаний: **титриметрический метод** определения жесткости и **атомно-абсорбционный метод** определения жесткости.

Методика (процедура) испытаний (исследований) - организационно-методический документ, обязательный к выполнению, включающий метод испытаний (исследований), средства и условия испытаний, отбор проб, алгоритмы выполнения операций по определению одной или нескольких взаимосвязанных характеристик свойств объекта и форму представления результатов.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 11 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Однако, методики испытаний могут быть **стандартизованными (стандартными) или нестандартизованными (нестандартными)**.

Стандартизованная методика (процедура) - обобщенное наименование совокупности методик (процедур) испытаний (исследований) в виде ГОСТ, МВИ, МУ, МУК, МИ, представляющих собой организационно-методические документы, предназначенные для использования лабораторией с целью получения результатов испытаний (исследований), и содержащая **установленные эксплуатационные характеристики**.

Нестандартизованная методика (процедура) - обобщенное наименование совокупности методик (процедур) испытаний (исследований) в виде ГОСТ, МВИ, МУ, МУК, МИ, представляющих собой организационно-методические документы, предназначенные для использования лабораторией с целью получения результатов испытаний (исследований), и **не содержащая установленных эксплуатационных характеристик для целевого назначения испытательной лаборатории**.

Для применения ООС любые методы испытаний (как стандартные, так и нестандартные) должны иметь показатели надежности – эксплуатационные характеристики.

В том случае, если методика испытаний содержит эксплуатационные характеристики – ООС требуется подтвердить возможность работать в рамках этих установленных характеристик – верификация.

Если же ООС применяет методику испытаний, которая **не содержит** установленных эксплуатационных характеристик – ООС требуется самостоятельно установить эти характеристики и подтвердить, что они достаточны для поставленных ООС целей – валидация.

I.Ш ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДОВ

Эксплуатационные характеристики – это характеристики метода, определяемые в ходе экспериментального исследования и позволяющие оценить его адекватность.

Эксплуатационные характеристики в англоязычной литературе называют **performance characteristic**. В русскоязычной литературе могут применяться различные названия:

- эксплуатационные характеристики,
- характеристики (параметры) функционирования метода,
- рабочие характеристики,
- валидационные характеристики,
- критерии эффективности.

Ниже перечислены все виды эксплуатационных характеристик методов испытаний. Применимость конкретных эксплуатационных характеристик для видов методов испытаний обсуждается в следующих разделах.

1. Предел обнаружения (Limit of Detection, LOD) – измеренная концентрация аналита, полученная с помощью заданной процедуры измерения, с вероятностью определения аналита X.

LOD₅₀ предел обнаружения, который дает 50 % положительных результатов (как правило применяется в микробиологии).

LOD₉₅ предел обнаружения, который дает 95 % положительных результатов (как правило применяется для химических методов испытаний).

Вместо термина **предел обнаружения** также употребляют понятие **чувствительность метода/тест-системы**.

Чувствительность - наименьшее количество вещества или организма, которое может быть обнаружено с помощью метода или тест-системы [21].

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

Предел количественного определения (Limit of Quantitation, Limit of Determination - LOQ), LOQ применим только для количественных методов. Предел количественного определения - относится к наименьшей концентрации или массе аналита, которые могут быть количественно проанализированы с достаточной достоверностью с помощью данной процедуры.

2. **Повторяемость (сходимость) (применима только к количественным методам) см.** определение выше – близость друг к другу результатов испытаний **полученных в течении одного дня** одним и тем же оператором, с использованием одной и той же измерительной системы.
3. **Воспроизводимость, (применима только к количественным методам) см.** определение выше - близость друг к другу результатов испытаний полученных **в разные дни, разными операторами, с различными реактивами**, с использованием одной и той же измерительной системы.

Внутри одной лаборатории может быть получена только **внутрилабораторная воспроизводимость**, поэтому если метод включает характеристики воспроизводимости (т.е межлабораторная характеристика воспроизводимости), то внутрилабораторная должна быть заведомо меньше. В то же время, для повторных измерений характеристики повторяемости фактически отражают и внутрилабораторную воспроизводимость.

4. **Диапазон линейности (Linearity range) (Применим только для количественных методов)** – диапазон измерений в пределах которого, зависимость концентрации от измеряемого сигнала измерительной системы определяется линейной функцией $y=b_0+b_1x$.

Линейность диапазона применима только для методов испытаний, выполняемых с применением градуировочной зависимости (интегральные методы измерений):

- измерения массы по показаниям весов (калибровка весов);
- в фотометрии, УФ-фотометрии, ААС, АЭС - метод градуировочного графика;
- градуировка хроматографа в определенном диапазоне для анализа смесей переменного состава (например, метод В ГОСТ 31371.7-2021).

Если определяются предварительно известные показатели на основе данных одного стандарта (дифференциальные измерения), градуировка приборов не проводится и фактор линейности градуировки исключается.

К таким измерениям например относятся:

- определение погрешности большинства средств измерений сраненем показаний между эталоном и испытуемом средством измерения в одной точке (например, калибровка гирь метод АВВА, АВА);
- в фотометрии, УФ-фотометрии, ААС, АЭС – метод одного стандарта;
- в хроматографии метод абсолютной градуировки в одной точке (например, метод А ГОСТ 31371.7-2021).

5. **Степень извлечения (восстановление) (Recovery) (применима только для количественных методов)** - эффективность извлечения аналитического процесса, выраженная как (процент от) известного количества аналита, переносимого через этапы отбора и обработки образца способа (R%).

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 13 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

$$R = \frac{c_1 - c_2}{c_3} * 100\%$$

Где: c_1 = измеренная концентрация в образце с добавкой;
 c_2 = измеренная концентрация в необогащенном образце;
 c_3 = концентрация добавки;

Смещение (см. определение выше) – величина обратная степени извлечения:

$$\text{Bias}\% = 100\% - R\%$$

Правильность – правильность определяется путем участия в программах проверки квалификации или в межлабораторных сличениях (см. КЦА-ПА 14 ООС).

- 6. Селективность, селективность измерительной системы (Selectivity, Selectivity of a Measuring System)** - свойство измерительной системы, используемой с определенной процедурой измерения, при которой она обеспечивает значения измеряемых величин для одного или нескольких измеряемых параметров таким образом, что значения каждого измеряемого параметра не зависят от других измеряемых параметров или других величин в исследуемом явлении, теле или веществе.

Для качественных и микробиологических методов испытаний селективность подразделяется на чувствительность и специфичность.

Чувствительность (аналитическая, диагностическая) метода/теста отражает вероятность его положительного результата в присутствии аналита. Высокая чувствительность теста позволяет с его помощью выявлять больных в общей популяции.

Специфичность метода/теста (аналитическая, диагностическая) отражает вероятность отрицательного результата в отсутствие аналита. При высокой специфичности легче отсеивать здоровых из популяции с предполагаемой патологией.

Диагностическая эффективность метода/теста - доля истинных результатов среди всех результатов теста

- 7. Устойчивость / робастность (Ruggedness/Robustness)** - степень независимости анализа от различных влияющих факторов.
- 8. Стабильность (Stability)** - (химическая) стабильность аналита в данной матрице при определенных условиях для заданных интервалов времени.
- 9. Неопределенность измерений (Uncertainty of measurement) (применима только для количественных методов)**- параметр, относящийся к результату измерения и характеризующий разброс значений, которые могли бы быть обоснованно приписаны измеряемой величине. Неопределённость измерений является обобщающим параметром всех вышеперечисленных эксплуатационных характеристик и отражает фактическую точность результата измерений. Неопределенность измерений, как правило, представляют в форме расширенной неопределенности с коэффициентом охвата $k=2$, что соответствует доверительной вероятности 95%.
Неопределенность измерений не может быть рассчитана для результатов качественных методов испытаний.
- 10. Неопределённость отбора пробы**

Если объект испытаний является неоднородным, то содержание аналита или свойства объекта могут отличаться в пределах объекта. Результаты анализа образца не будут отражать фактически результаты содержания аналита или свойства для объекта в целом.

Поэтому при распространении результатов испытаний образца неоднородного объекта на весь объект или группу объектов, возникает неопределенность, связанная с отбором пробы.



а)



б)

Рис.1 Иллюстрация возникновения неопределённости отбора пробы.

а) неоднородность исходного объекта, б) неоднородность измельченного объекта.

Ситуация учета неопределённости отбора проб возникает, в случаях распространении результатов испытаний:

- испытанного образца от крупного объекта на весь этот неоднородный объект (лист шифера, стекла);
- отобранных образцов на партию изготовленной продукции (для производственных лабораторий).

Измерение смещения и сходимости/воспроизводимости и соответственно неопределенности измерений являются минимальными требованиями к методам, которые дают количественные результаты.

I.IV ВАЛИДАЦИЯ И ВЕРИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ

Валидация метода – это процесс установления эксплуатационных характеристик и ограничений метода в зависимости от его назначения, а также выявления влияний, которые могут изменить эти характеристики и в какой степени. Другими словами, валидация методики – это процедура получения совокупности данных, показывающих (в форме эксплуатационных характеристик), что методика по обеспечиваемой ею точности и прецизионности результатов приемлема для анализа конкретных аналитов и типов проб с целью получения определённых выводов о содержании аналитов или свойствах объекта и /или оценки его соответствии определенным критериям.

Вопросы, которые решаются с помощью валидации: какие аналиты могут быть определены, в каких матрицах присутствуют какие помехи, в каких условиях могут быть достигнуты определённые уровни точности?

Всегда требуется валидация методов:

- разработанных собственными силами,
- стандартных методов, которые были изменены таким образом, что это может повлиять на конечный результат,
- стандартных методов, используемых за пределами целевой области использования,
- использующих альтернативный принцип выделения или обнаружения,
- экспресс-методов.

Нестандартные и разработанные собственными силами методы требуют валидации, так как такие методы не были исследованы ранее и требуется доказать, что они подходят для предполагаемого назначения.

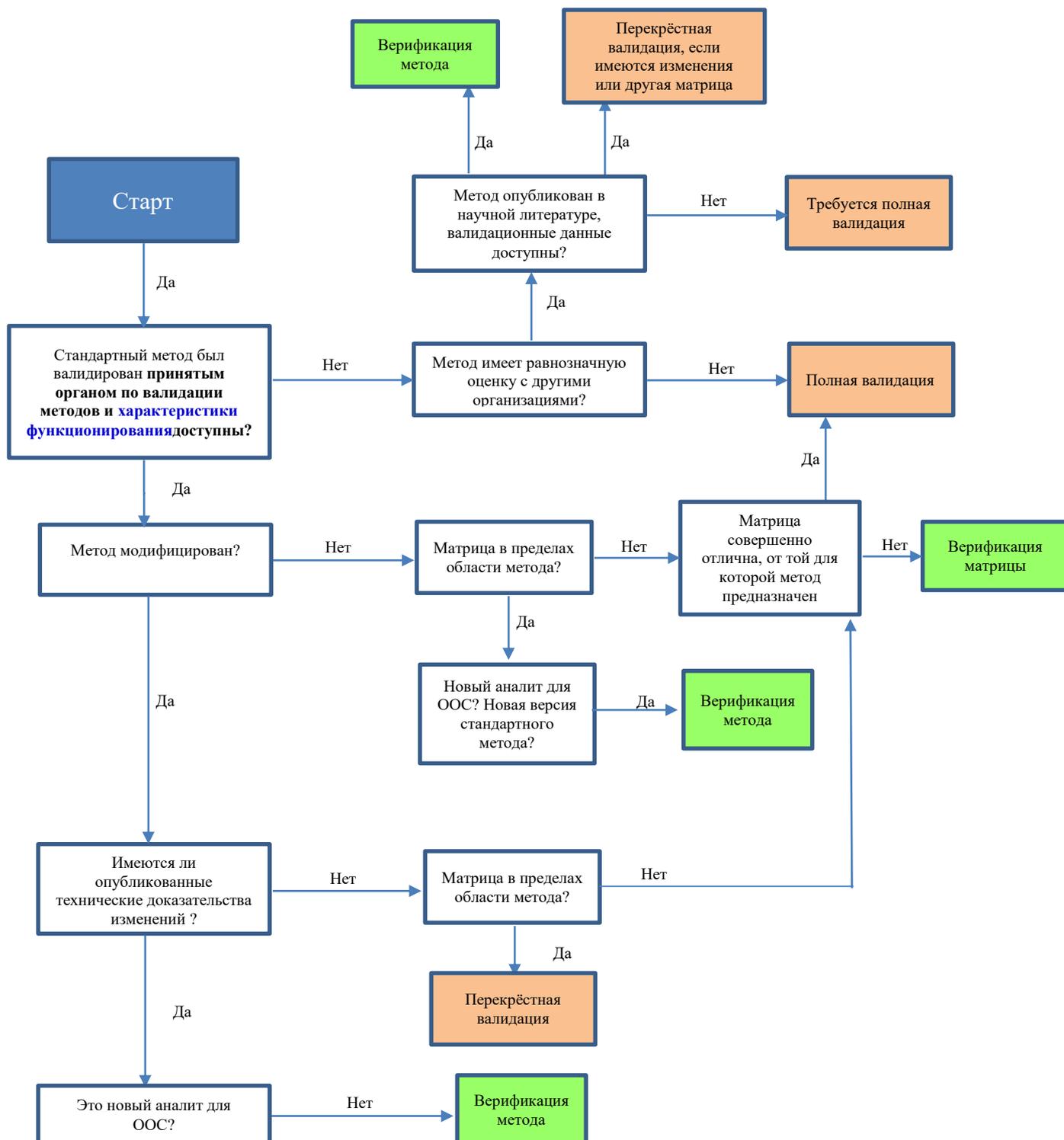


Рис.2 Схема принятия решений

Полная валидация также требуется, если у ООС есть **основания для существенного изменения стандартного метода**. Невозможно определить, что представляет собой существенное изменение. Существенным является изменение, которое может серьезно отразиться на результатах испытаний.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Некоторые примеры: использование другого экстракционного растворителя; использование ВЭЖХ вместо ГХА; различия в приготовлении накопительной / дифференциальной питательной среды (например, добавление альтернативного антибиотика); различная концентрация антибиотика в указанной базовой среде; изменение критической температуры или времени инкубации (например, 3 дня вместо 5 дней инкубации); или другая процедура подтверждения (например, использование альтернативного набора биохимических тестов, отличных от указанных).

Дополнительная валидация также должна быть рассмотрена, если заказчик требует более строгих спецификаций, чем те, для которых был валидирован стандартный метод.

Требуется валидация экспресс-методов, так как они зачастую основаны на других физико-химических принципах, нежели референтные методы.

Вариация матрицы во многих областях является одним из наиболее важных, но наименее признанных источников ошибок в аналитических измерениях.

Если ООС использует коммерческий испытательный комплект, в котором методология и реагенты не отличаются от инструкций изготовителя, то этот комплект не нуждается в независимой повторной валидации в ООС. В этом случае проводится верификация.

На рис.2 представлена схема принятия решений, для дополнительных разъяснений относительно того, когда следует проводить валидацию или верификацию метода.

Примеры применения «Схемы принятия решений» при внесении изменений в стандартный или нестандартный, но ранее валидированный лабораторией метод приведены ниже (химические, микробиологические, ПЦР – методы).

Изменение метода	Эксплуатационные параметры, подлежащие переоценке
Метод извлечения	Специфичность и степень извлечения
Матрица образца или включение аналитов	Диапазон измерений Специфичность Предел обнаружения (LOD); предел количественного определения (LOQ) если определяются концентрации аналитов ниже 0,5 ПДК (целевого содержания)
Расширение диапазона	Линейность
Изменения в условиях измерений Например: температура образца, время перемешивания, условия окружающей среды	Стабильность в рамках заявленного диапазона измерений
Система обнаружения (детектирования)	Специфичность Линейность Предел обнаружения (LOD) Предел количественного определения (LOQ) Прецизионность Степень извлечения Неопределенность
Изменение оборудования, реактивов или средств выращивания моделей, или средств	Специфичность Линейность Предел обнаружения (LOD) Предел количественного определения (LOQ) Прецизионность Степень извлечения Неопределенность

Валидационные исследования можно разделить на **сравнительную и первичную валидации.**

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ВАЛИДАЦИЯ

Перекры́стная (т. е. корреляционная или перекры́стная) валидация (**cross validation**) обычно применяется к методам для определения одной измеряемой величины и направлена на демонстрацию эквивалентной производительности между двумя (или более) методами, используемыми для получения данных в рамках одного исследования или между различными исследованиями путем сравнения эксплуатационных характеристик двух методов. Примером сравнительной валидации может служить ситуация, когда исходный валидированный метод служит референтным методом, а пересмотренный метод является сравниваемым.

Перекры́стная валидация может также применяться к физико-механическим, количественным химическим, биоаналитическим, качественным методам.

Не существует единого критерия установления эквивалентности метода или численных критериев приемлемости для него. Как правило, метод с наибольшей чувствительностью или самой высокой степенью извлечения для целевого аналита является лучшим. Для определения того, что статистически среднее значение альтернативного метода не отличается от среднего значения референтного метода, проводится односторонний дисперсионный анализ или парный t-тест (тест Стьюдента) по типу образца и концентрации аналита, как вариант может применяться En-критерий.

Перекры́стные валидационные исследования качественных методов включают идентификацию эксплуатационных характеристик метода (напр. чувствительность, селективность, предполагаемый ложный позитив и предполагаемый ложный негатив).

Валидационные исследования могут быть подкреплены внешней информацией, такими как результатами участия в программах проверки квалификации.

Если анализ проб в рамках одного метода проводится более чем на одном участке ООС, то следует проводить перекры́стную валидацию с использованием затравленной матрицы и контрольных образцов на каждом участке ООС, чтобы установить межлабораторную надежность. Перекры́стная валидация должна также учитываться при использовании данных, полученных с помощью различных аналитических техник (методов) (например, LC-MS-MS, VS, ИФА) или при модификации метода пробоподготовки.

Перекры́стная валидация всегда менее масштабное исследование, чем первичная валидация.

ПЕРВИЧНАЯ ВАЛИДАЦИЯ

В тех случаях, когда сравнительная валидация неприменима, до внедрения методов должна проводиться **первичная валидация (primary validation)**.

В таких случаях, валидация становится исследовательским процессом с целью установления эксплуатационных пределов и эксплуатационных характеристик альтернативного, нового или иным образом неадекватно охарактеризованного метода. Это должно привести к численным и / или описательным спецификациям для выполнения метода. Описательные спецификации часто применимы для субъективных методов.

Первичная валидация может быть проведена путем межлабораторного эксперимента (подходы описаны в серии стандартов ГОСТ ИСО 5725-2002 в 6 частях) или путем валидации в одной лаборатории (ГОСТ Р ИСО 21748 — 2012, Отчет NORDTEST 537, Программа MUKIT). Предпочтение следует отдавать методам межлабораторного эксперимента, так как они обеспечивают большую достоверность и меньший объем исследований для каждого отдельно взятого ООС.

ВЕРИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 18 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

Верификация метода испытаний - это предоставление объективных доказательств, того, что **установленные для метода испытаний эксплуатационные характеристики** подтверждаются ООС. Верификация по сравнению с валидацией является самым простым и наименее масштабным исследованием и проводится внутри одного ООС, не требует межлабораторного эксперимента (хотя может подкрепляться данными межлабораторных сравнительных испытаний) и большого количества временных и финансовых затрат.

Верификацию иногда называют вторичной валидацией, хотя на взгляд авторов данного руководства это неверно.

Стандартизованные методики испытаний являются **валидованными только в рамках объектов, заявленных в области применения метода и в пределах установленного в них диапазона измерений.**

Методики испытаний, применяемые **к объектам, которые отличаются по составу и/или свойствам от указанных в области их применения, или за пределами указанного диапазона измерений, не являются стандартизованными в отношении этих объектов или диапазонов.**

Из этого следует очень важный вывод: если ООС применяет методику испытаний в рамках заявленной в ней области применения – то в этой части методика верифицируется. Если, ООС применяет методику испытаний для объектов, которые не входят в область применения – методика фактически валидируется – т.е для данного объекта устанавливаются, а не подтверждаются эксплуатационные характеристики. Если ООС применяет методику испытаний для объекта заявленного в области применения метода, но за пределами диапазона применения – то в этой части диапазона также фактически будет осуществляться валидация, а не верификация метода.

ПРИМЕР 1: ООС использует комплексонометрический метод определения жесткости воды по ГОСТ 31954-2012 Вода питьевая. Методы определения жесткости, который валидирован и имеет установленные эксплуатационные характеристики от 0,1 °Ж. Если эта методика применяется для питьевой воды, с жесткостью от 0,1 до 10 °Ж – она верифицируется. Если этот же метод применяется для определения жесткости умягченной воды с технологической характеристикой не более 0,02 °Ж – то в этой области установленные эксплуатационные характеристики метода отсутствуют и требуется его валидация.



Рис.3 Схема диапазона применения метода определения жесткости воды комплексонометрическим методом.

ПРИМЕР 2: определение сульфатов титриметрическим методом с хлоридом бария согласно ГОСТ 31940—2012 Вода питьевая. Методы определения содержания сульфатов. Как видно на рисунке ниже, валидированный диапазон метода составляет от 10 до 2500 мг/л.

В этом случае лаборатории требуется:

подтвердить эксплуатационные характеристики в диапазоне от 40 до 2500 мг/л (**верификация**)
и установить их в диапазоне от 2500 до 5000 мг/л (**валидация**).



Рис.4 Схема диапазона применения метода определения сульфатов титриметрическим методом.

I.V РАЗРАБОТКА ПЛАНА ВАЛИДАЦИИ / ВЕРИФИКАЦИИ МЕТОДОВ

При разработке плана валидации/верификации необходимо в первую очередь ориентироваться на те группы объектов, которые ООС анализирует на постоянной основе. А также учитывать состав матрицы, диапазон измерения и объем проводимых испытаний. Это означает, что при планировании валидации/верификации требуется проанализировать потребности заказчиков в части определяемых показателей, возможных вариантов матриц и диапазона измерений (например, сопоставив информацию по указанным параметрам на основе испытаний за истекший год). В случае расширения области аккредитации, следует начинать с валидации/верификации тех показателей/объектов/в диапазоне измерений, которые являются наиболее востребованными заказчиками.

ВЛИЯНИЕ МАТРИЦЫ

Эксплуатационные характеристики для конкретного аналита зависят от состава матрицы. Как уже было сказано выше, вариация матрицы является наиболее важным источником неопределённости.

Матрица - это **преобладающий материал, компонент или субстрат**, который содержит интересующий аналит. Разный состав матриц, часто требует не одинаковых способов пробоподготовки. Поэтому, если ООС анализирует какой-либо показатель в разных матрицах, то эксплуатационные характеристики методов должны **отдельно подтверждаться для каждой группы матриц**.

В целях верификации метода испытаний какого-либо показателя, требуется проанализировать эти объекты по преобладающим компонентам субстрата и его свойствам.

Валидация/верификация методов должна проводится **отдельно для каждой группы матриц (или для наиболее различных по свойствам матриц)** на примере одного из типовых и доступных объектов для конкретного вида матрицы **в пределах диапазона измерений для аналита в конкретной группе матриц**.

ПРИМЕР: Объект испытаний «Молоко и молочные продукты» может быть представлен целой группой объектов, минимальный набор которых приведен в таблице ниже:

Продукт	Содержание, %			Кислотность °Т
	Белки	Жиры	Углеводы	
Молоко коровье сырое	2,8	3,5	4,7	16-18
Молоко обезжиренное	4,3	1,0	6,4	
Молоко 2,5 %	2,8	2,5	4,7	
Молоко 3,2 %	3,8	3,2	4,7	
Молоко 6 %	2,8	6	4,6	
Сливки 10 %	3,0	10	4,7	10-21
Сливки 20 %	2,9	20	3,5	
Сливки 33%	2,3	33	4,2	
Сливочное масло	0,8	72,5	1,3	26 - 65
Сметана 20%	2,8	20	3,2	65 -100
Сметана 50 %	2,5	50	3,4	
Творог 5 %	17	5	1,8	200 - 240
Сыр твердый	25,6	23	2,1	

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

Кефир 3,2%	2,8	3,2	3,6	90-180
Ряженка 2,5 %	3,2	2,5	4,2	
Йогурт 2,5 %	2,8	2,5	4,7	
Мороженное	4,5	11,5	23,8	21-50
Сухое молоко	26,3	26,7	38,4	16-18

В то время как, в целях верификации разных определяемых показателей группировка матриц будет различна:

В целях определения жира ГОСТ 5867-90, можно выделить следующие группы матриц:

1. Молоко, сливки, кисломолочные напитки без сахара	– так как все они состоят из воды, 2,8-3,0 % белков и 3,5 – 6,4 % углеводов.
2. Молоко, сливки, кисломолочные напитки с сахаром	– в них появляется дополнительный компонент – сахар.
3. Сыры, творог, творожные изделия	Преобладающим компонентом является белок, кроме того, они имеют твердое, пастообразное агрегатное состояние.
4. Сливочное масло	Преобладающий компонент матрицы - сам жир.

В целях определения кислотности согласно ГОСТ Р 54669-2011, матрицы будут группироваться иначе:

1. Жидкие молочные и кисломолочные продукты	Состав их как мы выяснили близок, отличие будет заключаться только в кислотности
2. Пастообразные молочные и кисломолочные продукты, включая мороженное	Такие продукты хуже гомогенизируются с дистиллированной водой при титровании, что дает худшую воспроизводимость результатов
3. Твердые продукты – творог и творожные продукты	Преобладающим компонентом является белок, кроме того, они имеют твердое агрегатное состояние.

Но не во всех случаях имеет смысл выделения матриц, даже если продукты отличаются разным агрегатным состоянием. Например:

ПРИМЕР:

Определение белка ГОСТ Р 53951-2010.

Принцип метода определения белка методом Кьельдаля, включая пробоподготовку, одинаков для любых молочных продуктов. Жидкие молочные продукты фактически отличаются меньшим содержанием белка, а пастообразные и сухие соответственно большим. Поэтому, в целях определения белка матрицы не выделяются.

ГОСТ 30178-96 Сырье и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов.

В данном случае способ пробоподготовки – минерализация, совершенно одинаковый для любых видов пищевых продуктов, и приводящий к разрушению любой матрицы. При этом эксплуатационные характеристики зависят только от концентрации аналита. В данном случае не имеет смысла подразделять пищевые продукты на различные матрицы в целях верификации метода.

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЕНИЙ МЕТОДИКИ И ВЕРИФИЦИРУЕМЫЕ ТОЧКИ

Как правило для всех видов количественных методов испытаний всегда определяются такие эксплуатационные характеристики как прецизионности (повторяемость и воспроизводимость) и правильность. Поскольку, прецизионность и правильность могут варьироваться в зависимости от концентрации/свойств аналита, то это следует учитывать при формировании плана валидации/верификации.

Если ожидается, что концентрация аналита в рутинных испытаниях будет изменяться более чем на 50% от среднего значения, то прецизионность и правильность должны определяться на нескольких уровнях в пределах диапазона метода, причем один из этих уровней должен быть близок к более низкому значению диапазона измерений (Пример А). Ниже рассматриваются также другие примеры сопоставления рабочего диапазона метода и выбора верифицируемых/валидируемых точек.

ПРИМЕР А: Если ООС определяет содержание сульфат-ионов в природных водах титриметрическим методом для определения коррозионной активности буровых вод, и в практике ООС встречаются концентрации в диапазоне от 40 до 5000 мг/л, т. е. средняя концентрация составляет $(5000+40)/2=2600$ мг/л, то вариация содержаний составляет $(5000-2600)/2600$ почти 100% от среднего значения, и в этом случае показатели прецизионности и правильности должны быть подтверждены на уровне 50-100 мг/л, 2500 мг/л и 4000-5000 мг/л. А так как диапазон применения метода согласно методики составляет от 10 до 2500 мг/л, то эксплуатационные характеристики для точки 4000-5000 мг/л требуется установить (Рис 5а)



а) Определение сульфатов в природных водах



б) Определение сульфатов в природных водах в питьевых целях



в) Определение сульфатов в сточных водах на очистных сооружениях



г) Определение сульфатов в технологическом растворе для фиксации красителя на ткани

Рис. 5 Определение сульфатов титриметрическим методом с хлоридом бария. Примеры применения метода в разных целях.

ПРИМЕР Б: Если сульфат-ионы определяются для определения возможности применения природной воды в питьевых целях, то содержание сульфат-ионов будет сопоставляться с ПДК сульфатов в питьевой воде (250 мг/л). В этом случае, самой главной задачей ООС является по результатам испытаний отделить питьевые воды от непитивых. В этом случае, должны подтверждаться показатели прецизионности и правильности на уровне 100-150 мг/л, 250 мг/л и 350-400 мг/л (Рис.4б). Эти точки находятся в пределах диапазона применения методики испытаний. (Рис 5б)

При этом для различных конкретных минеральных вод, содержание сульфатов может колебаться от 30 до 2000 мг/л (см. ГОСТ Р 54316—2020 Воды минеральные природные питьевые. Общие технические условия) поэтому Целевое значение для лабораторий анализирующих разные минеральные воды не будет ограничиваться ПДК.

ПРИМЕР В: Если содержание сульфатов определяется в сточных водах, где ПДК не должно превышать 1000 мг/л, то при определении содержания сульфатов на предмет завершения очистки уже потребуются верифицировать показатели прецизионности и правильности в точках 500 мг/л, 1000 мг/л и 1500 мг/л. Эти точки находятся в пределах диапазона применения методики испытаний. (Рис 5в).

ПРИМЕР Г: В технологическом процессе закрепления окраски хлопчатобумажных тканей должна поддерживаться концентрация сульфатов не ниже 7000 мг/л. Концентрация сульфатов определяется после приготовления раствора сульфата и хлорида натрия из технической глауберовой и поваренной соли смешением рассчитанных масс солей. В этом случае, в целях верификации достаточно подтвердить

прецизионность и правильность только в точке 7000 мг/л, так как в рутинной практике встречаются растворы от 6500 мг/л до 7500 мг/л – что соответствует вариации концентраций от среднего значения $((7500-7000)/7000) * 100\% = 7\%$ и при неизменности матрицы, вариация является незначительной (рис. 5г). В то же время методика испытаний не содержит установленных эксплуатационных характеристик для данной точки, т.е. потребуется объем выборки, соответствующий валидации метода.

При выборе точек диапазона измерений, для которых исследуются показатели прецизионности и правильности, следует учитывать, является ли целью испытаний или исследования сопоставление результата измерений с какими-либо критериями (ПДК, целевое технологическое значение, референтный интервал и др.). В том случае, если результаты испытаний сопоставляются с установленными критериями, то прецизионность и правильность должны быть оценены на уровне 50%, 100%, 150% установленных критериев.

Для некоторых испытаний может оказаться целесообразным определить прецизионность только в одной или двух концентрациях, имеющих особое значение для пользователей данных испытаний, например в спецификации контроля качества продукции (КК) или нормативном пределе.

ПОВТОРЯЕМОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ, ОБЪЕМ ВЫБОРКИ

Размер выборки (количество повторных испытаний) для определения эксплуатационных характеристик метода может варьироваться в разных областях испытаний, однако он должен быть таким, чтобы он был достаточно большим для получения статистически достоверных результатов, это связано с повышением точности самого стандартного отклонения при увеличении числа измерений (см. таблицу ниже).

Число измерений, n	2	3	4	5	10	20	30	50	∞
Неточность СКО, %	76	52	42	36	24	16	13	10	0

Рекомендуется не менее 6 повторных испытаний в целях валидации и не менее 3-х повторных испытаний в целях верификации, проводимых для каждой точки диапазона (концентрации) для каждого определения и каждого типа матрицы. Вообще говоря, чем больше исследуемых выборок, тем больше число степеней свободы, тем лучше статистическая основа для рассматриваемого результата измерения.

АНАЛИЗ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ НА НАЛИЧИЕ СТАТИСТИЧЕСКИХ ВЫБРОСОВ

Рассматриваемые оценки повторяемости и воспроизводимости основаны на нормальном распределении случайных величин, кроме того, нормальность распределения указывает на отсутствие каких-либо неслучайных причин, влияющих на разброс данных, кроме суммы таких факторов, как операторы, условия окружающей среды, конструктивные особенностей измерительных приборов.

Поэтому при валидации и верификации методов, следует удостовериться, что данные применяемые для расчета стандартного отклонения повторяемости и воспроизводимости подчиняются нормальному распределению (Рис.6).

Одним из методов проверки того, что выборка из 3-6 результатов имеет нормальное распределение, заключается в том, чтобы проверить не выходят ли минимальные и максимальные значения выборки за пределы критических значений для нормального распределения (распределения Стьюдента для p результатов), т.е. не являются ли они выбросами. На этом принципе построен статистический критерий Граббса (ГОСТ Р ИСО 5725-2).

Критерий Граббса – это отношение абсолютной разности наибольшего (или наименьшего) результата испытаний и среднего значения ингредиента к стандартному отклонению приписанного значения:

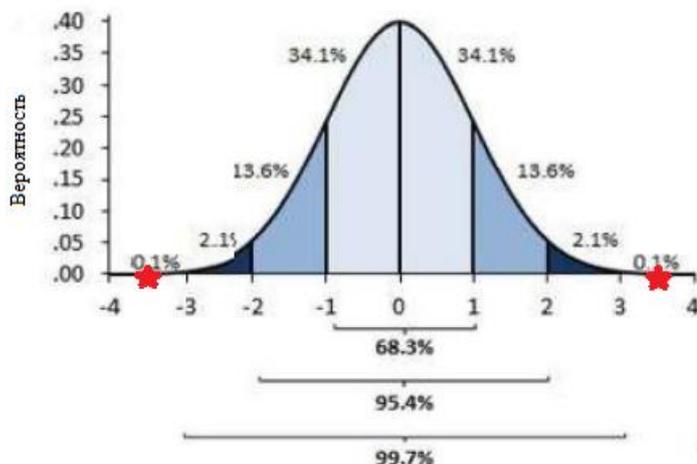


Рис.6 Нормальное распределение, выбросы – указаны красным.

$$G_{max} = \frac{|x_{max} - \bar{x}|}{S}$$

$$G_{min} = \frac{|x_{min} - \bar{x}|}{S}$$

где:

\bar{x} – среднее значение результата измерений

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

s – стандартное отклонение результатов измерений, включая ожидаемые выбросы.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_i)^2}{n - 1}}$$

Результаты оцениваются согласно таблице «Критические значения для критерия Граббса» (ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002 п.8 Таблица 5).

С другой стороны, на основании критерия Граббса может быть рассчитан максимальный диапазон, вокруг среднего значения, в пределах которого могут находиться значения, которые не являются выбросами:

Критические пределы Граббса = $\bar{x} \pm G_{0,95,p} \cdot S$, где p – число измерений в выборке.

ПРИМЕР: ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАТИСТИЧЕСКИХ ВЫБРОСОВ

Имеется набор результатов испытаний, требуется установить имеется ли отклонение от нормального распределения.

Дата	Результат
10.12.2021	10,2
13.01.2022	11,2
10.02.2022	11,6
18.03.2022	10,1
25.04.2022	10,2

14.05.2022	11,2
------------	------

1 способ: расчет критерия Граббса для наибольших и наименьших значений в выборке.

В течении 6 дней получены результаты измерений одного и того же образца. Для удобства расчета результаты могут быть упорядочены от минимального к максимальному:

A	B	C	D	E
1	Дата	Результат	C3-ŞCŞ9	D3^2
2	18.03.2022	10,1	-0,65	0,4225
3	10.12.2021	10,2	-0,55	0,3025
4	25.04.2022	10,2	-0,55	0,3025
5	13.01.2022	11,2	0,45	0,2025
6	14.05.2022	11,2	0,45	0,2025
7	10.02.2022	11,6	0,85	0,7225
8	Ср.	10,75	СРЗНАЧ(С3:С8)	2,155
9	СКО	0,66	СТАНДОТКЛОН.В(С3:С8)	СУММ(Е3:Е8)

В ячейках выделенных серым цветом указаны расчетные формулы в Excel.

Из полученных данных среднего значения и стандартного отклонения рассчитываются G_{min} , и G_{max} . Которые затем сравниваются с табличным значением критического значения критерия Граббса, которое выбирается для 95% вероятности (уровень значимости 5%) и p результатов измерений.

Результат	Расчет критерия Граббса	Критическое значение, $p=6$
min 10,1	$G_{min} = \frac{ x_{min} - \bar{x} }{S} \quad G_{min} = \frac{ 10,1 - 10,75 }{0,66} = 0,990$	$G_{0,95,p} = 1,887$
max 11,6	$G_{max} = \frac{ x_{max} - \bar{x} }{S} \quad G_{max} = \frac{ 11,6 - 10,75 }{0,66} = 1,295$	

Поскольку фактические значения критерия Граббса меньше критического значения, значит отклонения от нормального распределения нет.

2-й способ: расчет критических пределов Граббса для выборки.

$$\text{Пределы Граббса} = \bar{x} \pm G_{0,95,p} \cdot S$$

$$\text{Пределы Граббса} = 10,75 \pm 1,887 \cdot 0,66$$

$$\text{Пределы Граббса} = 10,75 \pm 1,245;$$

Т.е. результаты принадлежащие нормальному распределению должны войти в диапазон [9,50; 12,00], все результаты входят в указанный диапазон, следовательно, выбросов нет.

Повторяемость - это оценка прецизионности, полученная при получении результатов измерений на одном объекте и проведении испытаний на идентичных испытательных изделиях в течение короткого промежутка времени одним оператором с использованием одного и того же оборудования в максимально постоянных условиях (например, время проведения данного этапа метода, температура). Она может быть выражена в виде стандартного отклонения (s), дисперсии (s^2), для подходящего числа измерений, выполненных в условиях повторяемости.

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Повторяемость дает представление о кратковременном изменении результатов измерений и обычно используется для оценки вероятной разницы между результатами измерений, полученными в ходе одного анализа. Однако, она недооценивает разброс результатов, который можно ожидать при изменении условий в течении нескольких дней и т. д.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

Стандартное отклонение повторяемости для единичных определений может быть рассчитано в сопоставлении с референтным значением.

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}}$$

При отсутствии референтного значения может быть применен метод двойных проб. В этом случае, проводят параллельные определения, которые в рутинном анализе не проводятся, и находят стандартное отклонение разности между результатами. При применении метода двойных проб, минимальное число степеней свободы составляет не 6, а $6 \cdot \sqrt{2} = 8$ повторов (см. раздел Валидация отбора проб).

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (a_i - b_i)^2}{n}}$$

a – 1-й результат в параллели;
b – 2-й результат в параллели.

Воспроизводимость - это оценка прецизионности, полученная при выполнении серии измерений в более изменчивых условиях, т. е. одним и тем же методом на идентичных испытательных изделиях, используемых различными операторами с различным оборудованием на различных измерительных приборах (если применимо), с использованием по меньшей мере двух различных калибровочных стандартов в разное время. Она может быть выражена в виде стандартного отклонения (s), дисперсии. Это предполагает проведение повторных измерений в разные дни в условиях, максимально отражающих условия рутинного использования метода (например, измерения, выполненные различными аналитиками с использованием различных наборов оборудования).

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Средневзвешенное (объединённое) стандартное отклонение

Стандартное отклонение воспроизводимости и повторяемости может быть определено несколькими образцами, выполненными в серии, или как объединенное стандартное отклонение ряда многократных двойных определений, выполненных в нескольких сериях. То есть, если имеются данные прецизионных экспериментов, выполненных на различных образцах, возможно, в разное время, и нет существенной разницы между отклонениями от каждого набора данных, данные могут быть объединены для расчета объединенного стандартного отклонения (s_{pooled}).

$$s_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2 + (n_3 - 1)s_3^2 + \dots + (n_k - 1)s_k^2}{n_1 + n_2 + n_3 + \dots - k}}, \text{ где}$$

n_1 - число результатов для определения стандартного отклонения s_1 ;
 n_2 - число результатов для определения стандартного отклонения s_2 ; и т.д.,
 k – число разных образцов для которых проводились повторные испытания.

Если количество повторных испытаний всех образцов одинаково, то формула примет вид:

$$s_{pooled} = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + \dots + s_k^2}{k}}$$

s_i – стандартное отклонение при измерении i – ого образца;
 n_i – число измерений для i – ого образца;
 k – число измеренных образцов.

Число степеней свободы, достигаемых при различных комбинациях числа серий и числа образцов в каждой серии, приведено в таблице 1 ниже:

Таблица 1

Число образцов в серии	Число серий	Число степеней свободы для стандартного отклонения повторяемости	Число степеней свободы для внутрилабораторного стандартного отклонения воспроизводимости
7	1	6	Не определяется
4	2	6	4
3	3	6	6
2	6	6	10
n	m	(n-1)*m	n*(m-1)

Для того чтобы заявленная прецизионность действительно отражала эффективность метода в нормальных условиях эксплуатации, она должна быть определена в таких условиях. Испытательные материалы должны быть типичными для образцов, которые обычно анализируются. Подготовка проб должна соответствовать обычной практике, а вариации в реагентах, испытательном оборудовании, аналитиках и приборах должны быть репрезентативными для тех, с которыми обычно сталкиваются. Иными словами, испытания в целях верификации должны быть проведены всеми задействованными в выполнении метода аналитиками, на всех единицах, предназначенного для выполнения метода оборудования и в разные дни.

I.VI КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

Критерий приемлемости - это заданное значение или ожидаемый результат определения эксплуатационного параметра, которое используют для оценки адекватности методики путем сравнения с полученными экспериментальными данными.

Требуется понимать, что существующие системы организации оценки соответствия в ЕС и ЕАЭС принципиально отличаются.

Уровень развития технологий столь высок, что непрерывно появляется новое оборудование. Поэтому, чтобы не лимитировать этот процесс, в странах ЕС, эксплуатационные характеристики, как правило, в методиках испытаний не устанавливаются. Но, требования к точности определения-аналитов на законодательном уровне регламентируются в Регламентах ЕС. По этой же причине, отсутствия детальных пошаговых инструкций, лаборатории часто требуется разрабатывать стандартные операционные процедуры (см. приложение Д).

В этом случае, внутрилабораторная верификация метода должна обеспечить доказательство того, конкретный метод/оборудование/тест система достигают установленных законодательством характеристик. В этом случае определяются параметры производительности методов и сопоставляются с критериями приемлемости, о которых пойдет речь ниже. **Для микробиологических показателей в регламентах ЕС определены не эксплуатационные характеристики методов, а сами методы [20].**

В рамках ЕАЭС технические регламенты устанавливают не рабочие характеристики методов испытаний, а уже сами методы испытаний. Которые, как правило, представляют собой пошаговую инструкцию выполнения операций – поэтому дополнительные

процедуры разрабатывать нет необходимости. Методы испытаний в свою очередь содержат не требования к точности оборудования, а предполагают применение конкретного оборудования (весы по ГОСТ..., посуда мерная лабораторная стеклянная по ГОСТ..., кислота серная по ГОСТ... И т.д.). Этот же подход характерен для стандартов ASTM и ASSHTO. **В этом случае, в качестве критериев приемлемости, в первом приближении, как правило используются характеристики точности применяемых методов.**

В стандартах ISO, ASTM и ASSHTO характеристики точности приводятся в разделах «Прецизионность» и «Правильность».

Эксплуатационные характеристики в современных методиках испытаний (например, ГОСТ) приводят в разделе «Метрологические характеристики»; в документах выпущенных ранее 2013 г, характеристики точности методов приведены в конце раздела «Обработка результатов».

В том случае, если определяемый параметр не будет удовлетворять соответствующим **критериям приемлемости**, дальнейшее определение параметров функционирования метода **следует прекратить и предпринять соответствующие корректирующие действия**. Только после этого имеет смысл возобновлять определение параметров производительности. Т.е. повторить определение тех из них, которые до корректирующих действий (ремонт прибора, смена реактивов и др.) не удовлетворили критериям приемлемости.

В некоторых случаях, если **корректирующие действия не привели к улучшению характеристик функционирования**, приходится отказаться от **данного метода испытаний или пробоподготовки в пользу других, более чувствительных методов**.

Оценка критериев приемлемости

В том случае, если критерии приемлемости не приведены, то их можно установить путем межлабораторного эксперимента (см. серию стандартов ГОСТ ISO/IEC 5725) или на основании найденного в процессе верификации экспериментально стандартного отклонения.

Расчитывается максимальное расхождение между результатами полученными в условиях повторяемости и воспроизводимости, для использования:

- в целях оперативного контроля качества (предел повторяемости);
- внутрилабораторного контроля между специалистами, измерений в разные дни (предел воспроизводимости).

Ниже приведены простые расчеты на основании предположения нормального распределения без учета числа степеней свободы, т.е. для стандартных отклонений, полученных на основании числа степеней свободы более 10. Если, число степеней свободы меньше 10, то рекомендуется вместо коэффициента 1,96 для бесконечного числа степеней свободы, использовать коэффициент Стьюдента для конкретного числа степеней свободы $t_{(n-1),0,95}$.

Предел повторяемости	Предел воспроизводимости
Предел повторяемости 2-х параллельных результатов $r = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_r$	Предел воспроизводимости – максимальная разница между 2-мя результатами, полученными в максимально отличных друг от друга условиях, например в 2-х лабораториях $R = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_R$
Предел повторяемости 3-х параллельных результатов $r = 1,96 \cdot \sqrt{3} \cdot S_r$	S_R – объединенное стандартное отклонение воспроизводимости

	Предел воспроизводимости не рассчитывается для другого значения n, кроме 2-х
<p>S_r – объединенное стандартное отклонение повторяемости</p> <p>Если результат получен на основании стандартного отклонения разности</p> $= 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_d$ <p>S_d – стандартное отклонение разности параллельных результатов.</p>	

II. ВАЛИДАЦИЯ/ВЕРИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Для всех методов количественного химического анализа (КХА) должны быть установлены следующие эксплуатационные характеристики:

1. предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ), если метод применяется для следовых количеств веществ.
2. линейность, диапазон линейности и чувствительность градуировочной характеристики для инструментальных методов, рабочий диапазон.
3. повторяемость;
4. воспроизводимость;
5. правильность;
6. селективность/специфичность
7. робастность;
8. стабильность;
9. неопределенность результатов испытаний для диапазона измерений **в пределах области аккредитации.**

Измерение **смещения и сходимости/воспроизводимости** являются минимальными требованиями к методам, которые дают количественные результаты.

II.1 МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПЛУАТАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК (ВАЛИДАЦИЯ)

1. Предел обнаружения (LOD)

Предел обнаружения представляет собой способность выявлять наименьшее различие между двумя концентрациями анализируемого компонента [16]. **Предел обнаружения** характеризуется концентрацией или активностью аналита в отдельной индивидуальной пробе, при которой исследуемая проба может быть дифференцирована с высокой степенью вероятности от холостой пробы.

Количественным выражением для LOD может быть значение измерения холостой пробы, рассчитываемое по формуле

$$y_{min} = \bar{y}_{x.п.} + k \cdot S_{x.п.}$$

где $\bar{y}_{x.п.}$ - значение отклика холостой пробы;

$S_{x.п.}$ - среднеквадратическое отклонение измерительного сигнала прибора.

Значение k как правило выбирают равным 3 по следующей причине. Если значения аналитического сигнала холостого опыта и минимального обнаруживаемого сигнала

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

распределены нормально, то при разности между средними значениями 6σ вероятность перекрытия сигналов составляет всего лишь 0,13 %, что вполне допустимо. Таким образом, величину сигнала, превышающую среднее значение сигнала контрольного опыта на $3 < S_{x.п.}$, можно с высокой вероятностью (по крайней мере, больше 99 %) считать принадлежащей определяемому веществу.

Для методов медицинских исследований до сих пор вместо термина «предел обнаружения» применяется термин «аналитическая чувствительность метода», но такое его употребление не рекомендуется, так как данный термин имеет также значения «аналитическая чувствительность» и «диагностическая чувствительность», которые не связаны с пределом обнаружения метода.

Для большинства современных аналитических методов LOD можно разделить на два компонента: предел обнаружения метода (**Method Detection Limit - MDL**) и предел обнаружения инструмента (**Instrument Detection Limit - IDL**).

MDL - это термин, который следует применять к методам извлечения и методам анализа, разработанным для анализа конкретных аналитов в матрице.

MDL может быть определен как наименьшее количество или концентрация аналита, которое может быть надежно обнаружено или дифференцировано от фона для конкретной матрицы (с помощью конкретного метода). Другими словами, LOD - это наименьшее значение, измеренное методом, который больше, чем связанная с ним неопределенность. Все матричные помехи должны быть приняты во внимание при определении MDL.

LOD метода не следует путать с самым низким инструментальным откликом (ILD), т. е. самым низким инструментальным сигналом.

Пробы для оценки LOD и LOQ.

Холостые пробы более пригодны для методов, где на этих пробах получают хорошо измеряемый сигнал, например, для спектрофотометрии и атомной спектроскопии. Однако для таких методов, как хроматография, которая основана на обнаружении пика над уровнем шума, необходимы **пробы с концентрацией, близкой к LOD или превышающей его**. Их можно приготовить, например, вводя добавки в холостую пробу [13]. В случаях, когда холостые пробы или тестовые пробы с низкой концентрацией аналита отсутствуют, часто используют **холостые реактивы**. Если эти реактивы не подвергают всем операциям методики измерений, а вводят непосредственно в прибор, по результатам таких опытов будут получены LOQ/LOD прибора.

Предел количественного определения (LOQ)

Предел количественного определения также называют пределом детерминации, однако термин предел количественного определения предпочтителен для того, чтобы отличить его от LOD. Подобно LOD, LOQ можно разделить на два компонента: предел количественного определения метода (MQL) и инструментальный количественный предел (IQL).

MQL может быть определен как наименьшее количество аналита, которое может быть надежно идентифицировано и количественно определено с определенной степенью надежности **в пределах определенной матрицы (определенным методом)**.

IQL может быть определен как наименьшее количество аналита, которое может быть надежно идентифицировано и количественно определено **прибором**.

Предел количественного определения выражается как концентрация аналита (например, процентное содержание, частей на миллиард) в образце/ пробе.

Для оценки LOQ были применены различные соглашения, в зависимости от требуемого уровня определенности (например, является ли анализ юридическим или нет, неопределенность целевого измерения и критерии приемлемости). Обычно принимают:

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 30 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

- LOQ как значение чистого образца плюс 10-кратное стандартное отклонение повторяемости бланка,
- 3-кратное LOD (что дает в основном тот же показатель),
- на 50% выше самого низкого уровня затравления (добавки), используемого для проверки метода.
- для большей уверенности LOQ можно принять в десять раз больше LOD.

В некоторых областях испытаний могут использоваться и другие факторы, и в этом случае нужно ссылаться на фактор, действующий в рассматриваемой области испытаний.

Критерии приемлемости LOD и LOQ

Критерии приемлемости LOD и LOQ устанавливаются законодательством ЕС в соответствующих регламентах [4,5,6], что является применимым на территории ЕАЭС [3]. Как правило, LOQ составляет 1/10 ПДК.

Законодательство ЕАЭС не устанавливает критериев приемлемости LOD и LOQ.

В некоторых областях испытаний данные показатели устанавливаются по отраслевым принципам. Если, LOQ не установлено, за него принимают нижний предел методики измерений. Как правило, LOD составляет 1/3 LOQ.

ПРИМЕР: МУК 4.1.3166—14 «Методические указания Газохроматографическое определение ..., ацетальдегида, в воде и водных вытяжках из материалов различного состава», LOD и LOQ, не устанавливаются, но диапазон определяемых концентраций ацетальдегида, устанавливается от 0,05 – 1,0 мг/дм³. В этом случае, LOQ составляет 0,05 мг/дм³, а LOD = 0,05/3 = 0,017 мг/дм³.

Хотя с другой стороны, по общепринятым правилам, LOQ=1/10 ПДК составляет 1,0/10=0,1 мг/дм³, тогда LOD составит 1/3 LOQ = 0,1/3=0,033 мг/дм³. К сожалению, эти подходы приводят к разным критериям приемлемости. В этом случае, ответственность за выбор критериев приемлемости остается за ООС.

Методы определения предела обнаружения

Существует несколько подходов для определения предела обнаружения:

- 1.1 LOD, основанный на стандартном отклонении результатов холостой пробы,
- 1.2 LOD основанный на визуальной оценке,
- 1.3 LOD на основе отношения сигнал-шум,
- 1.4 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика.

Ниже разобраны различные методы определения LOD и LOQ, на примере определения ацетальдегида газохроматографическим методом (результаты измерений предоставлены одним из членов ТК ЛАБ, ПК «Химия»).

1.1 LOD, основанный на стандартном отклонении результатов холостой пробы

Предел обнаружения может быть определен путем анализа большого количества холостых проб (рекомендуется n более 20). Где независимые холостые пробы измеряются один раз каждая (рекомендуется n ≈ 10) и независимые затравленные образцы с самой низкой допустимой концентрацией, измеряются один раз каждая (рекомендуется n ≈ 10). LOD выражается как среднее значение результатов холостых проб плюс три стандартных отклонения (+ 3s).

Для оценки LOD и LOQ желательно использовать либо

- **холостые пробы**, т.е. матрицы, не содержащие определяемый аналит,
- **либо тестовые пробы с концентрацией аналита, близкой к предполагаемому LOD или ниже его.**

Следует отметить, что даже при 10 повторах, оценки стандартного отклонения являются по сути своей непостоянными. Таким образом, оценку LOD/LOQ, полученную в ходе валидации, следует воспринимать как ориентировочное значение. Этого будет достаточно, если с помощью оценки LOD/LOQ нужно просто показать, что концентрация аналита в пробах значительно превышает LOD/LOQ.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 31 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

ПРИМЕР 1.1: В соответствии со спецификацией определения ацетальдегида методом ГХА предел количественного определения LOQ должен быть не более 0,05 мг/дм³. Для определения стандартного отклонения концентрации 6 затравленных образцов определялись 6 раз каждая. Данные приведены в таблице ниже. Для расчётов использована концентрация, для которой получено более 50% положительных результатов – 0,03 мг/дм³.

№	Концентрация ацетальдегида в пробе, мг/дм ³						
	Х.п. H ₂ O	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06
1	0,0	0,009	0,008	0,021	0,042	0,046	0,061
2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,038	0,053	0,058
3	0,0	0,0	0,0	0,016	0,039	0,050	
4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,040	0,048	
5	0,0	0,0	0,014	0,027	0,037	0,051	
6	0,0	0,0	0,0	0,031	0,036	0,049	
Х сред.	0,0	0,0015	0,004	0,016	0,039	0,050	0,060
S	0,0	0,0037	0,0060	0,0066 (без 0)	0,0022	0,0024	0,0021
LOD (3S)	0,0			0,0198			
LOQ (3LOD)	0,0			0,059			
Отношение числа положительных и отрицательных результатов							
+ / -	0 : 6	1 : 5	2 : 4	4 : 2	6 : 0	6 : 0	6 : 0

LOD составило 0,0198. LOQ = 0,0198*3 = 0,059 мг/дм³. Также в таблице видно, что начиная с концентрации 0,04 мг/дм³ результаты действительно воспроизводятся (см. средние значения).

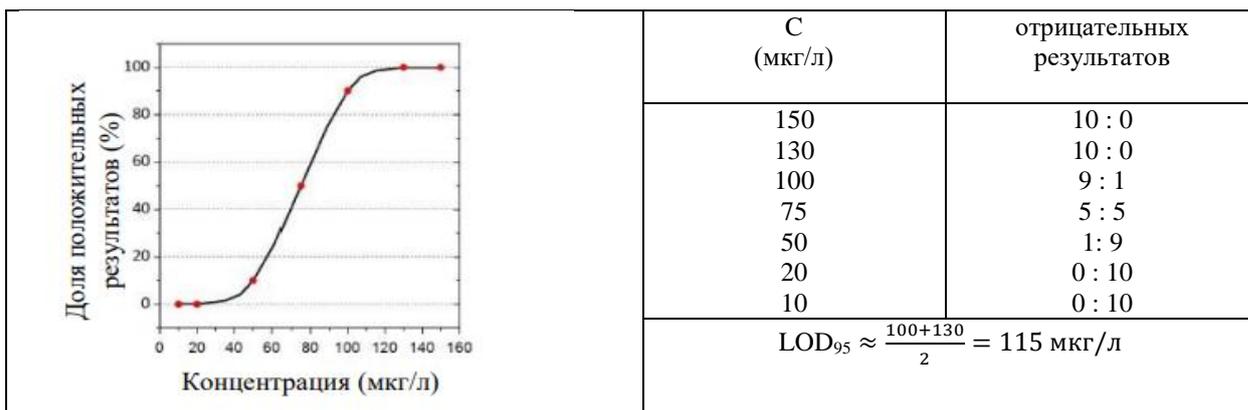
1.2 LOD основанный на визуальной оценке

Визуальная оценка может быть использована как для инструментальных так и для неинструментальных методов. Но чаще она применяется для установления LOD для неинструментальных и качественных методов испытаний.

Образцы затравляются анализируемым веществом в диапазоне концентраций. На каждом уровне концентрации необходимо будет измерить приблизительно не менее 6 независимых повторов. Измерение повторений на различных уровнях должно быть рандомизировано. На основе этих данных должна быть построена кривая отклика в процентах положительных (или отрицательных) результатов по отношению к концентрации, на основе которой можно было бы путем проверки определить пороговую концентрацию, при которой испытание становится ненадежным. Предел обнаружения определяется путем анализа образцов, затравленных известными концентрациями аналита, путем установления минимального уровня, при котором аналит может быть надежно обнаружен, т.е. пороговым уровнем считают такую концентрацию, при превышении которой доля ложно отрицательных результатов будет невелика – в соответствии с заданной вероятностью, например, 5 % (LOD₉₅). При валидации оценивают пороговый уровень, заявленный в документе на методику [13].

ПРИМЕР 1.2: Определение пороговой концентрации для качественного метода с заявленной пороговой концентрацией 100 мкг/л. На каждом уровне было сделано десять наблюдений. Построен график зависимости доли положительных результатов, в процентах, от концентрации, по которому можно визуально определить пороговую концентрацию, при которой результат испытания становится недостоверным. Если принять как критерий долю ложно отрицательных результатов < 5 %, пороговая концентрация LOD₉₅ находится между 100 и 130 мкг/л.

	Число положительных/
--	----------------------



Для примера с ацетальдегидом, на основании приведенной в ПРИМЕРЕ 1.1 таблице получим,
 $LOD_{95} \approx \frac{0,03+0,04}{2} = 0,035 \text{ мг/дм}^3$

1.3 LOD на основе отношения сигнал-шум

В случае инструментальных аналитических процедур, которые демонстрируют фоновый шум (атомно-абсорбционные, атомно-эмиссионные, хроматографические методы), общий подход заключается в сравнении измеренных сигналов от образцов с



Рис.7 Иллюстрация фонового шума прибора на хроматограмме.

известными низкими концентрациями аналита с таковыми от холостых проб и установлении минимальной концентрации, при которой аналит может быть надежно обнаружен. Обычно приемлемые отношения сигнал-шум составляют 2:1 или 3:1 (рис.7).

Использование отношения сигнал / шум для аналитического стандартного образца, введенного в прибор, является полезным показателем эффективности прибора, но нецелесообразным средством оценки LOD метода. Подавляющее большинство анализов в наши дни проводится на аналитических приборах. Каждый из этих приборов имеет ограничение на количество анализируемого вещества, которое они могут обнаружить. Это ограничение может быть выражено как предел обнаружения прибора (IDL), который может быть определен как наименьшее количество аналита, которое может быть надежно обнаружено или дифференцировано от фона на приборе (т. е. инструментального шума). **Отношение сигнал-шум является частью стандартной калибровочной процедуры для таких приборов.**

Для определения предела обнаружения LOD готовят несколько концентраций затравленных холостых проб с концентрацией ниже LOQ и устанавливают минимальное количество (концентрацию) определяемого вещества в образце, при котором величина отношения аналитического сигнала к уровню шумов равна 3. Найденная величина является оценкой предела обнаружения LOD.

$$\frac{\text{сигнал}}{\text{шум}} = \frac{\text{Концентрация пробы}}{LOD} = \frac{3}{1}$$

$$LOD = \frac{3}{\text{сигнал/шум}} * \text{Концентрация пробы}$$

ПРИМЕР 1.3: В соответствии со спецификацией определения ацетальдегида методом ГХА предел количественного определения LOQ должен быть не более 0,05 мг/дм³. Для определения предела обнаружения использовали растворы с концентрацией ацетальдегида 0,01, 0,02 и 0,03 мг/дм³.

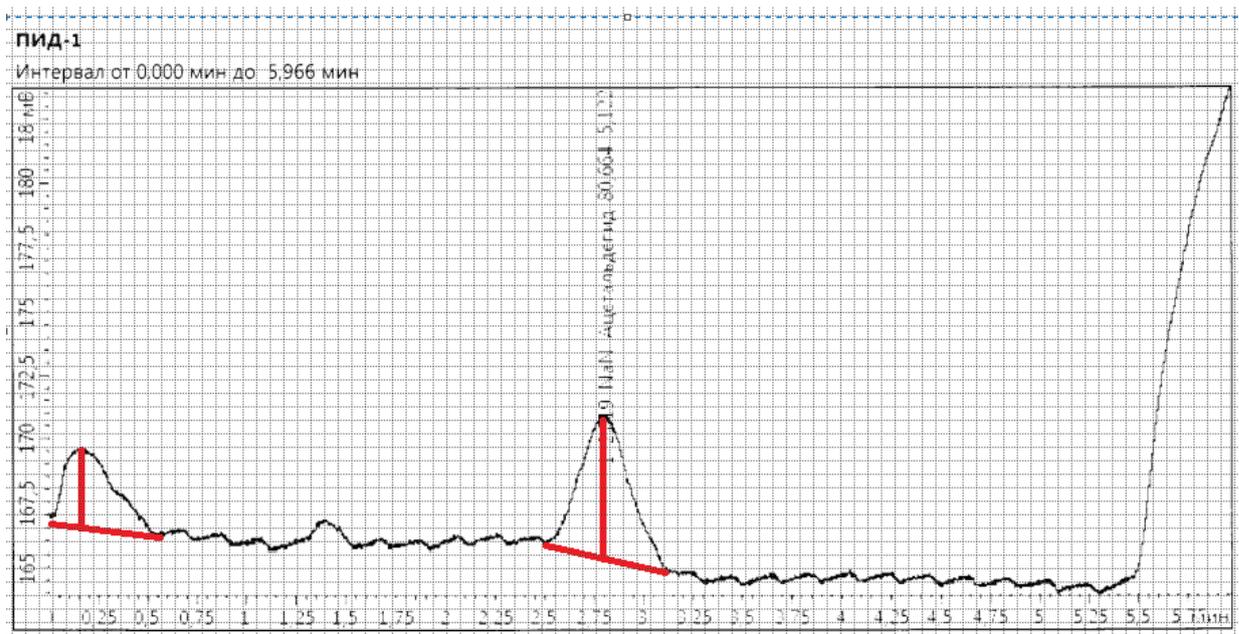


Рис.8 Расчет отношения сигнал/шум

На полученных хроматограммах измеряют высоту пика пробы (можно заменить площадью пика) и высоту пика шума (максимальную площадь пика шума) (рис.8).

h (холостой пробы) = 6 см

h (ацетальдегида) = 11,5 см

$$\frac{117 \text{ мм}}{60 \text{ мм}} = 1,95$$

$$LOD = \frac{3 * 0,01 \text{ мг/дм}^3}{1,95} = 0,015 \text{ мг/дм}^3$$

1.4 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика

Если данные по образцам вблизи или на LOD отсутствуют, параметры калибровочного уравнения могут быть использованы для оценки инструментального LOD.

Величину наименьшего аналитического сигнала можно выразить при помощи уравнения градуировочного графика:

$$y_{min} = \bar{y}_{x.п.} + b \cdot C_{min}$$

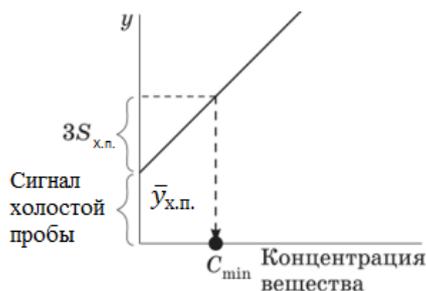
b - угловой коэффициент прямой (тангенс угла наклона калибровочной прямой)

$\bar{y}_{x.п.}$ - **отклик прибора** на затравленный образец (отрезок, отсекаемый на оси Y калибровочной прямой).

С другой стороны, величина наименьшего аналитического сигнала описывается уравнением

$$y_{min} = \bar{y}_{x.п.} + 3 \cdot S_{x.п.}$$

$S_{x.п.}$ - стандартное отклонение **отклика прибора** (не концентрации!) – представляет собой стандартную ошибку калибровки.



Объединив уравнения, получим:

$$\bar{y}_{x.p.} + b \cdot C_{min} = \bar{y}_{x.p.} + 3 \cdot S_{x.p.}$$

$$b \cdot C_{min} = 3 \cdot S_{x.p.}$$

$$C_{min} = \frac{3 \cdot S_{x.p.}}{b}$$

При корректной постановке холостого опыта градуировочный график должен проходить через начало координат – и $\bar{y}_{x.p.}$ будет равно 0.

Это уравнение широко используется в аналитической химии. Однако, поскольку это **экстраполяция**, результаты не могут быть столь же надежными, как результаты экспериментов, проведенных вблизи предполагаемого уровня LOD, и рекомендуется, чтобы образцы с концентрацией вблизи предполагаемого уровня LOD были проанализированы для подтверждения того, что они могут быть обнаружены с соответствующей вероятностью.

ПРИМЕР 1.4: В соответствии со спецификацией определения ацетальдегида методом ГХА предел количественного определения LOQ должен быть не более 0,05 мг/дм³. Для построения градуировочной зависимости использовались концентрации 0,05; 0,1 и 0,3 мг/дм³.

Концентрация, мг/дм ³	Площадь пика	
0,05	361,464	
0,1	873,734	
0,3	2709,551	

Для подтверждения предела обнаружения ориентировочно выбирается добавка на уровне предполагаемого LOD, (0,05 мг/дм³ делить на 3). Взяты пробы 0,01 и 0,02 мг/дм³.

Стандартное отклонение площади пиков для концентрации 0,01 мг/дм³ и 0,02 мг/дм³ соответственно составляют

№	Площади пиков, мВ*с		$C_{min} = \frac{3 \cdot S_{x.p.}}{b}$
	0,01 мг/дм ³	0,02 мг/дм ³	
1	80,664	76,155	$C_{min} = \frac{3 \cdot 40,332}{8959,1} = 0,0135 \text{ мг/дм}^3$ $C_{min} = \frac{3 \cdot 38,0775}{8959,1} = 0,0128 \text{ мг/дм}^3$
2	0	0	
3	0	0	
4	0	0	
S	40,332	38,0775	
LOD	0,0135	0,0128	

Т.е. не важно будет ли добавка 0,01 или 0,02 мг/дм³ расчеты приводят к одному значению LOD = 0,013 мг/дм³

Сравнение результатов LOD и LOQ, полученных разными методами

Критерий приемлемости	LOD, основанный на стандартном отклонении результатов холостой пробы	1.1 LODоснованный на визуальной оценке	1.2 LOD на основе отношения сигнал-шум	1.4 По величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	-------------------------------------	---	--------------

					калибровочного графика
LOD	0,017 мг/дм³	0,019 мг/дм ³	0,035 мг/дм ³	0,015 мг/дм ³	0,0135 мг/дм ³
LOQ	0,05 мг/дм³	0,054 мг/дм ³	0,115 мг/дм ³	0,045 мг/дм ³	0,042 мг/дм ³

На основании полученных данных можно сделать вывод, что значения LOD и LOQ подтверждены.

Как видно из таблицы выше, любой из применяемых методов является приемлемым и дает сопоставимые результаты. Для метода основанного на визуальной оценке – получено недостаточно повторов, поэтому его результаты значительно отличаются от остальных. В целях верификации может быть выбран любой из подходов.

Коррекция бланка

Очень важно, для определения предела обнаружения, требуется **действительно чистая матрица**. Для таких широко распространенных контаминатов пищевых продуктов, как свинец, пестициды и антибиотики, вопрос нахождения чистой от них матрицы зачастую является очень непростым, занимает много времени и “нулевую” линию прибора – в принципе никогда нельзя считать свободной от следовых концентраций определяемого вещества. В этом случае, правильнее говорить о “линии бланка”.

“Линию бланка” необходимо контролировать с помощью контрольной карты интенсивности отклика по бланку. При этом, при смене реактивов (бланки реактивов) и чистой матрицы (бланки матрицы), стандартное отклонение положения линии бланка на контрольной карте может меняться, в этом случае требуется проводить корректировку бланка по интенсивности и по стандартному отклонению. Для корректировки бланка по стандартному отклонению применяют формулу:

$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_c}}, \text{ где}$$

s_0 – стандартное отклонение всех результатов бланка;

n – число измерений бланка **до** изменения в реагентах, чистой матрице и др.,

n_c – число измерений бланка **после** изменений в реагентах, чистой матрице и др..

Если в серии выполнения анализов находится более одной пробы, то остатки вещества в проточных системах (например хроматографах) могут задерживаться и выходить со следующей пробой при этом увеличивая ее фактическую концентрацию. Поэтому, между сериями или внутри нее обязательно должен пропускаться бланк вещества – чтобы определить произошло ли завышение концентрации.

2. Повторяемость

Повторяемость - дает представление о кратковременном изменении результатов измерений и обычно используется для оценки вероятной разницы между результатами измерений, полученными в ходе одного анализа. Однако, она недооценивает разброс результатов, который можно ожидать при нормальных условиях эксплуатации в течении периода применения одной партии реактивов, изменения условий в течении нескольких дней и т. д.

Инструментальная повторяемость может быть определена путем введения стандартных растворов, которые используются для подготовки рабочей калибровочной кривой, а также полученного или затравленного образца на каждом из уровней b раз (см. Раздел Повторяемость и воспроизводимость).

Для приборов содержащих проточные системы, измерения должны быть сделаны в случайном порядке, чтобы свести к минимуму смещение (т.е. концентрации не от

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 36 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

минимальной к максимальной, а в случайном порядке). Требуется вычислить среднее, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение в %.

Повторяемость метода может быть определена путем подготовки затравленных образцов аналита с уровнями аналита(ов) в концентрациях, используемых для исследований степени извлечения метода, или вблизи них. Это может быть сделано путем использования полученного материала или путем обогащения материала (требуемым количеством анализируемого вещества(ов)). Реплицированные пробы готовятся из каждого из этих образцов и анализируются одним аналитиком в тот же день. Требуется вычислить среднее, стандартное отклонение и процент относительного стандартного отклонения.

3. Воспроизводимость

Для «валидации в одной лаборатории» наилучшие показатели точности достигаются путем проведения повторных анализов (при валидации 6 повторов в условиях воспроизводимости) независимо подготовленных испытуемых частей лабораторного образца, сертифицированного эталонного материала (CRM) или эталонного материала (RM) в нормальных долгосрочных условиях эксплуатации.

Если имеются данные прецизионных экспериментов, выполненных на различных образцах, возможно, в разное время, и нет существенной разницы между отклонениями от каждого набора данных, данные могут быть объединены для расчета объединенного стандартного отклонения (*Spooled*) (см. Раздел Повторяемость и воспроизводимость).

Для сравнения воспроизводимости двух методов рекомендуется F-тест. Если вычисленная тестовая статистика ($F = var_1/var_2$) превышает критическое значение, полученное из статистической таблицы, то существует существенная разница между дисперсиями методов и нулевая гипотеза отклоняется.

4. Линейность диапазона

Линейность калибровки заключается в способности **получить измерительный сигнал (отклик) прибора**, прямо пропорциональный концентрации **искомого** аналитического параметра **в определенном диапазоне измерений**.

Чувствительность измерительной системы (Sensitivity of a Measuring System) -

представляет собой коэффициент изменения индикации измерительной системы и соответствующего изменения значения измеряемой величины (коэффициент наклона калибровочной кривой). Чувствительность можно определить как наклон калибровочной кривой на уровне LOQ.

Чувствительность измерительной системы/метода

Чувствительность измерительной системы (чувствительность метода) – это изменение выходного сигнала прибора, которое соответствует изменению измеряемой величины (например, концентрации аналита) т.е. это коэффициент изменения индикации измерительной системы и соответствующего изменения значения измеряемой величины [12].

Понятие рекомендуется использовать полностью как “чувствительность измерительной системы” для того, чтобы избежать путаницы с понятиями "аналитическая чувствительность" и "диагностическая чувствительность" из области лабораторной медицины.

Чувствительность измерительной системы можно определить как наклон калибровочной кривой на уровне LOQ.

Чувствительность метода - это скорость изменения измеряемой реакции с изменением концентрации (или количества) аналита (рис.11). Большая чувствительность обычно означает меньший динамический диапазон, но также и меньшую неопределенность измерения. Для инструментальных систем чувствительность представлена наклоном (b)

калибровочной кривой ($y = a + bx$; $b = \frac{dy}{dx}$) и может быть определена классической процедурой наименьших квадратов или экспериментально с использованием образцов, содержащих различные концентрации анализируемого вещества.

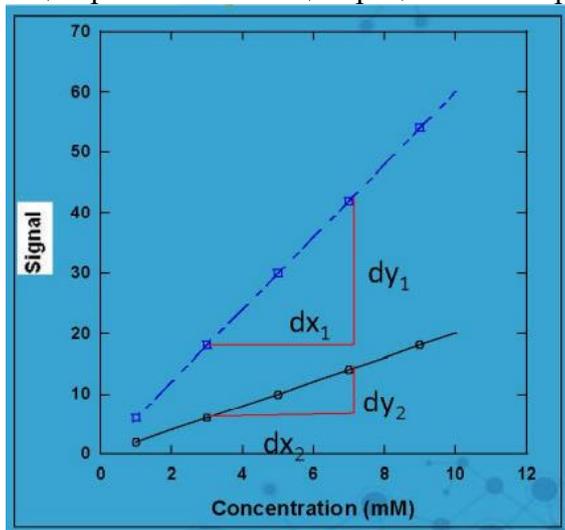
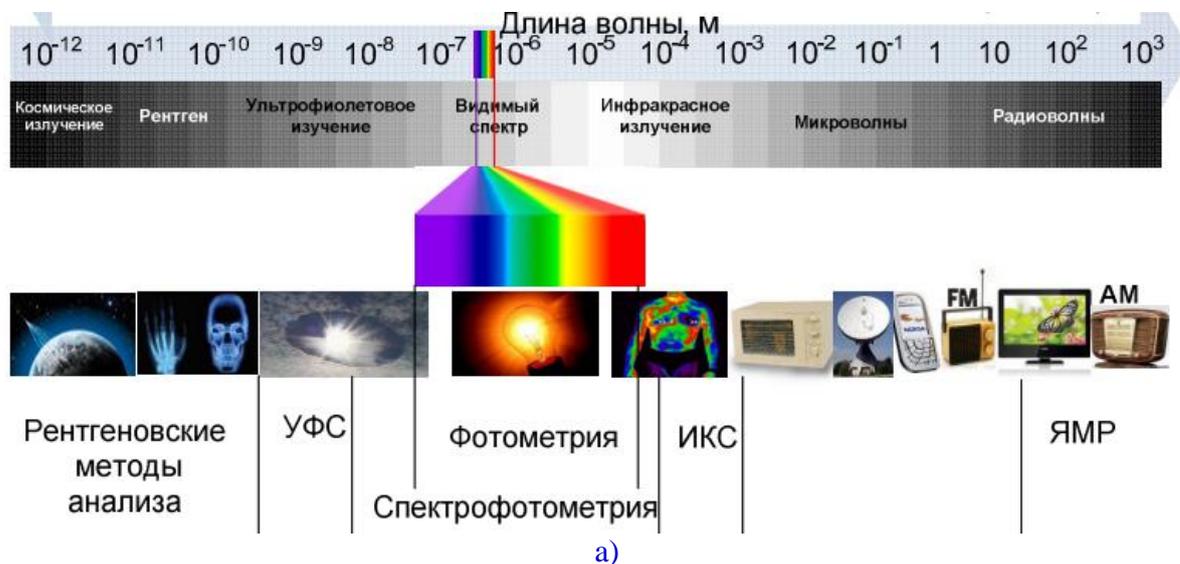


Рис.11 Разные углы наклона калибровочных кривых, отражающих разную чувствительность измерительных систем.

Иногда известна теоретическая чувствительность. Многие ион-селективные электроды (например, нитратный электрод) ведут себя в соответствии с законом Нернста, например, изменение сигнала исправного стеклянного электрода должно составлять 59 мВ/рН.

2. Для спектрофотометрических измерительных систем оптическую плотность можно рассчитать по закону Бугера-Ламберта-Бера. Это дает возможность проверить характеристики прибора, и некоторые стандарты требуют проведения такой проверки (Например, ISO 11732:2005 Water quality – Determination of ammonium nitrogen – Method by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection, ISO Geneva).

В большинстве физико-химических методов анализа зависимость между концентрацией и откликом измерительного прибора не является линейной. Например, в спектрофотометрических методах, такая зависимость фактически является логарифмической (Закон Бугера-Ламберта-Бера выполняется в ограниченной области концентраций, так как падает чувствительность измерительной системы). Это справедливо для большинства методов, основанных на измерении разных длин волн (рис.12.а).



а)

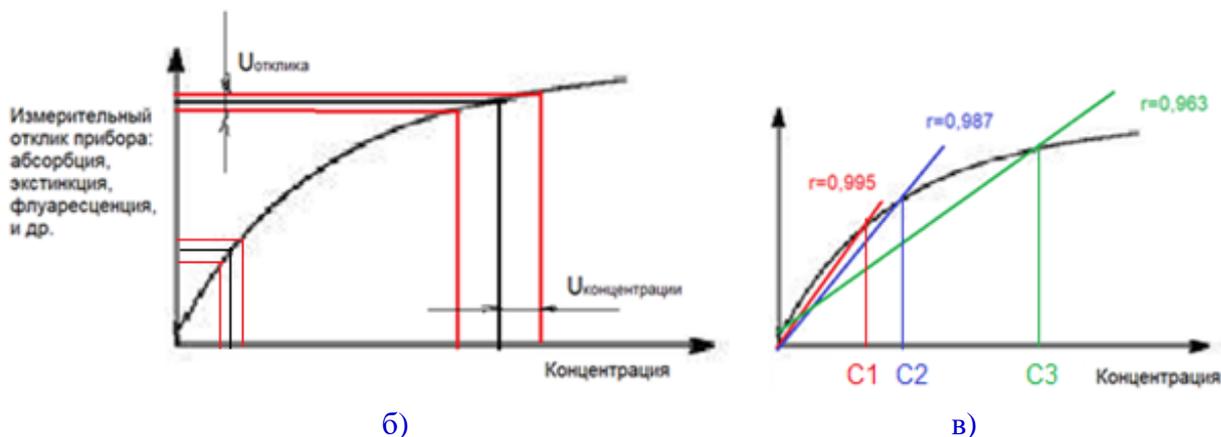


Рис.12 а) методы анализа в зависимости от длины волны электромагнитного излучения;

б) неопределенность измерений при нелинейной зависимости;

в) иллюстрация выбора диапазона линейной зависимости в зависимости от величины коэффициента корреляции.

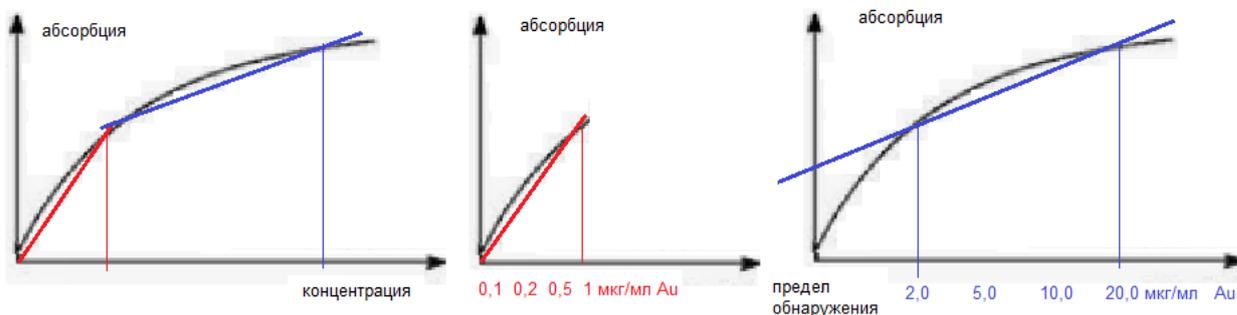
Падение чувствительности измерительной системы как раз связано с уменьшением наклона градуировочной зависимости (так называемый, “загиб” см. рис. 12. б). Это приводит к тому, что одна и та же неопределенность отклика, дает разную неопределенность концентрации при разной чувствительности прибора. Именно необходимость работать при одной и той же чувствительности прибора является причиной, по которой **категорически не рекомендуется использовать нелинейные зависимости при аналитических измерениях.**

На рис. 12 в хорошо видно, что линейную зависимость

В процессе валидации подбираются характеристики настроек приборов и диапазон концентраций, обеспечивающие удовлетворительный линейный отклик в необходимом диапазоне. Удовлетворительная линейность оценивается по коэффициенту корреляции r (или коэффициенту детерминации R^2 – квадрат коэффициента корреляция).

Как видно на рисунке 12 в), линейный диапазон часто не удается получить в пределах всего рабочего диапазона концентраций. В этом случае могут быть применены различные стратегии:

1. **Построение нескольких линейных градуировок в разных диапазонах, например:**



2. **Измерение более высоких концентраций, чем позволяет градуировочный график, с учетом разбавления анализируемых растворов**

Такой подход применяют как в видимой спектрофотометрии, так и при использовании методов ААС и АЭС. Строится график зависимости отклика от концентрации в пределах линейного диапазона. Анализ более высоких концентраций проводится с разбавлением анализируемой пробы.

Для валидации такого подхода, строится градуировочный график в области линейного диапазона концентраций (в таблице выделено серым). Затем готовится серия

растворов из стандартных образцов за пределами диапазона градуировочного графика. Для этого готовятся жидкие образцы с разным содержанием искомого анализа (от 3-х до 10 точек во всем диапазоне определяемых концентраций, из них от 4-х до 6 точек лежат в зоне калибровочного графика). Затем, все приготовленные растворы анализируются.

Ниже приведен пример определения золота ААС с применением ограниченного градуировочного графика.

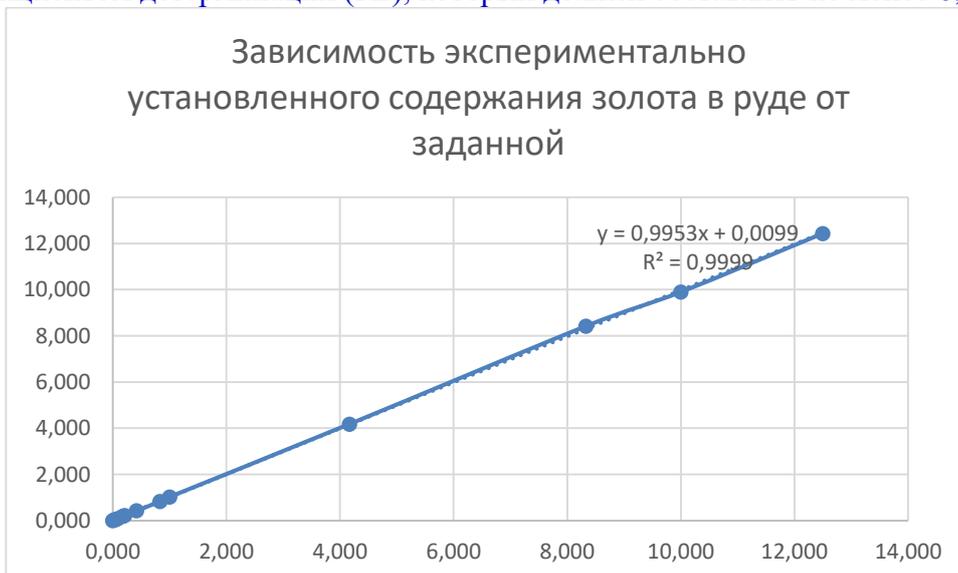
Расчеты в таблице ниже выполнены с учетом следующих пересчетов:

Концентрация раствора 10 мг/л Au соответствует

$$\frac{2,5 \text{ мл раствора}}{30 \text{ г навески}} \cdot 10 \frac{\text{мг}}{\text{л}} = 0,833 \frac{\text{г}}{\text{т}} \text{ Au в руде}$$

Градуировочный раствор	Ожидаемая величина (мг/л)	Измеренная величина (мг/л)	Фактор разбавления	Ожидаемое содержание в руде (г/т)	Фактическое содержание в руде (г/т)
			$\frac{V \text{ полученного раствора}}{V \text{ испытуемого раствора}}$		
Диапазон градуировочного графика					
Бланк (0)				0,000	0,000
Au-0.25	0,25	0,25	1	0,021	0,021
Au-0.5	0,5	0,52	1	0,042	0,044
Au-1	1	1,02	1	0,083	0,085
Au-2	2	2,06	1	0,167	0,172
Au-2.5	2,5	2,59	1	0,208	0,216
Au-5	5	5,05	1	0,417	0,421
За пределами градуировочного графика					
Au-10	10	9,95	2	0,833	0,829
Au-12	12	12,29	5	1,000	1,024
Au-50	50	50,11	10	4,167	4,176
Au-100	100	101,02	20	8,333	8,418
Au-120	120	118,70	50	10,000	9,892
Au-150	150	149,11	100	12,500	12,425

После этого, строится график зависимости экспериментально установленного содержания с учетом разбавления, и заданным содержанием. Линейность зависимости подтверждается коэффициентом детерминации (R²), который должен составлять не менее 0,99.



К процессу валидации относятся подбор необходимых установок прибора для обеспечения линейности градуировочной зависимости в пределах необходимого диапазона измерений:

Метод измерения	Эффект	Действия при валидации																														
Спектрофотометрия	Уменьшение толщины поглащающего слоя раствора увеличивает чувствительность измерений концентрации.	Подбор толщины кюветы с раствором.																														
Атомно-абсорбционная спектрометрия	<p>Поворот горелки атомно-абсорбционного спектрометра, позволяет менять длину поглащающего слоя и увеличивает динамический диапазон измерений. Изменение интенсивности лампы путем выбора длин волн для замера одного и того же элемента. (см. рисунок)</p> <table border="1" data-bbox="643 869 1310 1227"> <thead> <tr> <th colspan="3">H- (Cu) Atomic No. 29</th> </tr> <tr> <th>Flame type:</th> <td colspan="2">Air/Acetylene</td> </tr> <tr> <th>Wavelength (nm)</th> <th>Slit (nm)</th> <th>Conc (mg/L) for 0.2 Abs</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>324.8</td> <td>0.5</td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>327.4</td> <td>0.5</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>217.9</td> <td>0.2</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>222.6</td> <td>0.2</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>244.2</td> <td>1.0</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>218.2</td> <td>0.2</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>249.2</td> <td>0.5</td> <td>200</td> </tr> </tbody> </table> <p>В зависимости от ожидаемой концентрации раствора (mg/L) в пределах градуировочного графика для оптимальной абсорбции (0,2 Abs) выбирается длина волны (nm) которой соответствует ожидаемой концентрации.</p>	H- (Cu) Atomic No. 29			Flame type:	Air/Acetylene		Wavelength (nm)	Slit (nm)	Conc (mg/L) for 0.2 Abs	324.8	0.5	1.5	327.4	0.5	3	217.9	0.2	15	222.6	0.2	60	244.2	1.0	400	218.2	0.2	15	249.2	0.5	200	<p>Подбор угла поворота горелки, для увеличения определяемого диапазона концентраций. Выбор определяемой концентрации при оптимальной абсорбции.</p>
H- (Cu) Atomic No. 29																																
Flame type:	Air/Acetylene																															
Wavelength (nm)	Slit (nm)	Conc (mg/L) for 0.2 Abs																														
324.8	0.5	1.5																														
327.4	0.5	3																														
217.9	0.2	15																														
222.6	0.2	60																														
244.2	1.0	400																														
218.2	0.2	15																														
249.2	0.5	200																														
Атомно-эмиссионная спектрометрия	Излучение может регистрироваться перпендикулярно току газов плазмы (радиальный обзор). При радиальном обзоре достигается самая высокая верхняя граница линейного лиапазона измерений. Способ, при котором излучение регистрируется напрямую в центральном канале плазмы называется аксиальным (осевым) обзором. При аксиальном обзоре более низкий фон рассеянного излучения и увеличивается время экспозиции (время пролета частиц). За счет этого аксиальный обзор обеспечивает до 10 раз более низкие пределы обнаружения, по сравнению с радиальным обзором.	Спектр испускания элементов, как известно, является линейчатым. Поэтому в процессе валидации определяются длины волн соответствующих спектров испускания элементов, по которым будет регистрироваться наличие их в пробах. Для одного элемента могут использоваться линии, которые регистрируются при разных способах обзора, исключение интерференции линий спектров разных элементов при их одновременном определении.																														

Рассмотрение чувствительности измерительной системы во время валидации метода может быть ограничено обеспечением удовлетворительного, линейного отклика, регулярно достижимого в пределах требуемого диапазона концентраций.

Чувствительность должна оцениваться в процессе постоянной проверки калибровки путем построения контрольной карты коэффициента калибровочной кривой

$b = \text{tg}\alpha = \frac{dy}{dx}$. Если интенсивность отклика прибора падает, требуется уточнить как изменился tg угла наклона калибровочной прямой.

Нелинейные зависимости, их калибровочные графики

Кроме линейных градуировочных зависимостей, широко применяются нелинейные градуировочные зависимости, в нелинейных зависимостях применение линейной регрессии заменяется на нелинейные. Хотя, компьютерные системы позволяют оценивать как остатки нелинейной регрессионной модели, так и коэффициент корреляции нелинейной предсказанной зависимости, **чаще применяется линеаризация** с применением логарифмирования или другими методами.

ПРИМЕР: Определение антибиотиков с помощью ИФА метода выявления антител

Градуировка для определения тетрациклина имеет экспоненциальную зависимость

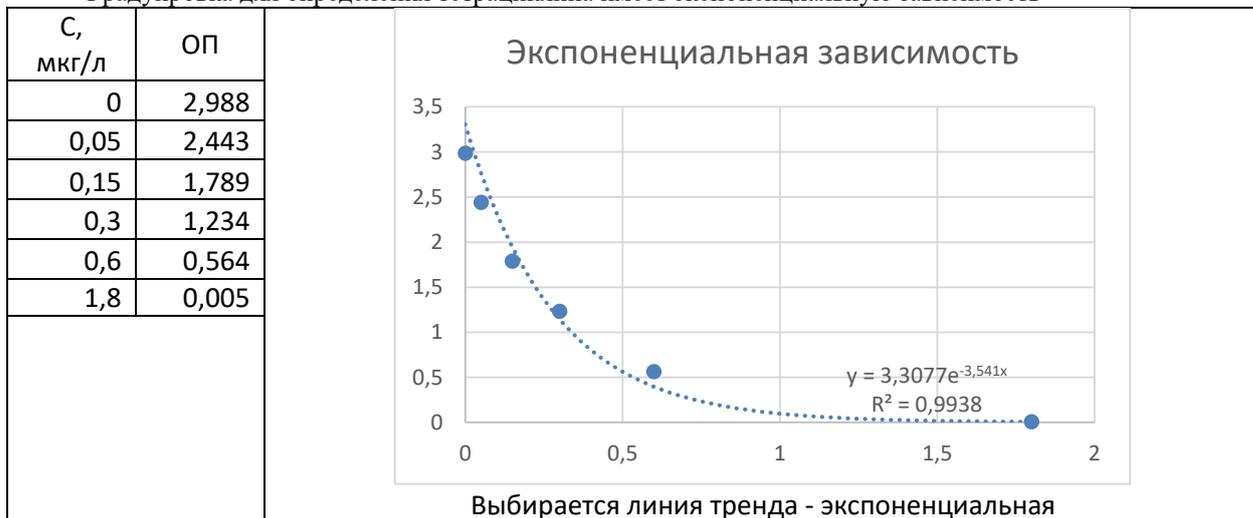
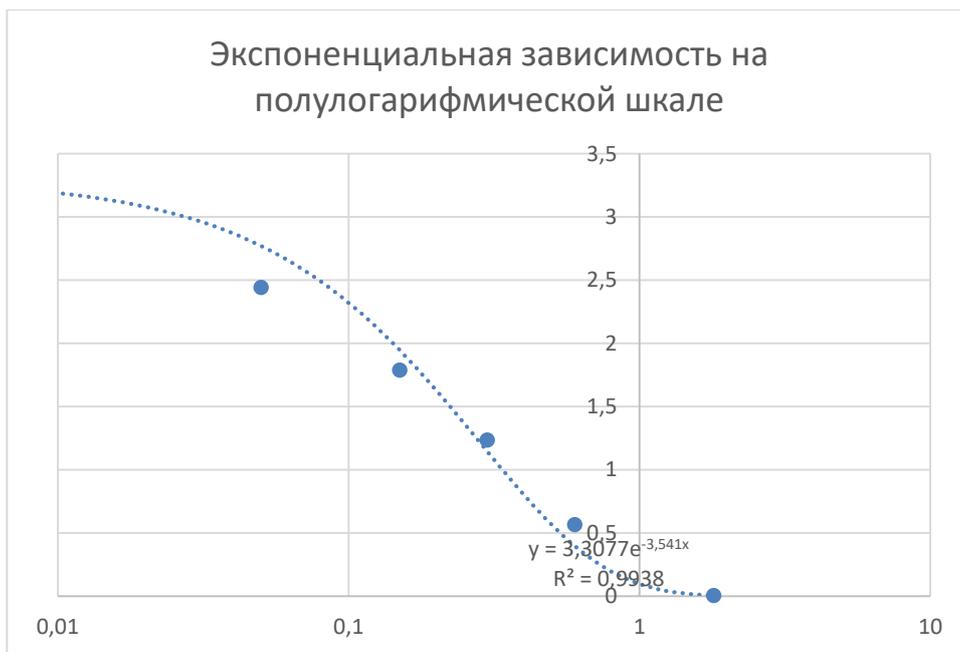
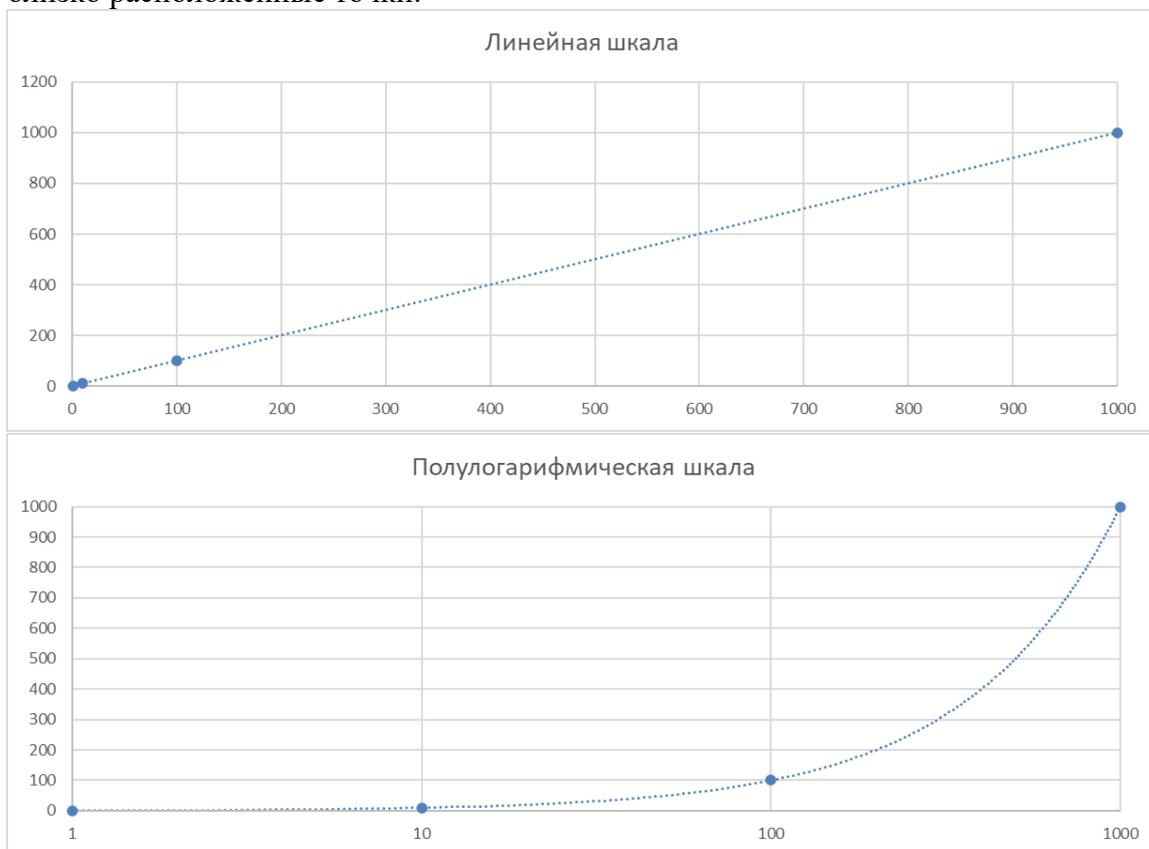


График может быть представлен на полулогарифмической шкале (тип оси указывается - логарифмическая). В полулогарифмическом масштабе график приобретает линейную зависимость в диапазоне концентраций тетрациклина от 0,01 до 1 мкг/л. Т.е. фактически происходит линеаризация зависимости $y = 3,3307 \cdot e^{-3,541x}$ до зависимости $\ln(y) = \ln(3,3307) - x \cdot \ln(3,541)$ из которого можно найти x .



Линейная шкала отличается от логарифмической тем, что на линейной шкале расстояние между двумя точками измеряется в разности координат точек, а в логарифмической шкале в разности степеней точек, т.е. в отношении координат точек. Поэтому, логарифмическая шкала, с одной стороны позволяет представить в одном масштабе далеко удаленные друг от друга точки, и по этой же причине хорошо различить близко расположенные точки.



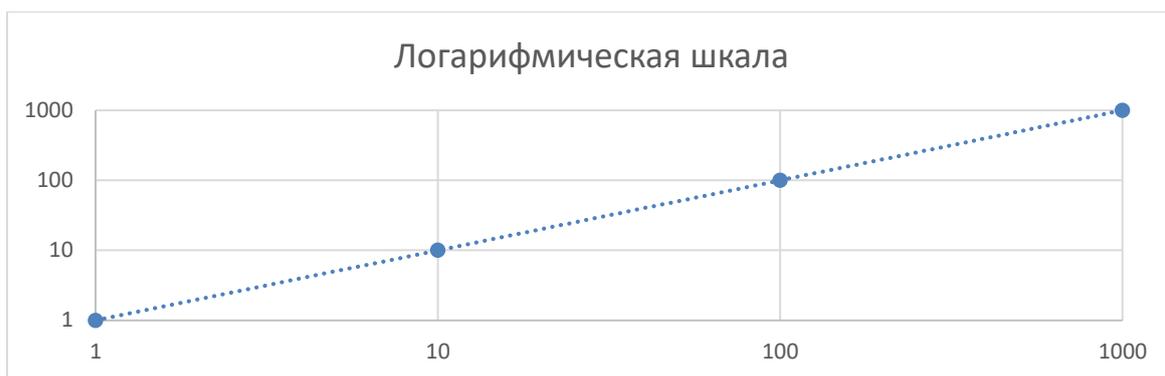


Рис.13 Линейный равномерный масштаб, полулогарифмический масштаб и логарифмический масштаб

Калибровка аналитических приборов. Линейная регрессия

Принцип калибровки аналитических СИ, таких как атомно-абсорбционные, атомно-эмиссионные анализаторы, хроматографы, фотометрические и спектрофотометрические средства измерений, является построение линейной градуировочной зависимости.

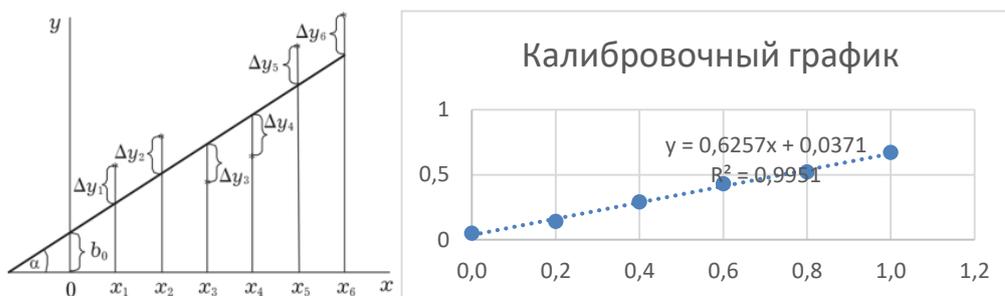


Рис.9. Линия регрессии и остатки

Методом наименьших квадратов строится линия регрессии $y=a+bx$. Построение регрессионной прямой (кривой) легко реализуется в MS Excel и здесь не рассматривается.

	A	B	C	D	E	G	H
	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
2	0,0	0,05	-0,50	0,2500	-0,30	0,0900	0,1500
3	0,2	0,14	-0,30	0,0900	-0,21	0,0441	0,0630
4	0,4	0,29	-0,10	0,0100	-0,06	0,0036	0,0060
5	0,6	0,43	0,10	0,0100	0,08	0,0064	0,0080
6	0,8	0,52	0,30	0,0900	0,17	0,0289	0,0510
7	1,0	0,67	0,50	0,2500	0,32	0,1024	0,1600
8	Сумма	3,0	2,10	0,00	0,7000	0,00	0,2754
9	Среднее	0,5	0,4				
	СРЗНАЧ(A2:A7)	СРЗНАЧ(B2:B7)	B2-\$B\$8	C2^2	C2-\$C\$8	E2^2	C2*E2

Принцип градуировки заключается в получении предсказанной зависимости $y=a+bx$, с помощью которой рассчитывается значение неизвестной концентрации по измеренному отклику прибора и вычисленным регрессионным коэффициентам

$$\hat{x} = \frac{y - a}{b}$$

Неопределенность самой линии регрессии оценивается стандартным отклонением остатков S_y .

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}}$$

Остатки – это разность между каждым фактическим значением отклика прибора и его предсказанным с помощью линии регрессии значением: $y_i - \hat{y}$.

Коэффициент детерминации равен квадрату коэффициента корреляции $R = r^2_{xy}$

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{cov(X, Y)}{s^2(x) \cdot s^2(y)}$$

Стандартные отклонения для точки пересечения а (интерсепты) и наклона b (угловой коэффициент прямой), в случае отсутствия корреляции градуировочных точек, и пренебрежимо малым стандартным отклонением самих приготовленных концентраций, можно рассчитать с помощью следующих формул:

$$S_a = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad S_b = \frac{S_y}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

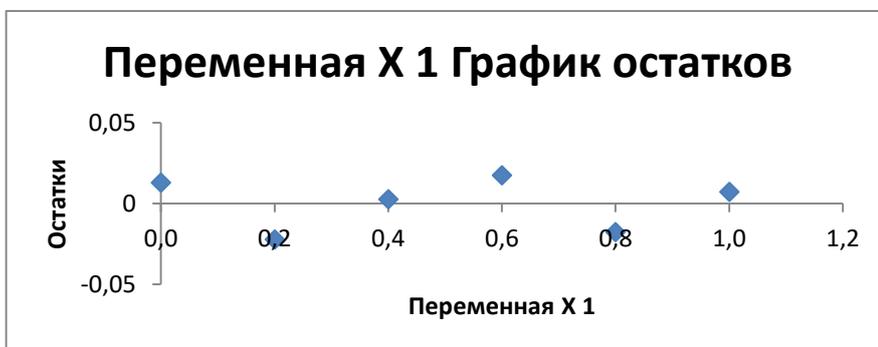
В химии, могут иметь место другие влияющие факторы, помимо, построения градуировочной зависимости, а также может иметь место корреляция градуировочных растворов. Способы оценки стандартных отклонений регрессионных коэффициентов приведены в специальных руководствах (например, Р 50.2.028-2003 Алгоритмы построения градуировочных характеристик средств измерений состава веществ и материалов. Алгоритмы оценивания погрешностей (неопределённостей)) и в настоящем руководстве не рассматриваются. Современные аналитические средства измерений, как правило уже содержат вложенный статистический пакет, который позволяет оценивать качество калибровки.

В MS Excel в меню Данные/анализ данных/регрессия легко реализуется построение линейной регрессии по методу наименьших квадратов. Рекомендуется установить флажок на опции “Остатки”, для вывода на экран кроме характеристик линейной регрессии графика остатков. Информация о качестве калибровки содержится в разделах

“R-квадрат” - R^2 , и

“стандартная ошибка”, которая представляет собой стандартное отклонение остатков S_y .

Ниже на рис.9 представлен график остатков для градуировочной зависимости в примере выше.



Кроме того важной частью калибровки таких систем является установление интенсивности отклика прибора и его соответствия установленным параметрам работоспособности.

Определение линейности применяется к калибровочному уравнению и, таким образом, охватывает только инструментальные измерения.

Для построения и определения, что градуировочная зависимость является линейной, необходимо шесть или более калибровочных растворов (включая холостую пробу);

- калибровочные растворы должны быть равномерно распределены по интересующему диапазону концентраций. В идеале различные концентрации должны быть приготовлены независимо, а не из аликвот одного и того же основного раствора,

- диапазон должен охватывать 0-150% или 50-150% вероятных концентраций, в зависимости от того, какая из этих концентраций является более подходящей;

- калибровочные растворы должны измеряться по меньшей мере в двух (лучше в 3-х) параллелях **в случайном порядке**.

Классическая регрессия наименьших квадратов, обычно реализуемая в MS Excel используется для установления уравнения связи между инструментальным откликом (y) и концентрацией (x), которая для линейной модели равна $y = a + bx$, где a = интерсепта, b = наклон линии, полученной методом наименьших квадратов. Стандартная ошибка регрессии (S_y) является мерой хорошего соответствия. Использование коэффициента корреляции, полученного из регрессионного анализа, в качестве критерия линейности может вводить в заблуждение.

Остатки также следует исследовать на предмет наличия признаков нелинейного поведения. Графики градуировки и остатков должны всегда строиться и проверяться, чтобы подтвердить линейность и проверить наличие выбросов.

Примечание: если дисперсия параллельных определений пропорциональна концентрации, следует использовать взвешенную регрессию, а не "классическую" (т. е. невзвешенную) регрессию.

Если связь не соответствует ожидаемой линейной модели в диапазоне исследования, необходимо либо устранить причину нелинейности, либо ограничить диапазон концентраций, охватываемый методом, чтобы обеспечить линейность (т.е. строить несколько линейных градуировочных графиков по диапазону концентраций вместо одного). Нелинейность на графики остатков будет выглядеть как отклонение точек остатков в одну сторону.

В целом диапазон калибровки должен охватывать только диапазон ожидаемых концентраций исследуемых образцов. Калибровка в более широком диапазоне концентраций, чем это необходимо, не дает никаких преимуществ, поскольку неопределённость измерений, полученная в результате калибровки, увеличивается с увеличением диапазона.

На основе последних исследований в рамках EURACHEM полученных в 2020 г, для проверки градуировочного графика **не может быть использован раствор**, приготовленный из одного калибровочного стандарта путем смешения остатков растворов для построения градуировочной зависимости, как это делалаи ранее, или любой раствор, приготовленный из исходного калибровочного стандарта.

Это связано с тем, что, если имеет место деградация концентрации исходного раствора, то за счет сниженного отклика прибора будет построена линейная зависимость, которая фактически будет давать заниженный результат. При этом ошибку можно будет обнаружить только путем сравнения с другим правильно хранимым калибровочным раствором или в программе проверки квалификации (рис.14).

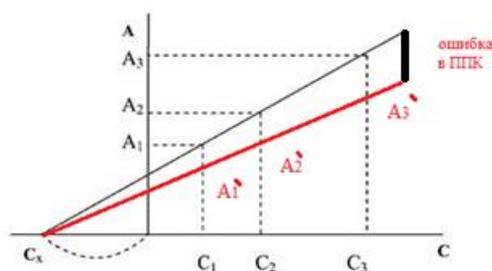


Рис 14. Иллюстрация изменения угла наклона калибровочной прямой при снижении концентрации градуировочных растворов.

Для постоянной проверки калибровки (Continuing Calibration Verification - CCV) требуются независимые стандартные образцы на уровне 50 % номинального значения калибровочной прямой. Сейчас появились предложения ведущих производителей референтных материалов в части стандартов постоянной проверки калибровки (Continuing Calibration Verification Standards). Использование этого контрольного раствора ежедневно перед началом и после окончания измерений, и нанесение полученных данных на график реализует доказательство сохранения калибровки прибора.

Если по результатам такой проверки среднее значение очередной точки превысит удвоенное значение стандартного отклонения воспроизводимости (линия 2s на контрольной карте), то это является сигналом к проведению очередной калибровки прибора.

Нужно понимать, что данная процедура является мониторингом стабильной работы прибора и сохранности его калибровки, и не является картой долговременной стабильности результатов анализа с учетом пробоподготовки. Также необходимо сравнивать интенсивности отклика при последующих калибровках (с применением контрольной карты), это может указать либо на деградацию раствора, либо на снижения эффективности детектирующей системы прибора.

Рабочий диапазон/Диапазон линейности

Рабочий диапазон обычно выводится из исследований линейности. Интервал измерения метода определяется как интервал между верхней и нижней концентрациями (количествами) аналита в образце, для которого было продемонстрировано, что метод имеет подходящие уровни прецизионности, правильности и линейности (т. е. результаты будут иметь приемлемый уровень неопределенности). "Рабочий диапазон" – это интервал, в пределах которого метод обеспечивает результаты с приемлемой неопределенностью. Снизу рабочий диапазон ограничен пределом количественного определения LOQ. Верхняя граница рабочего диапазона определяется концентрацией, при которой наблюдаются значительные аномалии аналитической чувствительности. Примером этого является эффект плато при высоких значениях оптической плотности в УФ/ВИЗ спектроскопии.

5. Правильность. Степень извлечения. Матричные эффекты

После определения диапазона, в котором применяется калибровочное уравнение, необходимо определить влияние матрицы на извлечение аналита. Как правило, проба содержит не только анализируемое вещество (аналит), но и другие компоненты (посторонние вещества, сопутствующие вещества). Компоненты матрицы могут иметь потенциал для изменения результатов или создания усиленного или подавленного отклика от детектора прибора.

Матричные эффекты, как известно, изменчивы по частоте возникновения и интенсивности, но некоторые методы особенно подвержены им (их интерференция может при данных обстоятельствах быть настолько велика, что восстановление аналита отклоняется от 100% в значительной степени). Например, в химических испытаниях усиление матрицы является хорошо известным случайным явлением при анализе остатков пестицидов с использованием газожидкостной хроматографии. В случае образцов со сложной и / или неточно известной матрицей - например, пищевых продуктов - особенно трудно оценить потенциальное влияние посторонних веществ на анализ (матричный эффект). В гематологических исследованиях необходимо учитывать гемолизированные, липемические и желтушные образцы.

Если матричные эффекты не проявляются, предпочтительно готовить калибровочные стандарты в виде простых растворов анализируемого вещества. Если матричные эффекты подозреваются, они могут быть исследованы путем внесения стандартных добавок аналита

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

к типичному раствору экстракта образца. Предлагаемое число определений для матричных эффектов по меньшей мере однократно или в двух экземплярах при каждой из 3 концентраций в каждом типе матрицы образца.

Для определения влияния матрицы на отклик прибора диапазон концентраций при стандартной добавке должен быть таким же, как и при калибровке без матрицы, так что наклоны обоих калибровочных графиков могут быть сопоставлены для получения существенной разницы. Если наклоны существенно не отличаются (<10%), то нет необходимости компенсировать матричные эффекты. Однако, следует отметить, что стандартная добавка не компенсирует аддитивные матричные эффекты.

Правильность измерения описывает близость между средним значением бесконечного числа повторных значений измеряемой величины и значением опорной величины. Отсутствие правильности указывает на систематическую ошибку. Смещение - это количественное выражение правильности метода. Правильность результата улучшается по мере уменьшения смещения.

Смещение результата измерения можно рассматривать как комбинацию смещения самого метода, лабораторного смещения и смещения, связанного с конкретным аналитическим циклом (аналитическая степень извлечения).

Для оценки смещения используют испытания на степень извлечения. Смещение измеряется путем обнаружения известного количества аналитического параметра, добавленного к образцу и включенного в метод анализа. После вычитания любого обнаруженного содержания рассматриваемого аналитического параметра в исходном образце без добавления, степень извлечения может быть рассчитана как процент от добавленного количества. Существенное отклонение от принятого опорного значения проявляется в высоком уровне смещения.

Для учета любых изменений между сериями смещение должно определяться в течение нескольких дней и предпочтительно во всем диапазоне измерений и, если применимо, с использованием подходящей комбинации различных образцов. Поскольку нельзя ожидать, что метод анализа будет иметь одинаковое смещение во всем диапазоне измерений, несколько уровней концентрации должны быть включены в определение смещения (по крайней мере одно определение на высоком уровне и низком уровне). В противном случае ООС должен быть в состоянии доказать, что используемый метод испытаний имеет одинаковую правильность во всем диапазоне измерений.

Если имеются сертифицированные стандартные образцы (CRM), соответствующие матрицам и значениям лабораторных образцов, они представляют собой наилучший вариант для оценки смещения. В идеале следует измерять несколько CRM с соответствующими матрицами и концентрациями аналита.

Однако для большинства методов испытаний подходящие CRM отсутствуют, и для оценки смещения требуются альтернативные варианты. Если подходящих CRM не имеется, степень извлечения может быть оценена путем анализа контрольных проб (при условии, что они соответствуют матрице с образцами, подлежащими испытанию, и достаточно характеризуются в отношении представляющих интерес аналитов). Материалы, характеризующиеся ограниченным совместным испытанием, могут быть пригодны для этой цели.

Если не имеется ни подходящих CRM, ни RMs, то смещение может быть исследовано путем анализа матричных заготовок или образцов, не подвергнутых обогащению и обогащенных (т. е. искусственно загрязненных) представляющим интерес аналитом в диапазоне концентраций. В этом случае степень извлечения (R) вычисляется из разницы между результатами, полученными до и после обогащения, в виде доли добавленного количества.

$$R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} * 100\%$$

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 48 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Где: c_1 = измеренная концентрация в образце с добавкой;

c_2 = измеренная концентрация в необогащенном образце;

c_3 = концентрация добавки;

Для некоторых испытаний, например, для анализа остатков пестицидов, ООС могут отбирать образцы, которые, как было установлено, не содержат обнаруживаемых остатков интересующего аналита (ов). Однако, для многих испытаний необходимо будет отбирать образцы, содержащие естественную концентрацию (концентрации) аналита (ов).

В таких случаях смещение оценивается по разнице между результатами, полученными для анализа образца в его обогатённом и исходном состояниях. Следует соблюдать осторожность при оценке смещения от анализа образцов с добавками, поскольку степень извлечения в этом случае, может быть лучше, чем для "родного" аналита или понесенными остатками/загрязнителями. Например, в то время как добавка фтора к питьевой воде позволит получить достоверную оценку извлечения, то же самое может быть неверно для добавки хлорорганических пестицидов в почву. Это в значительной степени связано с различной эффективностью экстракции почвы для "добавленных" и "нативных" аналитов. Если это возможно, то данные по извлечению добавок должны быть подкреплены какими-либо средствами; например, участие в испытаниях на квалификацию с использованием природных проб или проб с затравленными остатками/загрязнением.

В некоторых случаях для оценки погрешности ООС должны будут полагаться исключительно на данные степени извлечения с добавками или искусственным загрязнением. В таких случаях следует отметить, что, хотя 100% степень извлечения не обязательно указывает на правильность, плохая степень извлечения определенно указывает на смещение, или возможную недооценку общего смещения.

Референтный метод (обычно признанный международный или национальный стандартный метод) с известным смещением может также использоваться для исследования смещения другого метода. Типичные образцы, охватывающие диапазон матриц и концентраций аналита, соответствующих предлагаемым программам испытаний, анализируются обоими методами.

Значимость смещения метода испытаний может быть оценена с помощью статистического анализа (t-критерия, E_n) полученных результатов.

Степень извлечения определяется также для неинструментальных методов, чтобы определить, есть ли какие-либо матричные эффекты. Для неинструментальных методов степень извлечения определяется также путем выбора различных концентраций (низких, средних и высоких уровней) стандартов. Самый низкий уровень должен находиться примерно на пределе обнаружения, средний и высокий уровни - на один и два уровня выше соответственно (для повышения точности могут быть добавлены дополнительные промежуточные уровни).

6. Селективность/специфичность

Важно установить во время валидации метода, что метод испытания измеряет только то, для чего он предназначен. Другими словами, методы должны быть свободны от помех, которые могут привести к неверному результату.

Селективность метода это точность в присутствии мешающих влияний, таких как, примеси, разлагающие вещества и компоненты матрицы. Термины **селективность и специфичность** в аналитической химии часто **используются как взаимозаменяемые**. Термин "**специфический**" обычно относится к методу, который дает ответ только для **одного аналита**, в то время как термин "**селективный**" относится к методу, который обеспечивает ответы для **ряда объектов**, которые могут отличаться или не отличаться друг от друга. Если ответ отличается от всех других ответов, то метод считается избирательным. Поскольку очень немногие аналитические методы реагируют только на один аналит, использование термина селективность более уместно, чем специфичность.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 49 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Методы, использующие высокоспецифичные процедуры определения, такие как хроматография/масс-спектрометрия, обладают способностью быть очень избирательными. Однако на методы, основанные на колориметрических измерениях, может влиять присутствие окрашенных со-экстрактов образцов или соединений с химическими свойствами, сходными с анализируемым веществом. Хотя нецелесообразно рассматривать каждый потенциальный мешающий компонент, аналитики должны использовать свои знания и опыт для рассмотрения наиболее актуальных сценариев.

При необходимости воздействие потенциальных мешающих компонентов может быть проверено путем анализа проб, к которым были добавлены известные концентрации предполагаемых компонентов (достаточно одного анализа каждого из них). Это должно быть выполнено на образцах, содержащих аналит в диапазоне концентраций, ожидаемых на практике (одноточечные испытания приемлемы, но различные точки с различными количествами ингибитора добавляют больше данных о взаимодействии различных количеств вещества). Если метод предназначен для количественного определения более чем одного аналита, то каждый аналит должен быть испытан для обеспечения отсутствия помех. Необходимо провести исследование эффектов интерференции – усиливает ли присутствие мешающего компонента или препятствует обнаружению количественной оценки измеряемых величин. В принципе, необходимо разработать методы, обеспечивающие уровень селективности без существенных помех. Если обнаружение или количественная оценка значительно затруднены помехами, потребуется дальнейшая разработка метода, но незначительные эффекты могут быть допущены и включены в оценку смещения.

Так в методах неорганического анализа, например ICP, ААС, предназначенных для определения отдельных аналитов в растворе с множеством других аналитов, калибровка оборудования и последующая верификация должна быть выполнена на матрицах приближенных по составу к анализируемому, что обеспечивается приготовлением сложного раствора с известными концентрациями отдельных компонентов.

Для методов, требующих стадии подтверждения, например, для образцов с низкими концентрациями органических соединений (включая остатки пестицидов и другие органические загрязнители в пищевых продуктах и пробах окружающей среды, а также лекарственные средства и их метаболиты в тканях и жидкостях организма), требуется положительная идентификация следовых количеств органических соединений. 'Подтверждение' относится как к идентичности, так и к концентрации остатков. Подтверждение идентичности и концентрации аналита для положительных образцов может быть достигнуто с использованием другой системы обнаружения или колонки, или с использованием специальной системы обнаружения, такой как масс-спектрометрия или использование альтернативного аналитического метода (например, секвенирование ДНК; гель-электрофорез). В таких случаях также должна быть выполнена валидация подтверждающей методики.

При верификации матрицы проводят 6 испытаний спайкированных образцов на уровне целевой концентрации (ПДК).

7. Робастность

Робастность (мера устойчивости) метода к незначительным изменениям экспериментальных условий, описанных в методе, например, небольшие изменения температуры, pH, концентрации реагента, расхода, времени экстракции, состава подвижной фазы.

Каждый шаг в методе должен быть исследован, чтобы определить, в какой степени экологические, матричные, материальные или процедурные переменные могут влиять на оценку анализируемого вещества в матрице с момента сбора материала до времени анализа включительно.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 50 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Испытание устойчивости обеспечивает надежность методов во время нормального использования. Целью испытаний на устойчивость является выявление и, при необходимости, улучшение условий метода контроля, которые в противном случае могут привести к изменению результатов измерений, когда измерения проводятся в разное время или на разных установках.

Устойчивость исследуется путем измерения влияния небольших, планируемых изменений условий метода на среднее значение результатов. Испытание на устойчивость можно проводить, рассматривая каждый эффект отдельно, повторяя измерения после изменения определенного параметра на небольшое количество и соответствующим образом контролируя другие условия (тесты с одной переменной). Тем не менее, это может быть трудоемким, поскольку может потребоваться рассмотреть большое количество эффектов.

Как правило робастность определяется во время обширного межлабораторного эксперимента.

8. Стабильность

В дополнение к рабочим параметрам, перечисленным ниже, может также потребоваться оценить стабильность аналита **в матрице** при проведении валидационных исследований. Многие растворенные вещества легко разлагаются перед хроматографическими исследованиями (например, во время приготовления пробных растворов, экстракции, очистки, фазового переноса или хранения подготовленных пробирок в холодильниках или в автоматическом пробоотборнике). Вопросы, которые, возможно, необходимо будет рассмотреть, включают стабильность анализируемых веществ во время сбора и обработки проб, после длительного и краткосрочного хранения, а также после прохождения циклов замораживания и оттаивания и аналитического процесса. Условия, используемые в экспериментах по стабильности, должны отражать ситуации, **которые могут возникнуть при фактической обработке и анализе образцов**. Процедура должна также включать оценку стабильности аналита в исходных растворах.

При валидации стабильности образца в матрице обычно готовят 5 образцов со стандартной добавкой. Затем 1 часть анализируется сразу, вторая через 1, третья через 5, четвертая через 10 и пятая через 20 недель. Результаты сопоставляются.

При верификации стабильности образца в матрице, обычно также готовят 5 образцов со стандартной добавкой но, при этом создают разные возможные условия и сроки хранения образцов для измерения после пробоподготовки в конкретной лаборатории, это могут быть: условиях хранения в холодильнике/без холодильника, оставление растворов на ночь или на выходные на столе/ в холодильнике, в темном месте/на свету и др. Результаты сопоставляются, и для рутинного выполнения метода должны быть исключены условия, приводящие к разрушению образца более установленной степени извлечения.

II.2 ВЕРИФИКАЦИЯ РАНЕЕ ВАЛИДИРОВАННЫХ МЕТОДОВ

Верификация, это по своей сути, оценка применимости методики–экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для достижения тех целей, для которых она предназначена, и может быть корректно воспроизведена в условиях конкретного ООС.

По сути, ООС должен проверить возможно ли, что его операторы, использующие свое оборудование в своей лабораторной среде, могут применять метод и получить те же самые результаты, определенные в валидационных данных, представленных в стандартном методе.

Такие методы как ГОСТ, ASTM, USEPA, ISO и IP, уже прошли валидацию в ходе совместных исследований и признаны пригодными для целей, определенных в рамках данного метода.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 51 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

То же самое относится и к общепринятым методам, опубликованным в научной литературе, если они имеют данные о параметрах производительности.

Если ООС использует коммерческий испытательный комплект, в котором методология и реагенты не отличаются от инструкций изготовителя, то этот комплект не нуждается в независимой повторной валидации в ООС. Однако, документация на стандартизированные методы публикуемая органами стандартизации и признанными техническими организациями (например, бюро по стандартам МГС) и т.д. меняется.

В некоторых случаях отчет о валидации не является основой для метода анализа (например: некоторые ГОСТ не содержат характеристик функционирования), или характеристики функционирования не проверяются или проверяются только частично. **Если это так, то верификация возможности ООС использовать метод анализа непосредственно невозможна и необходима валидация.**

Незначительные модификации ранее валидированных внутренних методов (например, использование одного и того же типа хроматографической колонки от другого производителя, использование другой неселективной питательной среды, различия в деталях разведений образцов в результате ожидаемых количеств или незначительное изменение некритической температуры инкубации) также должны быть верифицированы, чтобы продемонстрировать отсутствие изменений в ожидаемом результате.

Ключевые параметры, которые следует учитывать в процессе верификации, будут зависеть от характера метода и диапазона типов проб, которые могут быть обнаружены. В процессе верификации должно использоваться статистически значимое количество выборок (**более 6**), которые должны охватывать весь спектр результатов для предполагаемого использования.

Измерение смещения и сходимости/воспроизводимости являются минимальными требованиями к методам, которые дают количественные результаты.

Для анализа следовых количеств веществ (т.е. при анализе контаминатов пищевых продуктов, низких содержаний аналитов в геологических пробах, для методов в которых ООС получает результаты «менее чувствительности метода») требуется также подтвердить, **что достижимый предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) соответствуют назначению.**

Если целью испытаний не является оценка соответствия результата испытаний ПДК, значительно превышающему LOQ (как правило в ПДК/LOQ как 10:1), и можно предполагать, что концентрация аналита в лабораторных пробах будет низкой, то LOD/LOQ необходимо регулярно контролировать (например, при определении золота пробирным методом с атомно-абсорбционным окончанием).

Целесообразно планировать эксперимент так, чтобы соответствующие характеристики изучались одновременно, обеспечивая экономию ресурсов ООС. Для оценки нескольких параметров допустимо использовать один и тот же массив экспериментальных данных.

Ниже приведены экспериментальные методы определения характеристик производительности методов **в целях верификации, в порядке, в котором следует проводить их определение.** Это связано с тем, чтобы **не проводить бесполезные исследования в том случае, если какие-либо параметры окажутся неприемлемыми.**

1.1 Предел обнаружения (LOD) (при необходимости)

Определяется для методов обнаружения следовых количеств веществ. Можно выбрать любой метод определения из предложенных выше. Если соотношение сигнал : шум окажется неприемлемым (3:1), то требуется ремонт или настройка прибора.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

1.2 Предел количественного определения (LOQ) (при необходимости)

В качестве предела количественного определения может быть использовано значение **3*LOD**. Полученное значение должно быть сопоставлено с критериями приемлемости.

Предел количественного определения для определенной матрицы и метода может варьироваться между участками проведения испытаний или в пределах одного участка, время от времени из-за различного оборудования, методов и реагентов. **Поэтому при смене оборудования, реагентов, метода пробоподготовки LOD и LOQ требуется переподтверждать (повторно проводить их определение).**

В том случае, если проводятся испытания на подтверждение содержания аналита ниже ПДК, в то время как в рутинных испытаниях не встречаются пробы с концентрацией ниже 0,5 ПДК, определение LOD и LOQ не требуется.

2. Линейность диапазона калибровки

При верификации, в отличие от валидации, линейный диапазон метода, как правило известен и установлен в НД на методику испытаний. Подтверждение линейности зависимости функции отклика от измеряемой концентрации в пределах установленного методикой диапазона концентраций является верификацией линейности.

Следующим этапом является построение градуировочной зависимости (градуировочного графика). Для построения и определения, что градуировочная зависимость является линейной необходимо шесть или более калибровочных растворов (включая холостую пробу), при этом должны быть соблюдены следующие условия:

- нижняя точка калибровки не может превышать предел количественного определения LOQ. **1-я точка \leq LOQ;**
- самая верхняя точка калибровки должна обеспечивать **150% ПДК;**
- калибровочные точки должны включать **80 и 120 % ПДК** (или другой линии принятия решения - требование тех. процесса и т. д.);
- калибровочные точки должны быть равномерно распределены по интересующему диапазону концентраций. В идеале различные концентрации должны быть приготовлены независимо, а не из аликвот одного и того же основного раствора (однако достаточно придерживаться процедуры приготовления калибровочных растворов, если она описана в методе);
- калибровочные растворы должны измеряться по меньшей мере в двух (лучше в 3-х) параллелях в случайном порядке (**не от меньших концентраций к большим и наоборот, а в разной, как рутинные пробы**).

Многие аналитические приборы снабжены коммерческими программами обработки данных, которые рассчитывают уравнение линейной градуировки, и связанные с ним дисперсии ошибок.

Если лаборатория не использует коммерческое программное обеспечение, то градуировочная зависимость может быть построена с использованием MS Excel (классическая или взвешенная регрессия). Взвешенная регрессия используется, если дисперсия параллельных определений пропорциональна концентрации.

Должно быть получено обычное градуировочное уравнение $Y = a + b \cdot X$;

Для спектрофотометрических методов может быть получено уравнение $Y = b \cdot X$

После получения градуировочной зависимости следует установить её приемлемость.

3. Повторяемость

Для первичного определения повторяемости метода повторяемость определяется в точках 50, 100 и 150 % ПДК (в рутинном количестве параллельных определений). Как правило определение повторяемости можно совместить с определением смещения и воспроизводимости.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 53 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

По полученным $\min 6$ (9) независимым результатам может быть рассчитано стандартное отклонение повторяемости S_r .

4. Воспроизводимость

Стандартное отклонение воспроизводимости может быть определено несколькими образцами, выполненными в серии, или как объединенное стандартное отклонение ряда многократных параллельных определений, выполненных в нескольких сериях (в течении нескольких дней).

Для первоначального определения воспроизводимости могут быть использованы те же концентрации, что и для определения повторяемости метода: 50%, 100%, 150% ПДК. Определение должно быть проведено в течении 3-х дней разными операторами. Определение воспроизводимости является логическим продолжением экспериментов по определению повторяемости и совмещено с определением степени извлечения.

5. Степень извлечения/смещение

Для оценки смещения используют испытания на степень извлечения. Смещение измеряется путем обнаружения известного количества аналитического параметра, добавленного к образцу и включенного в метод анализа.

Обычно для определения степени извлечения используют точки 50%, 100 и 150% ПДК. Для учета любых изменений между сериями смещение должно определяться в течение 3-х дней (см. выше), и таким образом, может быть совмещено с исследованием повторяемости и воспроизводимости. Средние значения концентраций, применяемых для расчётов смещения должны быть получены из результатов, повторяемость и воспроизводимость которых удовлетворяет критериям приемлемости (см. выше).

Для добавки наиболее приемлемо использовать сертифицированные стандартные образцы (CRM), соответствующие матрицам и значениям лабораторных образцов.

Если подходящие CRM не доступны, степень извлечения может быть оценена путем анализа RM или контрольных проб (при условии, что они соответствуют матрице с образцами, подлежащими испытанию, и достаточно характеризуются в отношении представляющих интерес аналитов).

Если не имеется ни подходящих CRM, ни RMs, то смещение может быть исследовано путем анализа матричных заготовок или образцов, не подвергнутых обогащению (проба без добавки) и обогащенных (проба с добавкой) представляющим интерес аналитом в указанном диапазоне концентраций. В этом случае степень извлечения (R) вычисляется из разницы между результатами, полученными до и после обогащения, в виде доли добавленного количества.

$$R = \frac{c_1 - c_2}{c_3} * 100\%$$

Где: c_1 = измеренная концентрация в образце с добавкой;

c_2 = измеренная концентрация в необогащенном образце;

c_3 = концентрация добавки;

6. Селективность/специфичность

При верификации метода исследование селективности не проводятся.

7. Робастность

В случае верификации стандартного метода, испытания на устойчивость не проводятся. Внутрелабораторные исследования воспроизводимости и стабильности по своей природе учитывают некоторые аспекты устойчивости метода.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 54 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

8. Стабильность

Для рутинного определения стабильности образцы с добавками на уровне 80, 100 и 120 % ПДК анализируются в параллелях со свежеприготовленными реактивами (1-й день), и после их 2-х дневного хранения в различных условиях: часть храниться в холодильнике, часть при комнатной температуре.

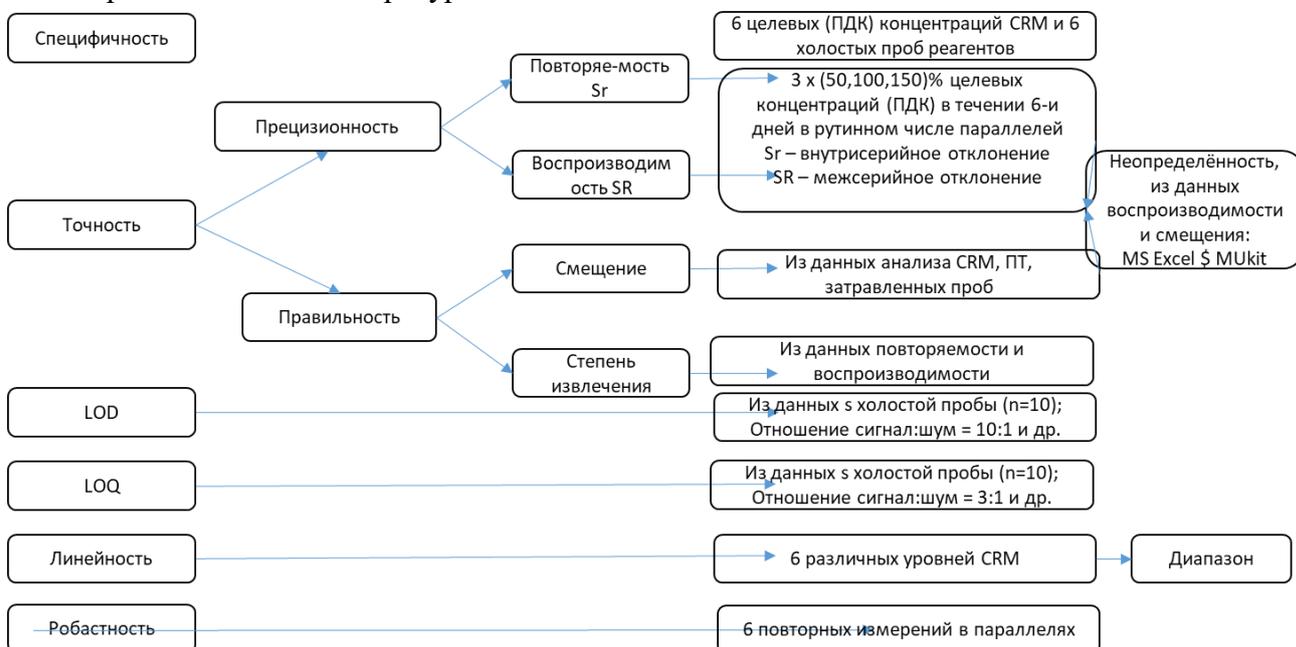


Рис. 14 План эксперимента по валидации метода содержания остаточных количеств хлорорганических пестицидов в пищевых продуктах (выполняется в течении 6 дней)

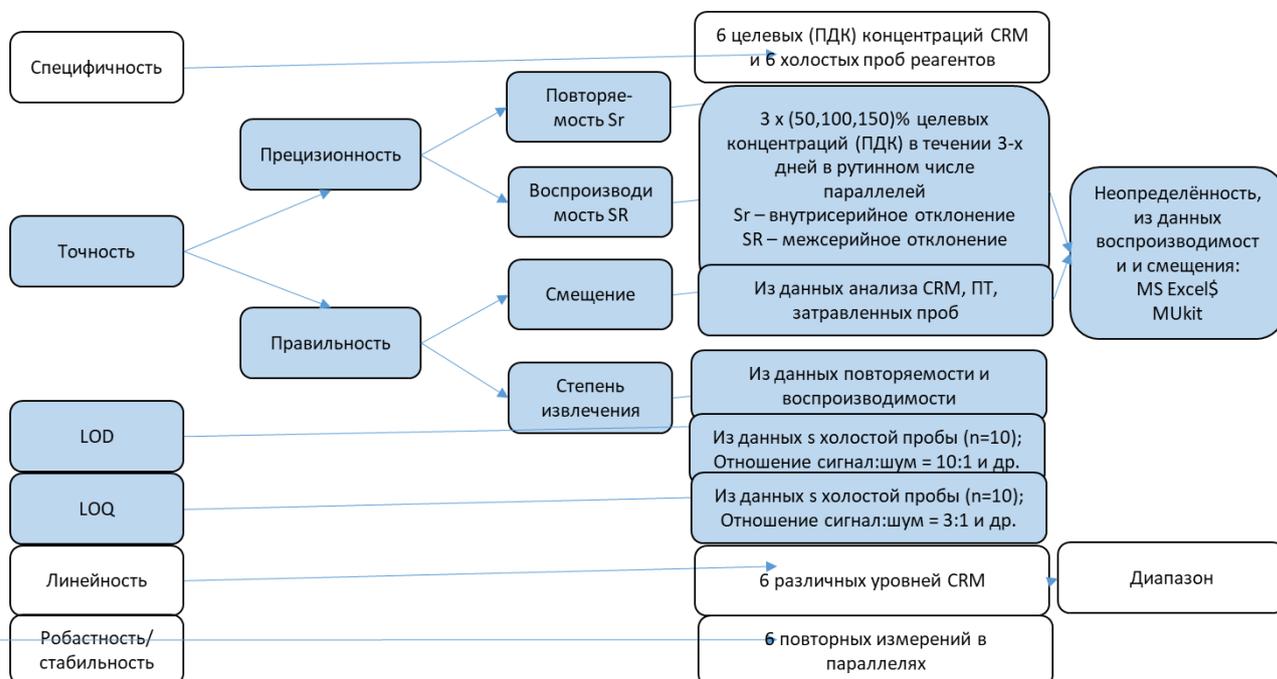


Рис. 15 План эксперимента по **верификации** метода содержания остаточных количеств хлорорганических пестицидов в пищевых продуктах – в целях верификации выполняются только исследования точности и LOD и LOQ (выделены серым). Выполняется в течении только 3-х дней. Через 2 дня определение повторяется с обоими партиями реактивов и образцов. Оценивается сопоставимость результатов и соответственно делается заключение о возможности и последствиях мягких нарушений метода испытаний.

В качестве факторов. Влияющих на стабильность могут быть использованы другие, связанные со спецификой метода факторы, а не температура хранения реактивов.

Ниже для сравнения приведены примеры схем валидации (рис. 14) и верификации (рис. 15) метода определения содержания остаточных количеств хлорорганических пестицидов в пищевых продуктах методом газовой хроматографии.

II. III КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

1. Критерии приемлемости повторяемости/воспроизводимости

В 1980 г Хорвитц [2], экспериментальным путём установил, что **прецизионность** аналитических методов **зависит только от концентрации**, а не от природы аналита (рис.16), исследуемого материала или метода /методики аналитического испытания, и определяется следующим эмпирическим уравнением:

$$PRSD_R = 2^{(1-0.5 \lg C)} \%$$

Концентрация аналита	Относительное стандартное отклонение воспроизводимости RSD_R	Минимальная расширенная неопределённость
100 %	2 %	4 %
10%	2,8%	5,6 %
1%	4,0%	8 %
0,1%	5,7%	11 %
0,01% (мг/кг)	8,0%	16 %
1ppm (мкг/кг, г/т)	16%	32 %
1ppb	45%	90 %
0,1ppb	64%	120 %

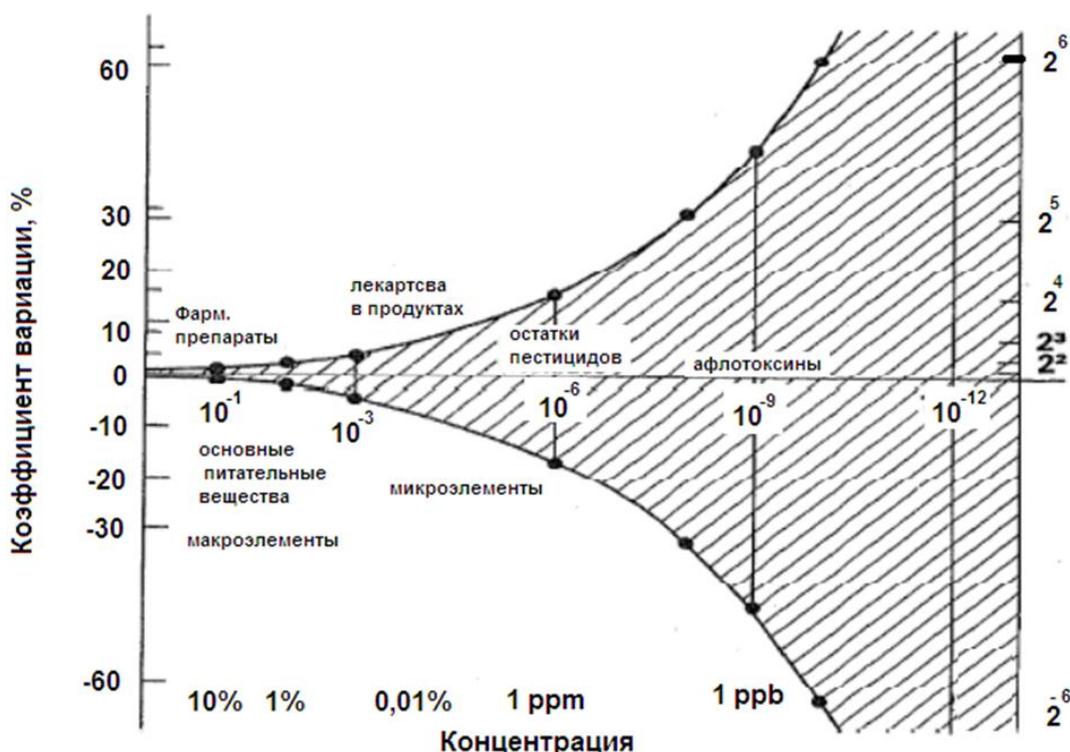


Рис.16 Зависимость стандартного отклонения воспроизводимости от содержания аналита в образце $PRSD_R$ является предсказанным относительным стандартным отклонением (коэффициент вариации, CV) в условиях воспроизводимости (R)
 С - концентрация аналита, выраженная в виде безразмерной массовой доли.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

Выше приведены результаты расчетов $PRSD_R$ и минимальной расширенной неопределённости для различных концентраций аналитов: Эти данные послужили критериями приемлемости для сходимости и воспроизводимости методов испытаний [2].

Индекс воспроизводимости Хорвица (Horrat index for reproducibility): Фактическое значение относительного стандартного отклонения воспроизводимости s_R (RSD_R) делённое на расчётное (предсказанное) значение стандартного отклонения воспроизводимости, определенное по уравнению Хорвица s_R ($PRSD_R$)

$$HorRat_R = \frac{RSD_R}{PRSD_R}$$

Индекс повторяемости Хорвица (Horrat index for repeatability): Фактическое значение относительного стандартного отклонения повторяемости s_r (RSD_r), делённое на расчётное (предсказанное) значение стандартного отклонения повторяемости, определенное по уравнению Хорвица s_R ($PRSD_R$) и скорректированное, условно принимая $r = 0,66 R$

$$HorRat_r = \frac{RSD_r}{0,66 * PRSD_R}$$

Если $HorRat$ равен $\ll 1$, появляется подозрение, что совместные испытания не были выполнены правильно, и были получены слишком высокие значения точности, (например, из-за меньшего количества участников или предшествующего знания содержания аналита).

$0,3 < HorRat < 1$ – прецизионность метода полностью приемлема в исследованном диапазоне и близка к прогнозируемому значению.

$1 < HorRat < 2$ - это тоже является приемлемым.

Если индексы Хорвитца $HorRat \gg 2$, аналитический метод, несомненно, будет работать хуже ожидаемого (например, из-за недостатков метода или из-за помех, контаминации или неоднородности образца) и прецизионность метода является неприемлемой [3].

4. Критерии приемлемости линейности калибровки

В качестве критерия линейности калибровки принят коэффициент детерминации связи (квадрат коэффициента корреляции) $R^2 < 0,98$ или коэффициент корреляции ($r < 0,99$). Данный показатель (или коэффициент корреляции) всегда сообщается коммерческим программным обеспечением и обеспечивается MS Excel. Для некоторых областей измерений данный показатель может отличаться от указанного.

5. Критерии приемлемости степени извлечения/смещения

Законодательством ЕС в соответствующих технических регламентах устанавливается приемлемая степень извлечения (например: афлотоксины 70...120 %).

Как правило, если не указано иное, то применим стандартный интервал исходя из перцентилей нормального распределения: 80...120 %.

В рамках ЕС принято [3, 4] оценивать смещение путём испытаний CRM на конкретной матрице. Результат испытания (среднее арифметическое значение) должен находиться либо внутри интервала расширенной неопределённости (отлично), либо расширенная неопределённости результата испытания и аттестованного значения CRM

должны частично перекрываться (приемлемо). Данная формулировка фактически отражает тот факт, что E_n индекс < 1

$$E_n = \frac{X_{lab} - X_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

В соответствии с [7], результаты ПТ часто выражают значением не E_n , а z или ζ , индекса, поэтому критерием приемлемости в данном случае будет служить $|z| \leq 3, |\zeta| \leq 3$.

6. Специфичность не определяется в процессе верификации методов

7. Робастность не определяется в процессе верификации методов

8. Критерии приемлемости стабильности метода

В том случае, если возникает необходимость экспериментально подтвердить (например, применение ИСО методов для анализа содержания контаминатов в пищевых продуктах), что незначительные отклонения от процедуры анализа или пробоподготовки действительно не влияют на результаты испытаний, то это может быть продемонстрировано с помощью тех же критериев, что и приемлемость степени извлечения/смещения.

Параметры производительности	Критерии приемлемости
1. Предел обнаружения (LOD) (при необходимости)	Законодательные требования $0,3*LOQ$
2. Предел количественного определения (LOQ) (при необходимости)	Законодательные требования, $0,1*ПДК$; ($0,2*целевой\ концентрации$)
3. Повторяемость (сходимость)	HorRat <2 (в отдельных случаях могут быть оговорены значения индексов Хорвица менее 2). В первом приближении могут быть использованы характеристики повторяемости и воспроизводимости методов испытаний.
4. Воспроизводимость	
5. Диапазон линейности	Коэффициент детерминации $R^2 \geq 0,98$ (может быть установлен законодательно)
6. Степень извлечения	значение $ E_n < 1$ фактор $ \zeta \leq 3, z \leq 3$.
7. Селективность, специфичность	Не определяется
8. Устойчивость / робастность	Не определяется
9. Стабильность (при необходимости)	Мягкие отклонения в технике метода не должны приводить к значимому смещению на основании значение $ E_n < 1$ фактор $ \zeta \leq 3$.

9. Оценка неопределённости измерений

На основании результатов валидации / верификации метода испытаний может быть рассчитана его неопределённость. Для оценки неопределённости измерений могут быть использованы различные подходы:

– **аналитический подход (подход снизу вверх)** изложенный в GUM [9], и в Руководстве EURACHEM по оцениванию неопределённости в количественном химическом анализе [10],

- **глобальный подход (подход сверху вниз, метод валидации в одной лаборатории)**, изложенный в ГОСТ Р ИСО 21748 — 2012 [41]; NORDTEST 537 [11].

- на основе межлабораторного эксперимента.

Однако, **наименее трудоёмким и предпочтительным является глобальный подход, так как могут быть использованы уже имеющиеся данные верификации/валидации метода испытаний.** Данный подход может быть реализован MS Excel, MUKit или любыми другими коммерческими программами.

III. ВАЛИДАЦИЯ / ВЕРИФИКАЦИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ

К качественным относятся методы по результаты которых выражаются по номинальной шкале (вид организма, характеристическая длина волны, характерный обломок молекулы), по бинарной шкале (методы бинарной классификации) – обнаружено/не обнаружено; выдерживает испытания/ не выдерживает испытания. Качественные методы могут быть инструментальными и субъективными. В настоящей главе рассматриваются подходы для верификации качественных инструментальных методов.

Для методов медицинских исследований подход валидации, основанный на методе бинарной классификации применяется для определения как диагностических эксплуатационных характеристик метода, так и для клинических эксплуатационных характеристик метода.

III.1 МЕТОДОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Качественные результаты испытаний, **основанные на численном результате**, например, основанные на пороговых значениях, часто описываются как полуколичественные. Валидация таких методов будет проводиться как валидация или верификация **качественных методов с подтверждением предела обнаружения.**

Для качественных методов, требуется проводить сравнительную валидацию:

- с количественными методами,
- с существующими проверенными качественными методами;
- сравнения с известными результатами.

Для проведения исследования требуется провести испытания заданного числа положительных (спайкированных) проб и отрицательных (холостых) проб. Результаты располагают в следующую таблицу.

		Исходные условия		
		Положительные	Отрицательные	
Результаты теста	Положительные	Истинно положительные	Ложно положительные	Прогностичность положительного результата
	Отрицательные	Ложно отрицательные	Истинно отрицательные	Прогностичность отрицательного результата
		чувствительность	специфичность	Воспроизводимость

				Точность
--	--	--	--	----------

Для валидационных исследований методов (тест-систем) в этом случае требуется минимально 100 результатов (иногда более: 150-200).

Рисунок ниже, демонстрирует получение истинных и ложных результатов.

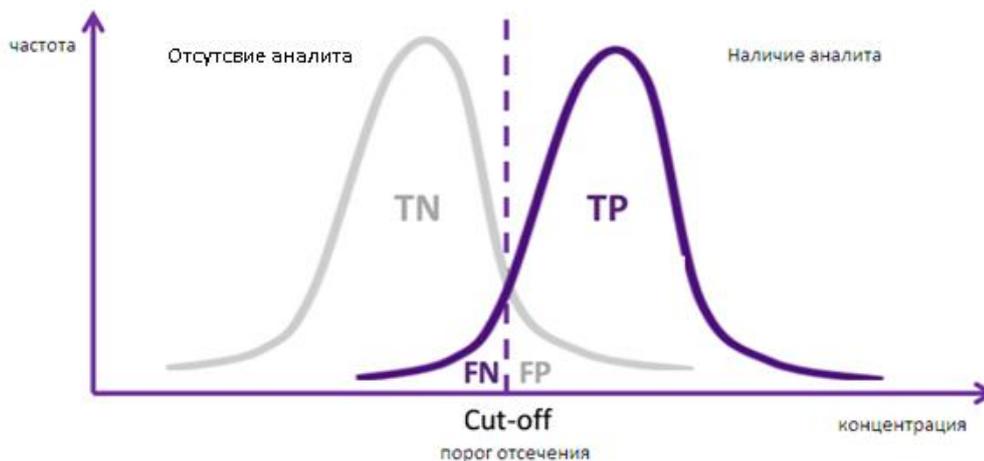


Рис.17 Иллюстрация получения результатов качественными методами

P – positive – положительные;

N – negative – отрицательные;

TN – true negative – истинно отрицательные;

FN – false negative – ложно отрицательные;

TP – true positive – истинно положительные;

FP – false positive – ложно положительные.

Уровень концентраций при котором получают 50% ложно отрицательных и ложно-положительных результатов называется порогом отсеечения «cut-off» (ОП крит. в ИФА анализах).

Если в качестве заданных значений используют один и тот же положительный и отрицательный образцы, то определяют **аналитические эксплуатационные характеристики**: аналитическую специфичность, аналитическую чувствительность, прецизионность.

Если в качестве заданных значений используют образцы разных пациентов/животных (положительные – с подтвержденным наличием заболевания) и отрицательные (с подтвержденным отсутствием заболевания), то используя тот же самый статистический инструмент определяют **клинические (диагностические) эксплуатационные характеристики**: клиническая чувствительность, клиническая специфичность, прогностичность положительного результата, прогностичность отрицательного результата.

При верификации тест-систем требуется верифицировать **только аналитические эксплуатационные характеристики**.

III. II ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПЛУАТАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

1. Чувствительность (см. п. 1.6 раздела 2.1)

Для качественного метода **чувствительность** определяется как способность метода **правильно идентифицировать долю истинно положительных результатов**.

$$\text{чувствительность} = \frac{\text{истинно положительные результаты}}{(\text{истинные положительные результаты} + \text{ложные отрицательные результаты})}$$

2. Специфичность (см. п.7 раздела 2.1)

Специфичность метода определяется как способность метода правильно идентифицировать **долю истинно отрицательных результатов**.

$$\text{специфичность} = \frac{\text{истинно отрицательные результаты}}{(\text{истинные отрицательные результаты} + \text{ложные положительные результаты})}$$

Методы с низкой специфичностью дают большое количество ложно положительных результатов.

В дополнение к чувствительности и специфичности, особенно для тест-систем медицинского назначения, может быть определена прогностичность положительного результата (PPV) и прогностичность отрицательного результата (NPV).

3. Прецизионность (см. п. 3 раздела 2.1)

Для качественных методов **воспроизводимость** или **точность** метода определяется как отношение истинно положительных результатов ко всем положительным результатам (как истинным, так и ложным).

Воспроизводимость 100% означает, что измеренные значения точно совпадают с заданными значениями.

$$\text{Воспроизводимость} = \frac{\text{Число истинно положительных}}{\text{Число истинно положительных} + \text{ложно положительных}}$$

Иногда пользуются другой характеристикой – находят отношения всех правильно предсказанных результатов (как положительных так и отрицательных) к сумме всех результатов теста.

Сводная таблица для расчёта валидационных характеристик методов бинарной классификации*

		Заданные значения		PPV и PVN определяются только для клинических валидационных характеристик
		P	N	
Результаты теста	P	TP	FP	$PPV = \frac{TP}{TP + FP} * 100\%$
	N	FN	TN	$PVN = \frac{TN}{TN + FN} * 100\%$
		Чувствительность $\frac{TP}{TP + FN} * 100\%$	Специфичность $\frac{TN}{TN + FP} * 100\%$	Воспроизводимость $\frac{TP + TN}{TP + FP + TN + FN} * 100\%$ или $\frac{TP}{TP + FP} * 100\%$

*В случае определения клинических эксплуатационных характеристик сравнение осуществляется не с положительными образцами, а с выборкой пациентов/**животных**, с подтвержденным заболеванием или его отсутствием [40].

В дополнение к чувствительности и специфичности, в этом случае определяются также прогностичность положительного результата (PPV) и прогностичность отрицательного результата (NPV).

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

4. Прогностичность положительного результата (PPV) – это доля истинно положительных результатов из всех результатов, выявленных как «положительные» Прогностичность положительного результата отвечает на вопрос: "если результат теста положительный, насколько хорошо это предсказывает фактическое присутствие, аналита в образце? Или иначе «Если результат теста положительный, какой риск оказаться заболевшим?»

5. Прогностичность отрицательного значения (PVN) - определяется как частота совпадения отрицательных результатов теста с действительным отсутствием аналита в образце. Данный критерий, таким образом, показывает, насколько велика вероятность того, что результат действительно отрицательный, если результаты исследования отрицательные.

Чувствительность и специфичность не зависят от популяции в том смысле, что они не меняются в зависимости от того, какова доля положительных и отрицательных результатов исследования. **Поэтому чувствительность можно определять, проверяя только положительные случаи.** (см. ниже верификацию качественных методов).

Однако, значения прогноза зависят от популяции. Поэтому в случае скрининговых медицинских (и других) тестов следует определять применимость тестов к конкретной популяции (диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность для населения республики/региона и т.д.).

III. III ВЕРИФИКАЦИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ

Для верификации качественных методов (качественные методы ИФА, качественные микробиологические методы и др.) **достаточно 20 спайкированных образцов на уровне несколько выше чувствительности метода и 20 холостых образцов.** Из полученных результатов рассчитываются чувствительность, специфичность и воспроизводимость и сравниваются с характеристиками метода (тест-системы).

Иногда, достаточно подтвердить только чувствительность метода (тест-системы): в этом случае достаточно использовать только 20 положительных образцов. Если получено 19 положительных из 20 истинно положительных результатов, то чувствительность метода > 95%.

III. IV ОЦЕНКА ЭКСПЛУАТАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК КАЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ, ВЫРАЖЕННЫХ ПО ПОРЯДКОВОЙ ШКАЛЕ

Для методов исследований, при которых результаты выражаются по порядковой шкале, оценка прецизионности может быть выражена как пропорция ожидаемых результатов по принятой их классификации: "отрицательные", "1+", "2+", "3+". Эти пропорции имеют 95%-ный доверительный интервал, рассчитываемый на основе статистических таблиц. При сопоставлении групп с низкой ("1+") или среднеповышенной ("2+") концентрацией аналитов могут быть получены более точные результаты, чем при сопоставлении с группой с высокой концентрацией ("3+"), которая не имеет четко ограниченного верхнего предела.

Оценка правильности исследований может быть основана на градациях отрицательных и положительных результатов с установлением порога обнаружения и порога подтверждения (на основе сравнения с результатами, полученными при параллельных исследованиях количественным методом).

ПРИМЕР: Приемлемая правильность определений с помощью полуколичественных тест-полосок характеризуется долей ложноположительных результатов на уровне менее 10% при пороге обнаружения и долей ложноотрицательных результатов также на уровне менее 10% при подтверждении. В серой зоне (между

порогами обнаружения и подтверждения) доля ложноотрицательных результатов должна сохраняться на уровне менее 30% [22].

Например, на рисунке ниже видно, что положительный результат переходит в сомнительный и затем в отрицательный при разведениях положительной сыворотки 1:35 и 1:45, что подтверждает ее предел обнаружения (пороге подтверждения) сыворотки 1:40.



Позитивная сыворотка (переход 1:40)

Разведение 1:10	●	●	●
Разведение 1:20	●	●	●
Разведение 1:30	●	●	●
Разведение 1:40	●	●	●
Разведение 1:45	●	●	●
Разведение 1:55	●	●	●
Разведение 1:60	●	●	●

Негативная сыворотка (все негативные)

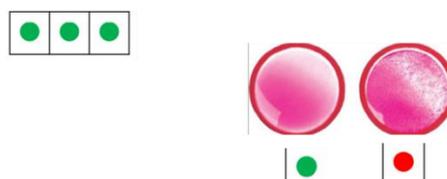


Рис.18 Схема верификации метода диагностики бруцеллеза по реакции РБП (Роз Бенгал проба).

Кроме описанного выше, при верификации и при рутинном контроле качества должны быть поставлены реакции бланков: контроль антигена, контроль сыворотки и спонтанная реакция – которые должны быть отрицательные.

IV ВАЛИДАЦИЯ СУБЪЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ

Субъективный метод тестирования - это метод, в котором опыт и знания аналитика (ов) или эксперта(ов) являются важным фактором, определяющим, соответствуют ли образцы или испытуемые изделия определенным критериям. В этом случае оценка основана на качественных данных и опыте человека в интерпретации этой информации. Валидация таких методов является более сложной и менее строгой, чем для аналитических измерений. К субъективным методам, например, относятся органолептические методы, методы прямой и люминисцентной микроскопии клеток или личинок/цист паразитов.

Параметры валидации, такие как линейность или предел обнаружения, не имеют отношения к субъективным методам.

VI ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ПАРАМЕТРЫ СУБЪЕКТИВНЫХ МЕТОДОВ

К субъективным методам исследования относят органолептические методы испытаний, методы микроскопии в микробиологии и паразитологии, различные виды экспертиз, например, почерковедческая экспертиза.

Основной отличительной чертой **субъективных качественных методов** исследования является отсутствие объективной регистрации результатов с использованием

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

измерительных приборов или средств фиксации результатов. Значения показателей определяются путём анализа визуального восприятия персонала на основании имеющегося у него опыта. В таких методах могут быть оценены эксплуатационные параметры повторяемость/воспроизводимость (т. е. надежность) и/или потенциальная частота ошибок.

Валидация таких субъективных качественных методов состоит из 3-х этапов:

- первый – это определение межэкспертной и внутриэкспертной надежности, потенциальной частоты ошибок (где приемлемо);
- второй – анализ возможных ошибок, риска их появления;
- третий - разработки системы мер для их минимизации.

Несмотря на то, что большинство субъективных методов часто не включают информацию об их надежности, фактически определяемая надежность составляет порядка 70-90%. Поэтому, как правило, субъективные методы включают систему мер для снижения вероятности ошибок. Описанные стандартные методы паразитологических и микроскопических исследований, **даже если в них не установлены характеристики надежности, не нуждаются в валидации.**

При верификации субъективных методов, как правило, достаточно определения межэкспертной и внутриэкспертной надежности и декларирования системы мер, предусмотренных для минимизации ошибок, так как такие меры часто уже разработаны, и могут включать:

- Совместные упражнения

Участие в совместных упражнениях, таких как внутрилабораторные и межлабораторные сравнительные испытания, имеет важное значение для определения пределов применения методов (например, пересмотр положительных мазков макроты на наличие палочки Коха). Это также является важным источником определения частоты ошибок.

- Контроль качества

Любой субъективный тест должен иметь встроенные процедуры контроля качества. Методы испытаний должны включать процедуры для включения отрицательного и положительного контроля, когда это возможно. Например, результат субъективного теста может быть проверен другими компетентными аналитиками, где это практически возможно. Проверка должна проводиться без доступа к мнению первого аналитика. Результаты такой проверки могут быть сопоставлены для демонстрации надежности метода.

- Подтверждение компетентности персонала

Реальная цель валидации субъективных методов заключается в проверке вероятности получения истинного результата с помощью метода, о котором идет речь. Субъективные тесты по своей природе являются качественными оценками. Экспертные знания аналитика - это жизненно важные компоненты. Поэтому валидация должна в значительной степени зависеть от проверки компетентности эксперта.

Необходима постоянная проверка компетентности.

- Уровень приемлемости метода испытания

Хорошо зарекомендовавшие себя и принятые методы испытания не всегда требуют одинакового уровня валидации метода. Соответствующие соображения могут включать в себя вопрос о том, была ли данная методика подвергнута экспертной оценке рецензированию и публикации в признанном журнале. Существуют ли стандарты на данный метод контроля. Была ли эта методика испытана в реальных полевых условиях (а не только на ООС), если это применимо?

Примером предпринимаемых мер в области микроскопии, могут быть:

- ежедневные постановки положительных и отрицательных **контрольных** мазков,

- приготовление контрольных мазков вместе с рабочими в процессе ежедневного рутинного анализа. Для этой цели как правило применяются определенные менее вирулентные культуры микроорганизмов, например *Mycobacterium fortuitum* вместо *Mycobacterium tuberculosis*, так как она окрашивается также как последняя;
- пересмотр 10% или каждой положительной пробы вторым аналитиком;
- отправка положительных проб (или какой-либо их части) в лабораторию более высокого уровня.

В области паразитологии, и других областях определения живых организмов, требуется иметь консервированные музейные экспонаты на разных стадиях жизненного цикла паразитов (в данном случае речь идет только о тех стадиях, которые должны дифференцироваться в процессе исследования/испытания, а не стадии всего жизненного цикла организма). Музейные экспонаты должны включаться в регулярные процедуры контроля качества.

1-й этап: Внутриэкспертная и межэкспертная надежность

Субъективные методы тестирования можно считать действительными, если аналитик или эксперт неоднократно получает правильные результаты для положительных и отрицательных известных тестов. Доказательства **прецизионности** могут включать в себя предоставление доказательств:

- Уровень согласия между двумя разными аналитиками или экспертами, которые оценивали одни и те же доказательства в процессе выполнения конкретного метода (т. е. межаналитическая или меж-экспертная надежность);
- Уровень согласия одного и того же аналитика или эксперта, который оценил одни и те же доказательства в процессе выполнения конкретного метода, но в разное время (т. е. интра-аналитик или внутри-экспертная надежность).

Другие формы надежности, которые следует учитывать, включают внутреннюю согласованность теста (т. е. внутреннюю надежность), а также эквивалентность альтернативных оценочных тестов (т. е. параллельных форм).

В тех случаях, когда порядковая шкала является ограниченной, например от 1 до 2, 3-х или 4-х, то в этом случае применение статистических подходов становится невозможным и более приемлемым становится использования определения вероятности обнаружения и/или потенциальной частоты ошибок.

Для определения внутриэкспертной и межэкспертной надежности, определяют долю (процент) совпадений результатов теста для для каждого эксперта (внутриэкспертная надежность) и между разными экспертами (межэкспертная надежность).

Пример 1: серологические исследования



Пример 2:микроскопия

Время	Число повторов для каждого эксперта											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Число экспертов											% совпадений у каждого лаборанта	% не совпадений у каждого лаборанта
Лаборант 1												
Лаборант 2												
...												
% совпадений между лаборантами												
% несовпадений между лаборантами												

$$\% \text{ совпадений} = \frac{\text{число совпадений}}{10} * 100\%$$

$$\% \text{ несовпадений} = 100 - \% \text{ совпадений}$$

По горизонтали считается внутриэкспертная надежность метода, а по вертикали – межэкспертная надежность метода.

Полученные результаты усредняются по горизонтали и отдельно по вертикали. Если, процент совпадений не достигает 100 (как правило для микроскопии он намного ниже), требуется меры по минимизации влияния на выдаваемый результат.

Число совпадений у одного лаборанта в разные дни необходимо сравнить с числом совпадений остальных, если число совпадений одного или 2-х лаборантов относительно остальных является низким – компетентность этого одного или 2-х является недостаточной.

Низкое число совпадений между лаборантами свидетельствует о плохо воспроизводимой процедуре исследования – просматривается недостаточное количество полей зрения или окраска сделана неверно и др.

Поэтому после определения фактической межэкспертной и внутриэкспертной надежности требуется определить меры, которые помогут увеличить надежность метода и снизить влияние несовпадений на выдаваемый результат.

В некоторых случаях субъективные тесты имеют разработанную количественную (порядковую) шкалу показателей в баллах, например от 1 до 10, на основании которой строится профиль испытуемого объекта [25]. В процессе валидации характеристики профиля, полученные разными экспертами вносят в таблицу и оценивают их сопоставимость с помощью соответствующих статистических методов. Данные профиля не поддаются просто статистической оценке, следовательно, необходимо разработать план эксперимента с целью проведения статистического анализа. Как правило, используется однофакторный (или более) дисперсионный анализ (ANOVA), например:

Образец для исследования	Эксперт 1	Эксперт 2	Эксперт 3		
1	X_{11}	X_{12}	X_{13}	СКО между экспертами	Среднее стандартное отклонение – представляет собой уровень согласия между экспертами
2	X_{21}	X_{22}	X_{23}	СКО между экспертами	
3	X_{31}	X_{32}	X_{33}	СКО между экспертами	
4	X_{41}	X_{42}	X_{43}	СКО между экспертами	
m	X_{m1}	X_{m2}	X_{m3}	СКО между экспертами	
Образцы одинакового качества	Стандартное отклонение результатов внутри группы	Стандартное отклонение результатов внутри группы	Стандартное отклонение результатов внутри группы	$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$ <p>Так как балльные оценки условные, лучше получить относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) $CV = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100\%$</p>	
	Среднее стандартное отклонение -внутри-экспертная надёжность				

Рис.19. Пример схемы однофакторного дисперсионного анализа

2-й этап: Вероятность обнаружения и / или потенциальная частота ошибок

При валидации субъективных качественных методов испытания, должна быть рассмотрена вероятность обнаружения (POD) и потенциальная частота ошибок. **Чувствительность и селективность** также должны рассматриваться как критические эксплуатационные характеристики для **качественных методов идентификации**.

Частота ошибок (риск несовпадения результатов) и вероятность обнаружения ошибок POD выражается в процентах или баллах.

Вероятность обнаружения ошибок (POD) - это вероятность того, что методология метода испытания позволит правильно определить измеряемую величину.

Эмпирическое определение POD для новых ситуаций является не всегда практично из-за нехватки времени, испытательных образцов и других ограниченных ресурсов. Физические модели могут представлять полезную альтернативу эмпирическому определению для количественной оценки POD в ситуациях, когда данные ограничены, но могут учитываться не все факторы и источники изменчивости. Статистические методы могут быть использованы для количественной оценки и корректировки систематических отклонений и источников изменчивости, которые не учитываются в физической модели.

Следовательно, объединение физических моделей с эмпирической корректировкой потенциально может обеспечить работоспособное решение.

Потенциальная частота ошибок, часто определяемая через участие в проверках квалификации (ППК), фактически представляет собой “уровень достоверности” проверки гипотезы и уровень статистической значимости результатов испытаний. У нее нет единого определения. **Потенциальная частота ошибок** может означать:

- долю ложноположительных результатов в процентах - когда ложноположительные значения делятся на комбинацию истинных отрицательных и ложных положительных значений (см. верификацию методов бинарной классификации);

- долю ложноположительных значений в процентах, когда процент ложных положительных значений делится на комбинацию истинных положительных и ложных положительных значений (см. верификацию методов бинарной классификации);

- или любое количество различных возможностей, которые могут сильно различаться даже в пределах одной выборки.

3-й этап: анализ риска и предпринимаемые меры – рассматривается в отдельном разделе, так как может применяться также для других видов методов.

VI. II АНАЛИЗ РИСКОВ И ПРЕДПРИНИМАЕМЫЕ МЕРЫ

При первичной валидации субъективных методов и качественных методов физико-механических испытаний для разработки необходимых мер снижения рисков возникновения ошибок, проводится анализ рисков возникновения ошибок. Это включает в себя идентификацию всех возможных источников ошибок и вариаций процесса. После того, как определены источники ошибок, их влияние на процесс должно быть оценено.

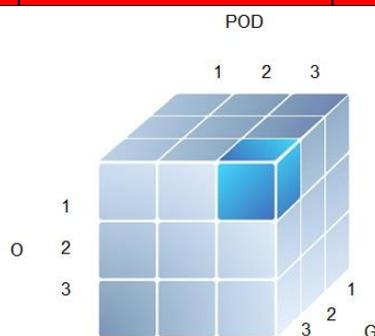
Вероятность обнаружения (POD), возможность возникновения проблемы (O), и тяжесть результирующего последствие (G) должны быть оценены. Затем можно рассчитать критический параметр (C)

$$C = \text{POD} * O * G,$$

который представляет собой количественную меру критичности каждого возможного источника несоответствия. **Параметры POD, O, G оценивают, например, по бальной шкале**

POD Вероятность обнаружения		O - возможность возникновения ошибки		G - последствия	
1	Легко обнаружить	1	Реже чем 1 раз в неделю	1	отсутствуют
2	Сложно обнаружить	2	Возникает 1 раз в неделю	2	Неверные результаты, которые не влияют на оценку соответствия
3	Практически невозможно обнаружить	3	Возникает в каждой серии (ежедневно)	3	Неверное заключение о соответствии

	1	2	3
1			
2			
3			



Кубическая матрица рисков

Затем, на основании кубической матрицы рисков можно провести градацию параметра C, например, всего по 2-м категориям: критичные ошибки и некритичные ошибки.

Произведение $C = \text{POD} * O * G$		Критичность каждого источника ошибок
От 1 до 8	$1*1*1$ $1*2*1$ $1*2*2$ 1 2 4 $2*2*2$ $1*2*3$ 8 6	Не критично
От 12 до 27	$2*2*3$ $2*3*3$ $3*3*3$ 12 18 27	Критично

Затем анализируются возможные источники ошибок по установленным критериям, и определяются те из-них, которые являются критичными.

Соответствующие решения могут быть предложены для каждого возможного идентифицированного источника несоответствий, для снижения критического параметра (С). Это может быть сделано, либо путём улучшения обнаруживаемости проблемы (и снижения коэффициента POD) и / или уменьшением вероятности возникновения проблемы (и уменьшения коэффициента O). Расчет критического значения фактор (С) может быть выполнен снова, после выполнения выбранных улучшений.

ПРИМЕР: Верификация метода ГОСТ 32091-2013 Посуда керамическая. Метод определение термостойкости.

1. Определение внутри-экспертной и меж-экспертной надежности

Ниже в таблице приведено количество обнаруженных дефектов после нагревания и резкого охлаждения посуды, обнаруженных аналитиками.

№ п/п	Дата проведения	Партия образца	1-й спец.		2-й спец.		Разность / среднее число (X)
1	10.04.2022	1-партия	M1	2 трещины	C1	1 трещина	1 / 1,5
2	11.04.2022	1-партия	M2	1 трещина	C2	1 трещин	1 / 1
	Разность / средняя (X)			1 / 1,5		1 / 1	
3	12.04.2022	2-партия	M3	3 трещины	C3	2 трещины	1 / 2,5
4	13.04.2022	2-партия	M4	2 трещины	C4	1 трещины	1 / 1,5
	Разность / средняя (X)			1 / 2,5		1 / 1,5	

Внутри-экспертная надежность: Отношение разности числа дефектов, получаемых одним и тем же специалистом в один и тот же день к среднему числу определенных дефектов в процентах %.

$$ВЭН = \frac{|M1-M2|}{X} \cdot 100\%$$

	Дата	Результаты	Средняя
1-й спец	10.04.-11.04.	2-1 / 1,5 • 100% = 66%	68%
	12.04.-13.04.	3-2 / 2,5 • 100% = 40%	
2-й спец	10.04.-11.04.	1-1 / 1 • 100% = 100%	
	12.04.-13.04.	2-1 / 1,5 • 100% = 66%	

Меж - экспертная надежность: Отношение разности числа дефектов, получаемых разными специалистами в один и тот же день к среднему числу определенных дефектов в процентах %

$$МЭН = \frac{|M1-C1|}{X} \cdot 100\%$$

Дата	Результаты	Средняя
10.04.22	2-1 / 1,5 • 100% = 66%	68%
11.04.22	1-1 / 1 • 100% = 100%	
12.04.22	3-2 / 2,5 • 100% = 40%	
13.04.22	2-1 / 1,5 • 100% = 66%	

2. Анализ рисков возникновения ошибок и определение дополнительных принимаемых мер для их снижения $C = O \cdot G \cdot POD$

Каждый параметр

- возможность возникновения ошибки (O);
- тяжесть последствий (G) - каковы последствия того что посуда будет по термостойкости неправильно интерпретирована;
- вероятность обнаружение ошибки (POD)

оценивается по соответствующим разработанным ООС шкалам

Значимость риска (O • G)	Вероятность обнаружение ошибки (POD)
--------------------------	--------------------------------------



Возможная частота (O)		Тяжесть последствий (G)		Оценка	Вероятность
Оценка в баллах	Оценка частоты	Оценка в баллах	Тяжесть последствий		
1-не возникнут	-	1	Никаких	1	Можно обнаружить
2-маловероятно	Раз в год	2	Может расколоться	2	Возможно не обнаружить
3-возможно	Раз в месяц	3	Может расколоться в руках человека, без причинения повреждений	3	Не возможно обнаружить
4-вероятно	Раз в неделю	4	Может расколоться в руках человека, с причинением повреждений		
5-очень вероятно	Каждое исследование	5	Раскалывание критичное		

Также разрабатывается шкала обычной оценки значимости риска ($O \cdot G$)

		Тяжесть последствий (G)				
		1 незначительные	2 минимальные	3 средние	4 критичные	5 очень сильные
Возможность возникновения ошибки	1 не возникнут	1	2	3	4	5
	2 маловероятно	2	4	6	8	10
	3 возможно	3	6	9	12	15
	4 вероятно	4	8	12	16	20
	5 очень вероятно	5	10	15	20	25

И шкала критического параметра при испытаниях $C = (O \cdot G) \cdot POD$

		Вероятность обнаружение ошибки (POD)		
		1 - Можно обнаружить	2 - Возможно не обнаружить	3 - Не возможно обнаружить
	1	1	2	3
	2	2	4	6
	3	3	6	9
	4	4	8	12
	5	5	10	15
	6	6	12	18
	8	8	16	24
	9	9	18	27
	10	10	20	30
	12	12	24	36
	15	15	30	45
	16	16	32	48
20	20	40	60	
25	25	50	75	

Также принимаются значения критического параметра при испытаниях, при которых следует принимать меры.

Критический параметр при испытаниях ($O \cdot G \cdot POD$)	Значимость критического параметра (C)
1-9	Пренебрежимо
10-30	Умеренный
32-75	Критический

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

После этого по указанной шкале оценивается критический параметр для конкретных испытаний (С) и в случае необходимости, разрабатываются дополнительные меры по контролю или недопущению ошибок.

№ п/п	Возможная ошибка при исследованиях	Возможность возникновения ошибки (O)	Тяжесть послед. (G)	Вероятность обнаружение ошибки (POD)	Значимость риска (C)	Предпринимаемые меры
1	Не полный осмотр	3	2	2	12 – умеренный	Разработка методик осмотра посуды
2	Ошибки при идентификации трещин при визуальном осмотре	3	2	1	6 – пренебрежимо	Просмотр 2-мя спец-ми

V МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Дополнительные термины, применяемые для микробиологических испытаний

Микробиологическое испытание (microbiological testing) [1] - испытание образцов на микроорганизмы и может применяться во всех областях испытаний (например, в области биологических, ветеринарных, медицинских испытаний и в некоторой степени в области судебно-медицинской и химической экспертизы). Микробиологические методы включают микроскопические, микробиологические, серологические, клинико-диагностические, иммуноферментные методы исследования, также включая методы обнаружения ДНК.

Референтный метод (referencemethod) [16] – принятый на международном уровне и широко применяемый стандартный метод. Референтные методы как правило изложены в международных или региональных стандартах (ИСО, ГОСТ, фармакопейные статьи и др.).

Альтернативный микробиологический метод (alternativemethod) [16] - микробиологический метод, обеспечивающий оценку того же показателя качества, что и соответствующий референтный метод.

Целевой микроорганизм (target microorganism) [32] - микроорганизм или группа микроорганизмов, выявление и подсчет которых проводят.

Нецелевой микроорганизм (non-target microorganism) [32] - микроорганизм, который подавлен средой и/или условиями инкубирования или который не демонстрирует признаков, характерных для целевого микроорганизма.

Чистый штамм (тест-штамм, музейная культура микроорганизмов) (Pure Strain)- чистый штамм относится к потомкам одной изоляции в чистой культуре и обычно состоит из последовательности культур, в конечном счете полученных из одной колонии. Чистая культура - это культура клеток или многоклеточных организмов, растущих в отсутствие других видов или типов. Чистая культура может происходить из одной клетки или одного организма, и в этом случае клетки являются генетическими клонами друг друга.

Инокуляция — искусственное заражение, внесение живых микробов, водорослей или грибов в питательную среду.

Производительность питательной среды (productivity of culture medium) [32] - степень роста целевого микроорганизма на питательной среде при определенных условиях.

Селективность питательной среды (selectivity of culture medium) [32] - Степень ингибирования нецелевого микроорганизма на или в селективной питательной среде при определенных условиях.

Элективность (специфичность) питательной среды (electivity of culture medium, specificity of culture medium) [32] - Демонстрация при определенных условиях того, что нецелевые микроорганизмы не проявляют те же визуальные характеристики, что целевые микроорганизмы.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

Референтные методы в микробиологии основаны на культивировании роста микроорганизмов. Валидация таких методов является широкомасштабным исследованием, в которое вовлекается большое количество (более 20) лабораторий по всему миру. Ситуация осложняется тем что испытываемые штаммы микроорганизмов являются патогенными, что затрудняет их транспортировку. Метод первичной валидации референтных методов детально описан в стандарте [26].

Валидация референтных методов требуется только при разработке принципиально новых методов, и в том случае, **если метод применяется к матрицам, не указанным в области применения стандартного метода**. Также требуется валидация альтернативных методов, включая методы не основанные на культивировании роста микроорганизмов (обнаружение АТФ, ПЦР и др.). Для сравнительной валидации альтернативных микробиологических методов доступен подробный стандарт ИСО [16], а также в стандартах [27-31], поэтому в настоящем документе рассматриваются только общие положения и не рассматриваются подходы к валидации.

На рисунке 20 представлена схема принятия решений относительно валидации/верификации микробиологических методов.

Нужно понимать, что понятие «стандартный референтный метод» будет иметь разный смысл в зависимости от экономического сообщества для потребностей которого проводятся испытания. В международном масштабе такие методы представлены стандартами ИСО. В рамках ЕАЭС это могут быть другие методы (ГОСТ, МУ, МУК и др.). Однако, что очень важно, методы, представленные в этих документах, если они не являются идентичными стандартам ИСО (надпись «IDT» после обозначения международного стандарта) **не признаются стандартными референтными методами за пределами ЕАЭС**. Так, например, согласно регламенту Европейского союза ЕС № 2073/2005 от 15.11.2005, статья 5 «Использование других микробиологических методов возможно только если они валидированы по отношению к референтному».

Кроме этого, проблема заключается ещё и в том, что стандартные методы, изложенные в стандартах ГОСТ, МУ и МУК очень часто **не содержат эксплуатационных характеристик**.

Это обстоятельство обязывает проводить валидацию таких методов для обеспечения возможности их применения за пределами ЕАЭС. Фактически же сложность и объемность валидационных исследований приводят к необходимости для микробиологических испытаний использовать стандартные референтные методы **везде, где это возможно**.

Требуется отметить, что валидация микробиологических методов как референтных, так и альтернативных, является задачей разработчика. Тогда как, пользователи методов должны только подтвердить, что метод правильно выполняется в лаборатории, т.е. провести верификацию.

Для микробиологических лабораторий, работающих для потребностей ЕАЭС рекомендуется тем не менее проводить **минимальный объем верификационных исследований для любых применяемых методов**.

Верификация микробиологических методов проводится в реальных условиях испытаний в конкретной лаборатории с применением конкретного оборудования, питательных сред и определённым персоналом.

V.I. ВЕРИФИКАЦИЯ РЕФЕРЕНТНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Специфичность, селективность и чувствительность референтных микробиологических методов определяются **культуральными средами**. Поэтому определение этих характеристик относится не к методу в целом, а к культуральным средам [32]. Поэтому верификации референтных микробиологических методов состоит из комплекса мероприятий по подтверждению эксплуатационных характеристик питательных

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 72 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

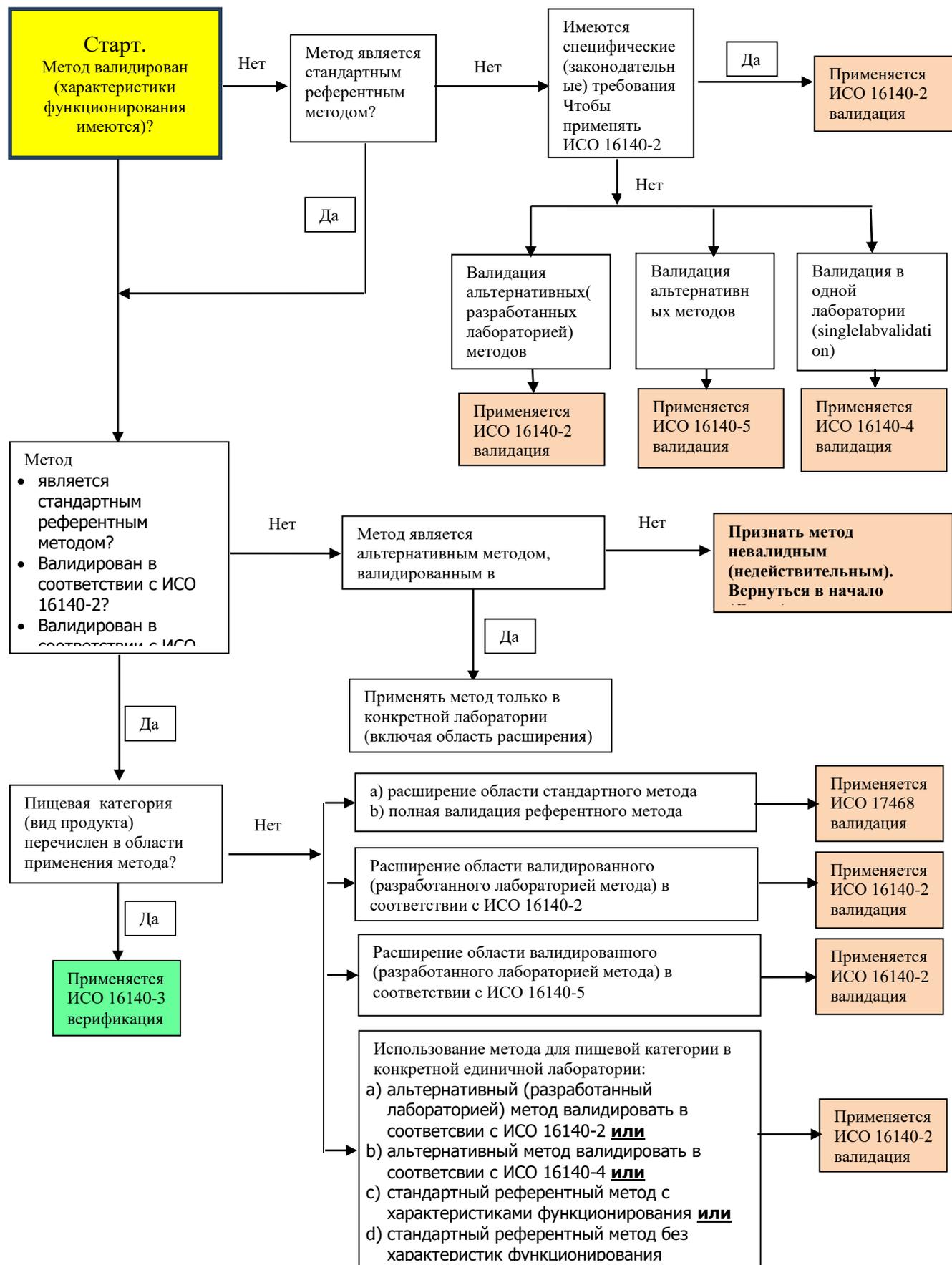


Рис.20 Схема принятия решений о валидации/верификации микробиологических методов сред, который проводится регулярно, а также разового определения других эксплуатационных показателей для выполнения метода.

У.П ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Питательные среды играют ключевую роль в любой микробиологической лаборатории для выделения, идентификации и тестирования чувствительности различных патогенов. Большинство лабораторий обычно готовят питательные среды или покупают готовые к использованию среды у коммерческих поставщиков для рутинной диагностики и исследовательских целей [42].

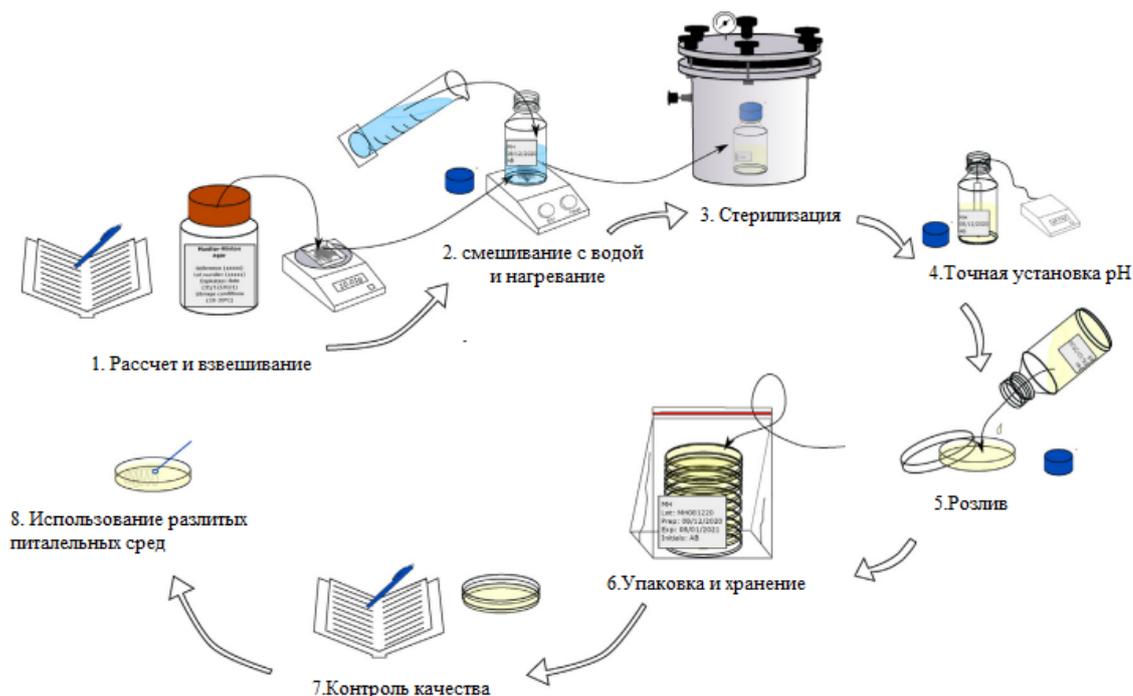


Рис. 21 Приготовление обезвоженной агаровой среды без добавок. [42].

Обратите внимание, что приготовление среды может быть прервано только на следующих этапах:

- (а) для неселективных агаровых сред без добавок колбу можно хранить в виде затвердевшего агара после автоклавирования и повторно расплавлять позже;
- (б) чашки с разлитым агаром можно оставить закрытыми на столе для просушки на ночь (при условии, что в лаборатории нет насекомых), а упаковка для хранения проводится на следующий день.

Перед применением питательных сред, требуется убедиться, в их качестве и способности давать удовлетворительные результаты. Перед использованием питательных сред, должны быть подтверждены характеристики поддержки роста, физические характеристики и стерильность.

Всякий раз, когда готовится новая партия сред, ее образцы должны быть проверены на стерильность. На рис.21 показана схема приготовления и контроля питательных сред.

Готовые к использованию среды.

Если готовые к использованию чашки/пробирки со средами приобретаются напрямую у поставщиков, практически невозможно контролировать подготовку среды, кроме доверия к поставщику. Даже если производитель предоставляет хорошо приготовленную среду, условия транспортировки и хранения до использования могут привести к ухудшению ее качества.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Среды, приготовленные собственными силами

При приготовлении среды собственными силами перед проверкой ее чувствительности, селективности и специфичности, следует проверить ее физические и химические параметры, а также визуально проверить качество разлива.

Визуально требуется исключить следующие аномалии:

- агар отделился от чашек,
- слой агара треснутый и поврежденный,
- замороженный или расплавленный агар,
- изменения ожидаемого цвета среды,
- явное загрязнение,
- неравномерное заполнение чашек,
- недостаточное количество (глубина) агара (<3 мм) (Примечание: для агара Мюллера-Хинтона глубина агара должна составлять $4 \pm 0,5$ мм),
- гемолиз кровяных сред,
- чрезмерные пузырьки или шероховатая поверхность,
- чрезмерная влажность или обезвоживание,
- наличие осадка,
- целостность упаковки,
- наличие сломанных или треснутых чашек Петри или пробирок,
- наличие протечек из чашек Петри или пробирок,
- точность маркировки.

Тестирование pH среды

pH большинства питательных сред близок к нейтральному (исключение составляет щелочная пептонная вода). Самый простой способ проверить pH культуральной среды — это использовать pH-бумагу с узким диапазоном или pH-метр. Тестирование pH можно проводить во время приготовления среды до или после автоклавирования с использованием хорошо откалиброванного pH-метра.

Измерение pH бульона

Окунуть бумагу с узким диапазоном pH в образец тестовой среды при комнатной температуре. Сравнить цвет бумаги с цветовой шкалой pH.

Измерение pH агара

Чтобы проверить pH агаровой среды, налить образец расплавленной среды в чашку Петри и дать ему затвердеть.

Положить на его поверхность бумагу с узким диапазоном pH.

Сравнить цвет бумаги с цветовой шкалой pH.

Корректировка pH

В большинстве случаев регулировка pH не требуется. Незначительные корректировки pH могут быть сделаны с помощью добавления нескольких капель (чтобы не разбавлять среду) концентрированных

1 моль/л гидроксида натрия, если среда слишком кислая, и

1 моль/л соляной кислоты, если среда слишком щелочная.

Максимальное отклонение pH среды от заданной при 25 °C должно составлять не более $\pm 0,2$ pH.

Проверка стерильности

Каждая среда, приготовленная в соответствии со строгими параметрами контроля качества, стерильна. Инкубируйте питательную среду собственного приготовления в течение 48

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 75 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

часов при температуре 35-37°C (от 24 часов до 5 дней, в зависимости от эталона). Для партии с менее 100 единиц 2% образцов должны быть подвергнуты испытанию на стерильность, но для партии с более чем 100 единицами достаточно десяти случайных единиц, чтобы удостовериться в отсутствии роста или контаминации.

Если после инкубации наблюдается рост (т. е. загрязнение), вся партия бракуется и требуется приготовить новую. **Нельзя использовать повторно чашки со средой, использованные для проверки стерильности.** Перед использованием всегда следует проводить дополнительную визуальную проверку.

После проверки на стерильность среду проверяют на предмет поддержки роста и получения желаемых реакций.

Работоспособность среды проверяется путем инокуляции стандартных целевых и нецелевых штаммов и их инкубации при желаемой температуре.

Целевым считается микроорганизм, рост которого ожидается на данной питательной среде.

Нецелевым является организм, рост которого не ожидается.

Подходящие микроорганизмы для контроля качества выбираются на основе стандартов, руководств или инструкций производителя. Рекомендуются организмы из коллекции типовых культур (например, АТСС), но также допускаются ранее охарактеризованные клинические организмы или штаммы EQA, показавшие фенотипическую стабильность (что должно быть документировано). Организмы для контроля качества следует правильно поддерживать и хранить (см. CLSI M22-A3).

Однако некоторые штаммы можно инокулировать на различных других средах. Escherichia coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 25923 и Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 используют в качестве кумулятивного контроля для тестирования всех сред. **При подтверждении качества питательных сред для патогенных микроорганизмов, используют авирулентные штаммы.**

Лаборатория должна разрабатывать и поддерживать процедуры ведения (СОП) музейных культур, чтобы избежать их перерождения.

В микробиологическом плане **чувствительность** - это вероятность того, что конкретный метод получит подтвержденный положительный результат, при условии, что исследуемый образец является заведомо положительным.

С этой точки зрения говорят о **селективности питательной среды** - степени ингибирования нецелевых микроорганизмов на или в селективной питательной среде при определенных условиях.

С другой стороны - **элективность (специфичность) питательной среды** - это свойство питательной среды, обеспечивающее характерные визуальные признаки колоний целевого микроорганизма по сравнению с колониями нецелевого микроорганизма (для жидкой среды - появление мути или изменение цвета для хромогенной среды). Например, колонии Salmonella на XLD агаре вырастут с черным центром и слегка прозрачной зоной, окрашенной в красноватый цвет из-за изменения цвета среды, а колонии Escherichia coli будут иметь желтый цвет.

Для того чтобы продемонстрировать специфичность и чувствительность, испытуемый образец должен быть привит штаммами конкретных испытуемых микроорганизмов, а также штаммами, которые считаются потенциально конкурентоспособными. **Оценка селективности, специфичности и чувствительности не применима к методам определения общего количества жизнеспособных клеток, дрожжей и плесени или аналогичных показателей, которые не направлены на конкретные микроорганизмы.** Рекомендуется специфичность и чувствительность устанавливается путем анализа не менее 30 чистых штаммов специфических

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 76 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

микроорганизмов, являющихся изученными, и не менее 20 чистых потенциально конкурентоспособных штаммов.

Это число может потребоваться увеличить (например, для методов определения Salmonella число целевых штаммов аналита составляет до 100, которые выбраны для представления большинства известных сероваров из рода Salmonella).

Специфичность качественного микробиологического метода заключается в его способности обнаруживать целый ряд микроорганизмов, которые могут присутствовать в исследуемом образце. Эта проблема адекватно решается путем стимулирования роста среды для качественных методов, которые основаны на культивировании роста микроорганизмов, чтобы продемонстрировать присутствие или отсутствие микроорганизмов. Однако для альтернативных методов, которые не требуют роста в качестве индикатора микробного присутствия, специфичность анализа для микробов гарантирует, что посторонние вещества в тест-системе не мешают тесту.

Чтобы удостовериться, что качество сред (специфичность, селективность и производительность) сохраняется в процессе их транспортировки и применения (после хранения, и дальнейших операций со средами в лаборатории пользователя, например, плотные среды расплавляют), проводят периодические проверки. Должна быть установлена частота данных проверок. В случае не полностью готовых сред (внесение добавок в процессе приготовления), необходимо проведение дополнительной проверки - либо проверяют результаты производительности, либо проводят качественное испытание, чтобы убедиться, что была внесена подходящая добавка.

Партия питательной среды демонстрирует удовлетворительные эксплуатационные характеристики, если все используемые тест-микроорганизмы (целевые и нецелевые микроорганизмы, применяемые для испытания среды) проявляют свои свойства в соответствии с установленными спецификациями.

Оценка селективности не применима к методам определения общего количества жизнеспособных клеток, которые не направлены на конкретные микроорганизмы (например КМАФАнМ). В этом случае оценивается только производительность с помощью штаммов для куумулятивного контроля.

При разработке любого нового микробиологического метода следует ожидать определения соответствующих целевых и нецелевых контрольных культур или других стандартов для использования как при валидации, так и при рутинном контроле качества. В надежном методе один целевой организм должен быть различим в сложных матрицах, содержащих потенциально миллионы нецелевых организмов.

ПРИМЕР 1:

Спецификации хромогенного агара в СТБ ISO 9308-1-2016

11.2 Определение рабочих характеристик хромогенного агара для колиформных бактерий (Chromogenic Coliform Agar – CCA)

Для определения производительности, избирательности и специфичности см. ISO 11133. Характеристики хромогенного агара для колиформных бактерий определяются методами и в соответствии с критериями, приведенным в ISO 11133.

В таблице 1 приводится информация по испытаниям для определения рабочих характеристик хромогенного агара для колиформных бактерий.

Таблица 1 – Испытания для определения рабочих характеристик хромогенного агара для колиформных бактерий (Chromogenic Coliform Agar – CCA)

Функция	Инкубация	Контрольные штаммы ^{а)}	Референсная среда	Метод контроля	Критерии (производительность)	Характерные реакции
Производительность	(21 ± 3) ч/ (36 ± 2) °C	E. coli WDCM 00013 или WDCM 00012	TSA	Количественный	PR ≥ 0,7	Колонии от темно-синего до фиолетового цвета
		Ent. aerogenes WDCM 00175 или C. freundii WDCM 00006	TSA	Количественный	PR ≥ 0,7	Колонии от розового до красного цвета
Селективность	(21 ± 3) ч/ (36 ± 2) °C	E. faecalis WDCM 00009	–	Качественный	Полное ингибирование	–
Специфичность	(21 ± 3) ч/ (36 ± 2) °C	P. aeruginosa WDCM 00024	–	Качественный	Рост	Бесцветные колонии

^{а)} См. каталог контрольных штаммов (дата доступа 03-01-2014) на http://www.wfcc.info/pdf/WDCM_Reference_Strain_Catalogue.pdf для информации о номерах штаммов коллекций культур и контактных данных.

Верификация эксплуатационных характеристик питательных сред

1 Специфичность

Специфичность питательной среды подтверждается активным ростом целевых микроорганизмов и другими качественными идентификационными признаками (ферментативные тесты, цвет колоний и др.) [32].

В процессе постановки эксперимента по определению селективности и производительности убедиться, что на испытываемой среде целевой и нецелевые штаммы микроорганизмов имеют характерные визуальные признаки, которые обеспечивают правильный подсчет колоний.

Элективность (специфичность) питательной среды - демонстрация при определенных условиях того, что нецелевые микроорганизмы не проявляют те же визуальные характеристики, что целевые микроорганизмы.

Например: На среде Эндо *Escherichia coli* растут круглыми колониями малинового цвета с металлическим блеском, d= 2,0-3,0 мм [37].



Рис.22 Фото колоний *Escherichia coli* на среде Эндо

Для референтных методов требуется установить специфичность путём высева естественно контаминированного образца на соответствующие питательные среды, с последующим подтверждением идентичности выросшей культуры. Так как, естественно контаминированные образцы содержат большое количество других микроорганизмов, в этом случае, специфичность является подтверждённой.

2 Селективность и чувствительность (производительность) сред для качественных методов

Чувствительность питательной среды - это способность питательной среды обеспечить достаточный рост микроорганизмов по сравнению с основной неселективной средой. Основной является неселективная среда, пригодная для культивирования большинства микроорганизмов, например МПБ (мясо пептонный бульон), МПА (мясопептонный агар), ППА (простой питательный агар), TSA (триптон соевый агар).

Производительность испытуемой среды является удовлетворительной, если наблюдается выраженный рост (не менее 10 КОЕ или линия сплошного роста, выраженная мутность, газообразование) целевого микроорганизма на среде, специфичной для данного микроорганизма [32].

Чувствительность питательной среды принято характеризовать коэффициентом производительности питательной среды. Коэффициент производительности питательной среды - степень роста целевого микроорганизма на питательной среде при определенных условиях по сравнению с ростом на основной питательной среде (контрольной среде) в этих же условиях.

Селективность на жидких питательных средах определяется по помутнению среды. Если среда изначально мутная, то производят последующий высеv на плотные питательные среды, чтобы доказать наличие роста колоний.

2.1 Постановка эксперимента по определению чувствительности для жидких селективных обогатительных сред с использованием одной пробирки (используют целевые, нецелевые или смесь целевых и нецелевых микроорганизмов в одной пробирке), применяемых для качественных методов.

Этапы работы	Целевые микроорганизмы Рабочая культура целевых микроорганизмов	Нецелевые микроорганизмы Рабочая культура нецелевых микроорганизмов	Смесь целевых и нецелевых микроорганизмов Рабочие культуры целевых и нецелевых микроорганизмов
1	Инокуляция одной пробирки испытуемого бульона не более 100 клетками	Инокуляция одной пробирки испытуемого бульона не менее 10 ³ клетками	Инокуляция одной пробирки испытуемого бульона не более 100 клетками целевого микроорганизма и не менее 10 ³ клетками нецелевого микроорганизмов
2	Инкубирование при температуре и в течение периода времени установленных в НД	Инкубирование при температуре и в течение периода времени установленных в НД	Инкубирование при температуре и в течение периода времени установленных в НД
3	Отбор 10мм ³ и проведение посева штрихом на слое селективной среды	Отбор 10мм ³ и проведение посева штрихом на слое неселективной среды	Отбор 10мм ³ и проведение посева штрихом на слое среды, специфичной для целевого микроорганизма
4	Инкубирование при температуре и в течение периода времени установленных в НД	Инкубирование при температуре и в течение периода времени установленных в НД	Инкубирование при температуре и в течение периода времени установленных в НД
5	Должен наблюдаться рост не менее 10 колоний целевого микроорганизма	Должен наблюдаться полное и частичное подавление роста (менее 10 колоний) нецелевых микроорганизмов	Должен наблюдаться рост не менее 10 колоний целевого микроорганизма, при этом должно наблюдаться полное и частичное подавление роста (менее 10 колоний) нецелевых микроорганизмов

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

2.2. Селективность сред для количественных методов

Селективные питательные среды и неселективную контрольную среду параллельно инокулируют различными разведениями нецелевого(ых) микроорганизма(ов). При испытании на селективность инокулят нецелевых микроорганизмов должен составлять порядка от 10^4 до 10^6 КОЕ (нужно подобрать такое разведение, которое первоначально дает сплошной рост на основной неселективной среде.)

Коэффициент селективности S вычисляют по формуле

$$S_F = D_0 - D_S$$

D_0 — наибольшее разведение, на котором имеется рост на основной неселективной среде (см. раздел V1.1 стр. 39).

D_S — наибольшее разведение, демонстрирующее сопоставимый рост на испытываемой селективной среде.

S_F , D_0 и D_S выражены в единицах \log_{10} .

Критерии приемлемости

S_F для нецелевых микроорганизмов на селективной среде должен быть > 2 .

Это значит, что рост нецелевых микроорганизмов угнетается минимум в 100 раз.

2.3 Чувствительность (производительность) сред для количественных методов

Рост микроорганизмов от новой партии питательной среды сравнивают с ростом микроорганизмов в неселективной питательной среде (контрольной среде) или в особых случаях от предварительно принятой партии среды того же состава. При испытании на производительность инокулят должен содержать порядка от 10^3 до 10^4 КОЕ.

Для количественного метода коэффициент производительности P_R вычисляют по формуле

$$P_R = \frac{N_s}{N_0}$$

N_s — общее количество колоний, полученных на испытываемой среде при испытании (полученных на одной или более чашках);

N_0 — общее количество колоний, полученных на определенной основной неселективной среде на одной или более чашках; для подсчета используются чашки >100 КОЕ (колониеобразующих единиц).

Для качественных испытаний концентрация микроорганизмов в инокуляте должна быть:

- от 10^3 до 10^4 КОЕ для твердых питательных сред;
- не менее 100 КОЕ для испытаний на производительность сред обогащения или предварительного обогащения.

Для количественных испытаний концентрация микроорганизмов в инокуляте должна быть:

- порядка 10^2 КОЕ/мл для твердых питательных сред;
 - порядка 10^3 до 10^4 КОЕ/мл для жидких транспортных сред.
- концентрация микроорганизмов в инокуляте должна быть такой, чтобы концентрация, равная приблизительно 100 КОЕ была в объеме, распределяемом по чашкам.

Критерии приемлемости

Результаты считают действительными при выполнении следующих условий:

- для каждой чашки должен быть получен положительный количественный результат (целевой бактериальный рост);

- каждый отдельный заявленный результат попадает в стандартный диапазон анализа (не более 100 колоний для методов с фильтрацией и не более 150 колоний для поверхностных методов).

Коэффициент производительности P_R должен быть не менее 0,50 при сравнении селективной среды с неселективной контрольной средой.

Коэффициент производительности P_{RD} должен быть не менее 0,70 при сравнении неселективной среды с неселективной контрольной средой. Это также имеет место в особых случаях, когда сравнение проводят с предыдущей партией питательной среды.

Если коэффициент производительности P_R превышает 1,4 требуется установить причину этого. (см. [32])

ПРИМЕР 1 Производительность целевого микроорганизма:

Если штамм *Escherichia coli* ATCC 25922 инокулировать в стерильную чашку с агаром МакКонки, после надлежащей инкубации должны появиться розовые колонии, ферментирующие лактозу.

Селективная среда: Необходимо использовать по крайней мере один организм, рост которого ожидается, и по крайней мере один организм, рост которого не ожидается .

Дифференциальные среды: используются микроорганизмы, которые будут демонстрировать предполагаемый рост и реакции (например, агар МакКонки: *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) .

Биохимические среды (например, уреазный тест): используется как минимум один микроорганизм, вызывающий отрицательную реакцию, и один, вызывающий положительную реакцию.

Дисковая диффузия выполняется, чтобы проверить чашки с агаром Мюллера-Хинтона.

ПРИМЕР 2: Определение коэффициентов чувствительности и селективности

Основной является неселективная среда, пригодная для культивирования большинства микроорганизмов, например МПБ (мясо пептонный бульон), МПА (мясопептонный агар), ППА (простой питательный агар), TSA (триптон соевый агар).



Рис.23 Фото роста колоний *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* на средах Эндо (слева), TSA (в центре) и ЖСА (справа) на таблице ниже указано число колоний.

Расчет селективности питательной среды для определения кишечной палочки

Разведение	ЭНДО		ТСА		ЖСА	
	целевой	нецелевой	целевой	нецелевой	целевой	нецелевой
	E.coli	St. aur	E.coli	St. aur	St. aur	E.coli
10¹				Сплошной рост		
10²		1		143		
10³	68	0	85	14	32	0
10⁴	7	0	10	3	5	0
10⁵	1	0	1	0	0	0
10⁶	0	0	0	0	0	0

D_0 - наибольшее разведение, при котором отмечается рост колоний нецелевого микроорганизма (St.aur) на основной неселективной среде (ТСА) это 10^4 ($\lg 10^4=4$).

D_S – наибольшее разведение, при котором отмечается сопоставимый рост на селективной питательной среде (Эндо) – это 10^2 ($\lg 10^2=2$).

$$S_F = D_0 - D_S = 4 - 2 = 2 \text{ (отмечено стрелочкой в таблице выше)}$$

Следовательно, $S_F=2$ т.е рост микроорганизмов подавляется в 100 раз.

Однако, если уже был проведен эксперимент, в котором в первоначальном разведении при посеве нецелевого микроорганизма на основную неселективную питательную среду не получен сплошной рост, а получено конечное число микроорганизмов, то на селективной среде рост нецелевых может быть полностью подавлен, в этом случае допускается сравнивать наибольшие разведения нецелевого микроорганизма в которых наблюдается отсутствие роста на основной неселективной питательной среде и селективной питательной среде) (отмечено стрелочкой в таблице ниже)

Разведение	ЭНДО		ТСА		ЖСА	
	целевой	нецелевой	целевой	нецелевой	целевой	нецелевой
	E.coli	St. aur	E.coli	St. aur	St. aur	E.coli
10¹	68	0	85	14	32	0
10²	7	0	10	3	5	0
10³	1	0	1	0	0	0
10⁴	0	0	0	0	0	0

D_0 - первое наибольшее разведение, при котором уже не отмечается рост колоний нецелевого микроорганизма (st.aur) на основной неселективной среде (ТСА) это 10^3 ($\lg 10^3=3$).

D_S – первое наибольшее разведение, при котором не отмечается рост на селективной питательной среде (Эндо) – как видно рост не обнаружен даже в разведении 10^1 ($\lg 10^1=1$; поэтому будем сравнивать наибольшие разведения нецелевого микроорганизма в которых наблюдается отсутствие роста на основной неселективной питательной среде (ТСА, 10^3 , $\lg 10^3=3$) и селективной питательной среде (ЭНДО, 10^1 , $\lg 10^1=1$)) (отмечено стрелочкой в таблице выше)

$$S_F = D_0 - D_S = 3 - 1 = 2$$

Как видно оба подхода дают одинаковые результаты:

Следовательно, $S_F=2$ т.е рост микроорганизмов подавляется в 100 раз.

Заключение: селективная питательная среда Эндо имеет $S_F = 2$ что приемлемо, так как критерий приемлемости $S_F > 2$.

Как видно для определения коэффициента селективности для расчета не берется количество выросших колоний, а сопоставляются только разведения, в которых вырастают (уже не вырастают) нецелевые микроорганизмы на неселективной и селективной средах.

Расчет производительности питательной среды для определения кишечной палочки на селективной питательной среде Эндо в разведении 10^1 выросло 68 колоний E.coli (целевой микроорганизм). На неселективной среде (ТСА) выросло 85 E.coli, $P_R=68/85=0,8$

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Заключение: селективная питательная среда Эндо имеет $P_R = 0,8$ что является приемлемым для среды Эндо ($P_R \geq 0,5$).

2.4 Постановка эксперимента по определению селективности и производительности твердых питательных сред

1. Приготовление инокулята с подходящей концентрацией микроорганизмов
2. Иннокуляция испытуемой среды и контрольной среды путем распределения посевного материала или путем мембранной фильтрации с целью получения количества колоний, которое попадает в рекомендуемый диапазон значений для P_R и S_F .
3. Инкубирование при температуре и в течении периода времени, установленных в соответствующем стандарте.
4. Подсчет колоний на двух средах и вычисление P_R и S_F соответственно как указано выше.

При тестировании новых партий должны быть включены как предыдущие, так и новые партии. Записи должны включать рост (размер колонии и морфологию), селективность и дифференциацию.

V. III. ВЕРИФИКАЦИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ РЕФЕРЕНТНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

В целях верификации качественных микробиологических методов требуется установить:

1. предел обнаружения,
2. стабильность.

1. Предел обнаружения

Предел обнаружения - наименьшее количество микроорганизмов в образце, которое может быть обнаружено в указанных экспериментальных условиях. Микробиологический предельный тест определяет наличие или отсутствие микроорганизмов, например, отсутствие *Salmonella* spp. в связи с характером микробиологии предел обнаружения относится к числу организмов, присутствующих в исходном образце до любых стадий разведения или инкубации; он не относится к числу организмов, присутствующих на момент анализа.

Измерения LOD₅₀ устанавливают базовое значение обнаружения при оптимальных условиях. **Обычно предполагается, что методы, основанные на культивировании, способны обнаруживать единичные целевые организмы в больших пробах.** Если организмы не обнаружены, то результат указывается как <1 организм на объем или массу образца.

На практике предел обнаружения очень трудно определить из-за присутствия конкурирующих микроорганизмов, а также воздействия образцов на организмы. Поэтому для определения предела обнаружения целесообразно использовать тестовые образцы, загрязненные 5-10 КОЕ.

2. Верификация предела обнаружения

Требуется подтвердить, что лаборатория достигает предела обнаружения, установленного методом. Если лаборатория применяет референтный метод, основанных на культивировании роста микроорганизмов, то должна быть подтверждена способность лаборатории получать рост микроорганизмов в разведении до одной клетки в объеме - 1 КОЕ/мл. Для проведения испытаний требуется использовать стандартные образцы культур, например, стандарт мутности.

Для определения предела обнаружения, желательно использовать естественно контаминированные матрицы. Если это невозможно, могут использоваться искусственно загрязненные образцы, например, с уровнем посева:

0 КОЕ (пустой/ноль – холостая проба)

от 1 до 10 КОЕ

от 10 до 100 КОЕ

в определенном количестве исследуемой матрицы.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 83 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

Затем проводят исследование и классифицируют все полученные результаты пользуясь методом бинарной классификации (см. раздел III).

Ложно-отрицательные результаты свидетельствуют об отсутствии данного аналита, в то время как данный аналит присутствует в образце; ложно-положительные результаты указывают на наличие аналита, который не присутствует в образце. Увеличение числа ложно-отрицательных результатов наблюдается, когда число аналитов приближается к пределу обнаружения.

Предел обнаружения для качественного альтернативного метода может быть выражен как концентрация аналита, дающая положительный результат с вероятностью 95% (см. V.III).

3. Устойчивость /робастность

Устойчивость качественного микробиологического метода - это степень точности результатов испытаний, полученных путем анализа одних и тех же образцов при различных нормальных условиях испытаний, таких как различные аналитики, приборы, партии реагентов и лаборатории. Устойчивость может быть определена как внутренняя устойчивость к воздействиям, оказываемым эксплуатационными и экологическими переменными на результаты микробиологического метода. Устойчивость - это параметр валидации, который лучше всего подходит для определения поставщиком метода испытаний, имеющим легкий доступ к нескольким инструментам и партиям компонентов.

Устойчивость не определяется при верификации методов.

4. Стабильность

Цель состоит в том, чтобы определить пределы условий, которые не приводят к существенным различиям в результатах испытаний по сравнению с результатами, полученными при анализе свежих образцов с заданным уровнем достоверности. Различные матрицы образцов также могут влиять на результаты испытаний.

Для верификации стабильности требуется путём параллельных испытаний подтвердить, что посев на сохраняемые в течении определённого времени (рутинное максимальное время хранения готовых сред в холодильнике в конкретной лаборатории) питательные среды и свежие питательные среды не обнаруживает различий при выявлении микроорганизмов. То же касается изменения времени посева параллельных и разведений.

V.IV. ВЕРИФИКАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ РЕФЕРЕНТНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Подсчет результатов количественного учета микроорганизмов

За результат испытания количественных методов принимается количество колоний выросших на чашках в 3-х последних разведениях деленное на общее число разведений.

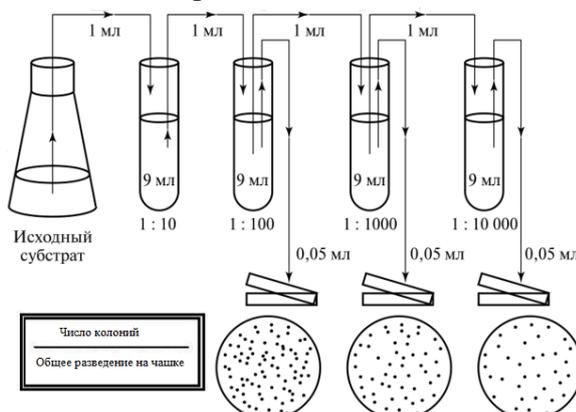


Рис.23 Принцип количественных методов посева

Если учитываются результаты посева на нескольких чашках, то результат испытания принимается среднее взвешенное (объединенное) значение колоний выросших на чашках.

Результат	Разведения			10
	100 КОЕ/мл	10 КОЕ/мл	Менее КОЕ/мл	
	X ₁ , X ₂	X ₁ , X ₂	X ₁ , X ₂	

$$N_i = \frac{\sum X_{pi}}{V(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

$\sum X_{pi}$ – сумма колоний, полученная при трех последовательных разведениях;
V - объем посевного материала помещенного на каждую чашку, мл;
n₁, n₂, n₃ – число чашек, взятых из первого, второго и третьего разведения соответственно;
d – коэффициент разведения относящийся к выбранному первому разведению.

Количество колоний может быть выражено в КОЕ/см³ или (КОЕ/г), в обычном или стандартном виде, или в логарифмической форме в форме lg КОЕ/ см³ или lg КОЕ/г.

ПРИМЕР: Подсчитав количество колоний на чашках в разных разведениях, рассчитаем количество колоний, которое было в 1 мл образца.



Рис 24. Иллюстрация результатов эксперимента по верификации метода

$$N_i = \frac{86+6+1}{1 \text{ мл} (1+0,1*1+0,01*1)*0,1} = \frac{93}{1,11*0,1} = \frac{93}{0,111} = 837 \text{ КОЕ/мл или } 8,37 \cdot 10^2 \text{ КОЕ/мл}$$

или $\lg(837) = 2,92 \lg \text{КОЕ}$

Поскольку колониеобразующие единицы подчиняются распределению Пуассона, рекомендуется использовать статистические инструменты, соответствующие распределению Пуассона, а не те, которые используются для анализа нормальных распределений. Если пользователю удобнее использовать инструменты, ориентированные на нормально распределенные данные, требуется использовать преобразование данных. Необработанные подсчеты могут быть преобразованы в нормально распределенные данные путем:

- взятия значения единицы \log_{10} , например:
count = 15 КОЕ/мл $\log_{10}(\text{count}) = 1,18$

- взятия квадратного корня (SQRT – SQuare RooT) из подсчитанного числа колоний count +1 (предпочтительно если, данные содержат нулевые подсчёты), например:
count = 15 КОЕ/мл $\text{SQRT}(\text{count} + 1) = \sqrt{\text{count} + 1} = \sqrt{15 + 1} = 4$

В целях верификации количественных микробиологических методов требуется установить:

1. предел обнаружения,
2. предел количественного определения
3. повторяемость,
4. воспроизводимость,
5. линейность метода
6. стабильность.

Постановка эксперимента по определению эксплуатационных характеристик количественных микробиологических методов

Золотого стандарта верификации не существует. Единственное требование: экспериментальным путем подтвердить достоверность полученных результатов. Как правило это осуществляется с помощью сравнения фактически полученных результатов с заводом известными.

Для верификации предела обнаружения, предела количественного определения и правильности, повторяемости и воспроизводимости необходимо иметь достоверное подтверждение количества микроорганизмов в образце. В этом случае, могут быть использованы 3 принципиально разных подхода:

1. Использование заражения образца стандартизированной суспензией штаммов, содержащих известное количество КОЕ.
2. Удовлетворительное участие в программе проверки квалификации для количественных методов.
3. Использование естественно контаминированного образца с переподтверждением разведений (этим методом подтверждается только предел обнаружения и количественного определения).

1. Для инокуляции питательной среды использовать стандартизованную суспензию штаммов, содержащую известное количество КОЕ. Для этого может быть использован сертифицированный стандартный образец.

В этом случае будет предвтерильно известно число разведений в котором будет получен переход от наличия роста до его отсутствия.

ПРИМЕР 1: сертифицированное содержание *E.coli* = $1,56 \cdot 10^4$ (см. приложение Е) при пяти десятикратных разведениях должен показать единичный рост в пятом разведении и отсутствие роста в шестом разведении:

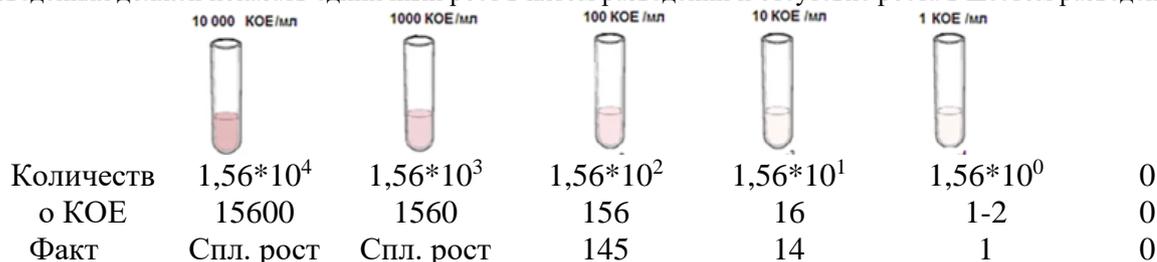


Рис.25.1 Схема десятичных разведений сертифицированного стандартного образца для определения эксплуатационных характеристик метода испытаний.

Так как количество сертифицированного референтного материала может быть очень небольшим, и может оказаться недостаточным для посева в параллелях, то, если, при постановке эксперимента подтверждаются предполагаемые разведения, то автоматически подтверждается предел обнаружения, предел количественного определения и правильность.

LOD = число микроорганизмов в последнем разведении в котором есть рост (1-2 КОЕ)

LOQ = число микроорганизмов в предпоследнем разведении в котором есть рост (16 КОЕ)

2. Результаты участия в программе проверки квалификации количественным методом.

В этом случае, лаборатория проводит посев материала для проверки квалификации минимум в трех последовательных разведениях.

	Разведения			
	100 КОЕ/мл	10 КОЕ/мл	Менее 10 КОЕ/мл	Менее 1 КОЕ/мл
Результат	X ₁ , X ₂	X ₁ , X ₂	X ₁ , X ₂	
1 лаборант	133; 148	12; 9	1; 0	0; 0
2 лаборант	156; 151	14; 12	1; 1	0; 0

Результаты посевов сохраняются в рабочих записях лаборатории. Позже, после получения результата участия в ППК, лаборатория может оформить результаты верификации метода.

Если участие является удовлетворительным, то результаты полученные во время посева при испытании пробы для проверки квалификации, могут быть использованы для оценки предела обнаружения, предела количественного определения, повторяемости, воспроизводимости и правильности (правильность может быть уже указана в качестве z или Ep-индекса по отчету провайдера).

3. Использование естественно/искусственно контаминированного образца с переподтверждением разведений

Для верификации можно использовать как искусственно так и естественно контаминированные образцы:

Естественно контаминированный образец	Искусственно контаминированный образец
Осуществляется посев исходной суспензии, приготовленной из естественно контаминированного образца в разных разведениях.	Привейте 1 мл выбранного разведения в исходную суспензию отдельных испытуемых порций продукции. Подготовленный инокулят вводят непосредственно в исходную суспензию отдельных испытуемых порций. После прививки суспензию тщательно перемешивают.
Оценка числа клеток не проводится.	Предварительная оценка приблизительного количества клеток с использованием стандарта мутности.

В качестве минимального требования для верификации достаточно того, чтобы испытания проводились, по меньшей мере, двумя разными людьми в 2 параллелях в течении 2-х дней в трех последовательных разведениях, обеспечивающих рост на чашках до 150 колоний [19]. Несмотря на то, что для количественного определения производится посев с числом колоний в диапазоне от 15 до 300 на чашку, в случае эксперимента по верификации требуется придерживаться именно рекомендуемого количества колоний менее 150 – что обеспечивает большую точность подсчета, а также достигать разведений менее 15 и даже до отсутствия роста, так как это нужно для определения пределов обнаружения и количественного определения метода.

Теоретически, требуется три уровня загрязнения (высокий, средний и низкий) и один чистый уровень. Однако, поскольку фактическое количество на момент прививки неизвестно, рекомендуется выполнить “диапазон” последовательных разведений, который включал бы три целевых уровня загрязнения (см. Рисунок 25.2).

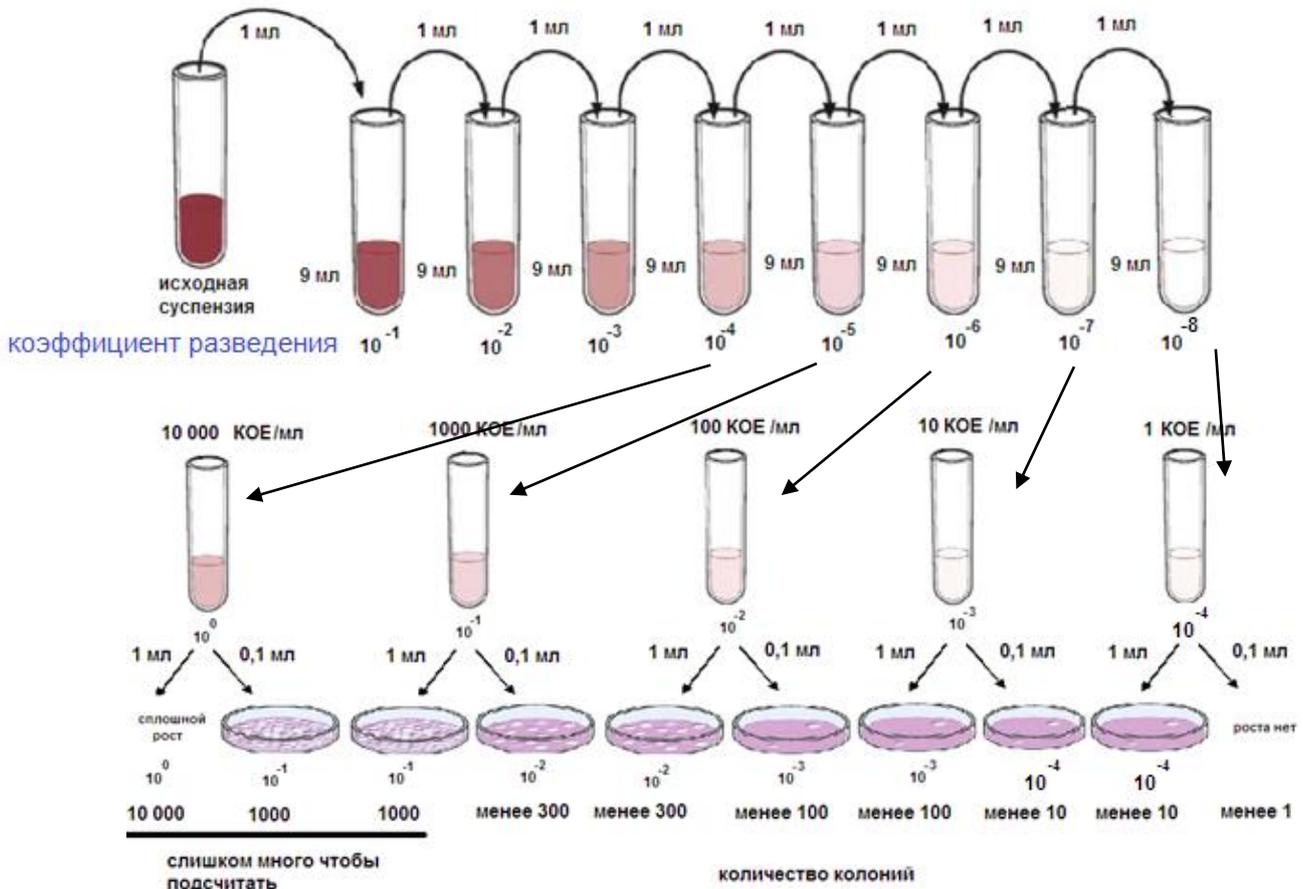


Рис.25.2 Схема десятичных разведений для определения эксплуатационных характеристик метода испытаний.

Для того, чтобы приготовить серию последовательных разведений исходной суспензии, приблизительную концентрацию клеток в ней оценивают, сравнивая ее мутность с контрольным эталоном – стандартом мутности по шкале Макфарленда.



Рис.26 Стандарты мутности бактериальной суспензии по Макфарланду

В таких случаях из микробной культуры, предназначенной для посева, пользуясь бактериальным стандартом мутности, готовят взвесь, содержащую в единице объема (1 мл) заданное количество микробных тел (КОЕ). Исследуемая бактериальная взвесь должна быть гомогенной с равномерным распределением частиц взвеси в пробирке – для этого лучше всего использовать мешалку-вортекс. Для приготовления разбавлений рекомендуется использовать пипеточные дозаторы на 100 и 1000 мкл.



Рис. 27 – прибор для определения мутности бактериальной суспензии, 2- лабораторная мешалка-вортекс, 3-дозаторы пипеточные.

В том случае, если отсутствует прибор для определения мутности бактериальной суспензии, сравнения проводят с применением специальной таблицы со шрифтами:

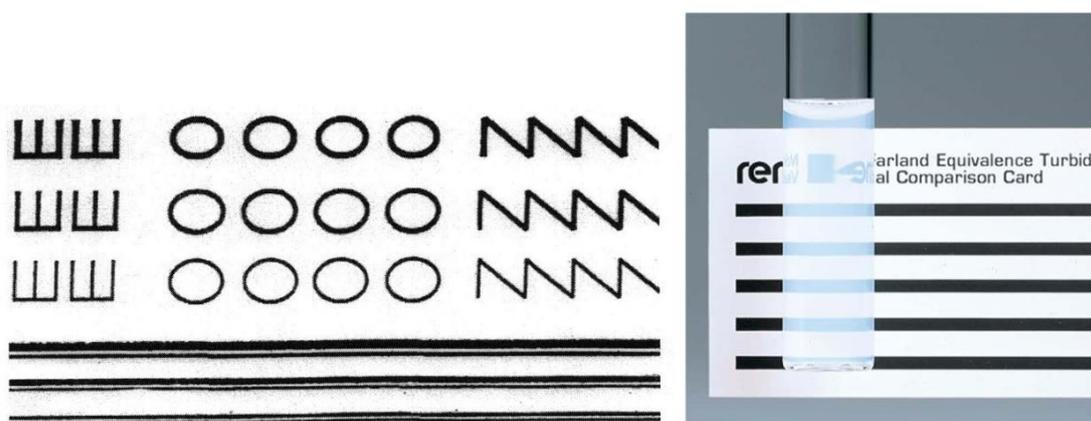


Рис. 28 – сравнительная таблица для визуального определения мутности бактериальной суспензии.

Пробирку эталона совмещают с исследуемой бактериальной взвесью в вертикальном положении на уровне глаз, приложив плотно к задней поверхности шрифтовую таблицу. Пробирки освещаются равномерно источником рассеянного света, которым могут быть люминесцентная лампа мощностью от 20 до 40 Вт, лампа накаливания матовая (с плафоном) мощностью от 40 до 60 Вт, а также рассеянный дневной свет.

В случае одинаковой четкости видимых элементов шрифтовой таблицы через стандарт мутности и пробирку с исследуемой бактериальной взвесью мутность их считают одинаковой, равной мутности, указанной на этикетке стандарта мутности. Если мутность исследуемой бактериальной взвеси не совпадает с пробиркой эталонного стандарта мутности, прибегают к уравниванию мутности, добавляя в зависимости от существующего различия физиологический раствор или микробную взвесь высокой концентрации.

Чтобы определить правильность всех операций пробоподготовки требуется произвести посев как чистого разведенного стандарта, так и зараженной пробы, посев которой проводится после всех операций пробоподготовки. Дополнительно делаются 2 десятичных разведения с содержанием клеток меньше 1 КОЕ на 1 мл.

Исходная суспензия на рисунке выше - это либо исходный стандарт (E.coli или др.), $1 \times 10^8 = 100\ 000\ 000$ на физрастворе, либо проба пищевого продукта, зараженная определенной концентрацией микроорганизмов.

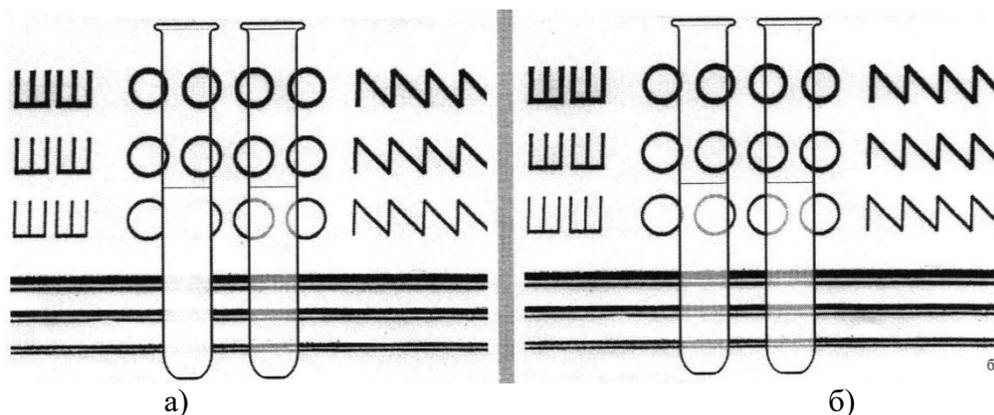


Рис. 29 – Сравнение мутности исследуемой пробы и взвеси бактериальных клеток и стандартного образца мутности: а) – мутность бактериальной взвеси не совпадает с мутностью стандартного образца, б) – мутность бактериальной взвеси одинакова с мутностью стандартного образца.

Посев на чашки начинают с разведений с ожидаемым содержанием микроорганизмов не более 10^4 (10 000) КОЕ/мл – коэффициент десятичного разведения исходной суспензии до этого содержания колоний-образующих единиц является коэффициентом разведения относящемуся к выбранному первому разведению - d (см. ниже). При посеве на чашки коэффициенты остальных последовательных разведений отсчитывают заново – их не более пяти:

- 0,1 (первое разведение P1) с ожидаемым числом не более 150 КОЕ/мл,
- 0,01 (второе разведение P2) – с ожидаемым числом менее 20 КОЕ ,
- 0,001 – третье разведение P3 с ожидаемым числом единичных колоний,
- разведения 0,0001 и 0,00001 для подтверждения отсутствия роста.

Ниже приведён пример, в котором был подготовлен инокулят с *E. coli* по стандарту мутности с содержанием микроорганизма 1×10^8 КОЕ/мл. С этого инокулята был сделан ряд разведений до содержания 1 клетки *E. coli* и до отсутствия клеток (разведение проводилось в 9 мл физраствора).

Принцип разведения КОЕ/мл		Коэффициент разведения d	Посев на КМАФАнМ (разведённый стандарт)/ количество выросших колоний на чашке				
0-e	$1 \times 10^8 = 100\ 000\ 000$	10^0	Не сеем	Не сеем	Не сеем	Не сеем	
1-e	$1 \times 10^7 = 100\ 000\ 00$	10^{-1}	Не сеем	Не сеем	Не сеем	Не сеем	
2-e	$1 \times 10^6 = 100\ 000\ 0$	10^{-2}	Не сеем	Не сеем	Не сеем	Не сеем	
3-e	$1 \times 10^5 = 100\ 000$	10^{-3}	Не сеем	Не сеем	Не сеем	Не сеем	
4-e	$1 \times 10^4 = 100\ 00$	10^{-4}	Не сеем	Не сеем	Не сеем	Не сеем	
5-e	$1 \times 10^3 = 1000$	10^{-5}	Не сеем	Не сеем	Не сеем	Не сеем	
6-e	$1 \times 10^2 = 100$	10^{-6}	88	87	92	89	
7-e	$1 \times 10^1 = 10$	10^{-7}	12	10	13	8	Max = 13
8-e	$1 \times 10 = 1$	10^{-8}	2	1	2	-	Min = 1
9-e	$1 \times 10 = 0$	10^{-9}	-	-	-	-	
10-e	11-e $1 \times 10 = 0$	10^{-10}	-	-	-	-	

Для переподтверждения правильности посева, чтобы подтвердить, что в процессе выполнения метода не происходит заражения, гибели части микроорганизмов, неправильных манипуляций, из каждой пробирки, выбранной для посева, производят посев 1 мл и 0,1 мл. Таким образом, как видно на рисунке 25.2, пары параллельных посевов формируются **не из пробирки одного десятичного разведения, а из двух**

последовательных – что обеспечивает контроль и подтверждение правильности первичных разведений и тщательности выполнения техники посева. При этом на чашках полученных посевом 1 мл и 0,1 мл должно вырасти сопоставимое (приблизительно одинаковое) количество микроорганизмов.

Если в каждом разведении вырастает сопоставимое количество микроорганизмов, то полученные результаты могут считаться достоверным подтверждением предела обнаружения, предела количественного определения, повторяемости и воспроизводимости.

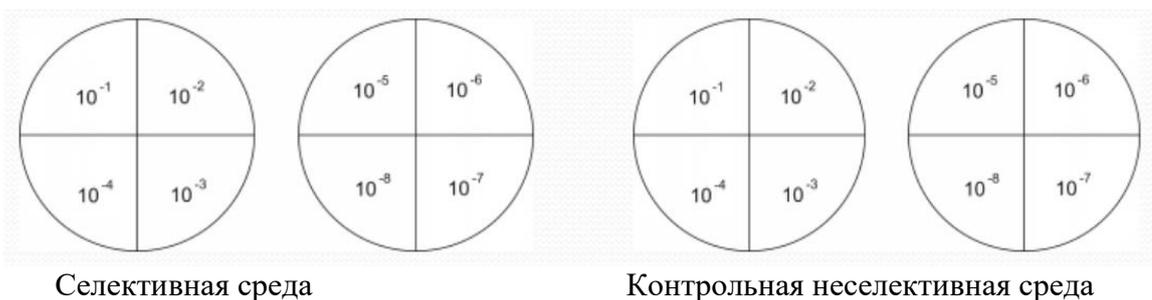
Группировка матриц, которая применяется при верификации описана в [18].

Также из приведенной картины можно сделать следующий вывод: в меньшем объеме образца всегда будет выявляться меньшее количество микроорганизмов. Поэтому, недопустимо для первичного посева брать меньшее количества пищевого продукта, чем это указано в методике. Так если для выявления *Salmonella spp* требуется для первичного посева 25 см³ продукта, то взятие вместо этого количества, например 2 см³, уже заведомо приводит к 10ти кратно меньшему содержанию *Salmonella spp* в исходной суспензии, что может привести к невыявлению микроорганизма там, где он действительно присутствует.

Иногда, посе объема 1 мл является очень сложной задачей, так как такой объем жидкости не впитывается на поверхности плотной питательной среды. Кроме того, посев последовательных разведений требует большого количества чашек со средой, в целях экономии среды и облегчения впитываемости, пользуются методом Милес-Мисра.

В этом методе посев из пробирок осуществляется только с помощью калиброванного пипеточного дозатора объемом 100 мкл на сегменты шашки с агаром.

В этом случае из первоначального разведения в пробирке берется объем вместо 1000 мкл (1 мл) 100 мкл.



Селективная среда
Рис. 30 а) Разделение плотной среды на сектора

Контрольная неселективная среда

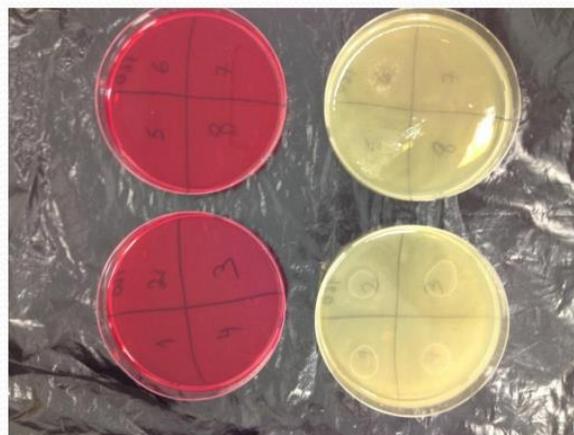


Рис. 30 б) Посев *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 на XLD-агаре на сектора

В этом случае при подсчете колоний необходимо не забыть, что появляется дополнительный коэффициент разведения 0,1, поэтому полученное при подсчете число колоний необходимо умножить на 10. Соответственно если от исходного объема берется для посева аликвота 20 или 10 мкл, то дополнительные коэффициенты разведений будут 0,02 (умножить на 50) или 0,01 (умножить на 100).

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

1. Предел обнаружения

Для того, чтобы подтвердить предел обнаружения, требуется провести посев – 3-х последовательных десятичных разведений до 100, 10 и 1 КОЕ на мл, а также подтвердить отсутствие роста при разведениях ниже 1 клетки на мл. Для определения этих показателей требуется применение стандартного образца.

Предел обнаружения LOD рассчитывается как среднее между максимальным числом выросших колоний в последнем разведении, где есть полный рост и минимальным числом выросших колоний, в разведении, где рост есть только на 50% чашек.

$$LOD (X) = \frac{MaxX(100\% \text{ рост}) + MinX(50\%)}{2}$$

Критерии приемлемости

Предел обнаружения LOD должен быть не более 5-10 клеток (так как при отсутствии клеток принято писать менее 10 КОЕ).

Тогда для примера выше

$$LOD (X) = \frac{13+1}{2} = 7 \text{ КОЕ/мл}$$

(так как для посева взят 1 мл суспензии).

Для жидких питательных сред предел обнаружения подтверждается путем посева пробирок на низком уровне разведения. Критерий приемлемости: не менее 6 из 7 дают положительный результат.

2. Предел количественного определения LOQ

Предел количественного определения LOQ рассчитывается как среднее число колоний на чашках в последнем разведении, где есть полный рост.

$$LOQ = \frac{\sum X_i(100\% \text{ рост})}{\text{число чашек}}$$

$$LOQ = \frac{(12+10+13+8)}{4} = 11 \text{ КОЕ/мл}$$

Критерии приемлемости

Предел количественного определения, полученный в процессе верификации должен быть не более нижней границы подсчетного числа колоний, согласно документам на методы испытаний. Так, количественный учет выросших колоний колиформных бактерий от 15 до 150, следовательно предел количественного обнаружения составляет 15 КОЕ /мл (КОЕ /г).

Таким образом, предел количественного определения более 10 КОЕ/мл, следовательно отрицательный результат будет представлен < 10 КОЕ/мл (или КОЕ/г для твердых продуктов) – микроорганизм может быть обнаружен, но ниже предела количественного определения.

Для вышеприведенного примера 11 КОЕ/мл ниже 15 КОЕ /мл, т.е. лаборатория подтвердила свою возможность количественно определить 15 КОЕ/мл.

Предел обнаружения и количественного определения также может быть выражен в логарифмических единицах. Так для примера выше предел количественного определения в log10КОЕ составит

$$\text{Log}_{10} (11) = 1,04$$

В логарифмических единицах критерии приемлимости составят:

$$\text{log}_{10} LOD \text{ не более } 1; (\text{log}_{10} (10)=1)$$

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 92 из 161
-----------	---	---------------	------------	----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

$\log_{10} \text{LOQ}$ не более 1,18; ($\log_{10} (15)=1,18$)

Определение предела обнаружения метода не являются необходимым для тех методов, которые не будут использоваться для определения низких концентраций аналитов. Например, если метод будет использоваться для определения в диапазоне от 1000 КОЕ/г до 100000 КОЕ/г, нет необходимости определять 1 КОЕ/г. Этот метод должен использоваться только в этом диапазоне.

3. Линейность

Линейность количественного микробиологического теста заключается в его способности давать результаты, пропорциональные концентрации микроорганизмов, присутствующих в образце в заданном диапазоне. Линейность при верификации специально не подтверждается. При верификации и при рутинных испытаниях линейность и соответственно качество всех проводимых операций разведений и посева подтверждается путем параллельного посева в двух разных разведениях из одной пробирки (см. схему эксперимента по верификации метода).

4. Прецизионность (повторяемость и воспроизводимость)

Прецизионность количественного микробиологического метода - это степень согласия между отдельными результатами испытаний, когда процедура многократно применяется к многократным пробам суспензий лабораторных микроорганизмов по всему диапазону испытаний. Прецизионность микробиологического метода обычно выражается в виде стандартного отклонения или относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации). Однако могут применяться и другие соответствующие меры.

Один из способов демонстрации прецизионности использует суспензию микроорганизмов на верхнем конце диапазона испытания, которая была последовательно разбавлена до нижнего конца диапазона испытания. Следует проанализировать не менее 3 суспензий по всему диапазону испытания. Для каждой суспензии должно быть проанализировано не менее 6 повторений, чтобы можно было рассчитать статистически значимые оценки стандартного отклонения или относительного стандартного отклонения (коэффициента вариации). Например по схеме

Участвующие лица лаборатории	Разведения		
	100 КОЕ/мл	10 КОЕ/мл	Менее 10 КОЕ/мл
Персонал 1	N_1, N_2	N_1, N_2	N_1, N_2
Персонал 2	N_1, N_2	N_1, N_2	N_1, N_2
Персонал 3	X_1, X_2	X_1, X_2	X_1, X_2

Повторяемость

Для определения повторяемости находят (что одно и то же):

- разность десятичных логарифмов КОЕ в первой и второй параллелях разведений;
- или рассчитывается относительное стандартное отклонение в логарифмических единицах – которое будет представлять собой стандартное отклонение повторяемости.

$$RSD_r = CV_r = \frac{SD \log_{10}(N_i)}{\log_{10}(N_i)}$$

Критерии приемлемости

Абсолютное допускаемое расхождение результатов N_1 и N_2 в логарифмических единицах, полученных в условиях повторяемости не должно быть больше 0,25.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

$$r = \log N_{1 \text{ паралель}} - \log N_{2 \text{ паралель}} \leq 0,25 \log \text{КОЕ}$$

или, что тоже, относительное стандартное отклонение в логарифмических единицах

$$RSD_r < 5 \%$$

Повторение процедуры измерений и расчет на другой день с тем же образцом с одной стороны подтверждает полученное стандартное отклонение повторяемости, с другой стороны дает данные для расчета воспроизводимости.

Воспроизводимость

Для определения воспроизводимости находят (что одно и тоже):

- разность десятичных логарифмов КОЕ в первый и второй дни;
- или отношение КОЕ в первый и второй дни.

Критерии приемлемости

При том что удовлетворяются критерии повторяемости для каждого среднего, десятичный логарифм разности средних значений не должен превышать 0,5

$$R = \log N_{1 \text{ день}} - \log N_{2 \text{ день}} \leq 0,45 \log \text{КОЕ}$$

или, что тоже самое, один результат не должен превышать другой более чем в два раза:

$$\frac{\bar{N}_{\text{большее}}}{\bar{N}_{\text{меньшее}}} < 2$$

Если полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости повторяемости и воспроизводимости, то считается что данные параметры верифицированы. Если же нет, то лаборатория не смогла подтвердить повторяемость и воспроизводимость метода, ей требуется провести соответствующие корректирующие действия и повторить верификацию.

5. Правильность (смещение метода)

Правильность количественного микробиологического метода может быть продемонстрирована путем приготовления суспензии микроорганизмов на верхнем конце диапазона метода, которая была последовательно разбавлена до нижнего конца диапазона метода.

Для многих аналитических методов используют искусственно контаминированную матрицу или материалы внутреннего контроля в качестве суррогатов истинного аналита для рутинного определения эффективности извлечения из образцов матриц и выявления помех в анализах. Однако, для микробиологических методов по возможности **следует избегать искусственной контаминации, чтобы контрольный материал не мешал обнаружению истинного аналита при низкой концентрации.**

Правильность

Существует всего две возможности для получения информации о правильности выполняемых методов – применение сертифицированных стандартных образцов и участие в программах проверки квалификации.

При испытаниях проб на правильность следует придерживаться **самых низких разведений в которых имеется 100% рост**, кроме тех случаев, когда провайдер рекомендует конкретное разведение.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Кроме этого, следует добиваться чтобы относительное стандартное отклонение повторяемости составило менее 5% (хотя верификационный критерий менее 10%).

Правильность (смещение) по сертифицированному стандартному образцу, рассчитывается в логарифмических единицах

$$\text{Bias\%} = \frac{\log C_{ref} - \log C_{lab}}{\log C_{ref}} * 100\%$$

Также может быть рассчитана степень восстановления:

$$\text{R\%} = \frac{\log C_{fact}}{\log C_{in}} * 100\%$$

Тогда смещение рассчитывается как

$$\text{Bias\%} = 100\% - \text{R\%}, \text{ где}$$

R% - степень восстановления - количество обнаруженных микроорганизмов в процентах от инокулированного.

$$\text{R\%} = \frac{\log(3,21 \cdot 10^4)}{\log(2,45 \cdot 10^4)} * 100\% = \frac{4,50}{4,38} * 100\% = 102,6 \%$$

$$\text{Bias\%} = 102,6\% - 100\% = 2,6\%$$

В приложении Е приведен пример сертификата на эталонный штамм.

В отчетах ППК может быть указан z или En индекс, интерпритация которых приведена в КЦА-ПА 14 ООС. Но также критерием приемлемости может служить критерий приемлемости повторяемости, т.е. относительное стандартное отклонение в логарифмических единицах не должно превышать более 5%.

$$RSD_r < 5 \%$$

7. Диапазон

Рабочий диапазон количественного микробиологического метода - это интервал между верхним и нижним уровнями микроорганизмов, которые, как было показано, определяются с правильностью, прецизионностью и линейностью. Как правило, рабочий диапазон подтверждается проведением ряда последовательных разбавлений.

Подтверждение линейности при удовлетворительных результатах верификации повторяемости и воспроизводимости при верификации метода для пищевой категории, для которой предназначен метод, не требуется

8. Неопределённость

Оценивание неопределенности подробно описано в [18], и в дополнительном разъяснении не нуждается. Для достоверной оценки неопределённости достаточно провести испытания в течении 10 дней.

Альтернативный подход основан на использовании данных верификации метода.

В этом случае план эксперимента выглядит следующим образом: три разных образца в пределах одной пищевой категории (3- разведения в двух параллелях согласно схеме рис. 5) – итого посев на 18 чашках:

	Менее КОЕ/мл	300	Менее 100 КОЕ/мл	10 КОЕ/мл		Результат	
1 образец	<input type="radio"/>	N ₁					
2 образец	<input type="radio"/>	N ₂					
3 образец	<input type="radio"/>	N ₃					

Такое же количество результатов выполняется вторым исполнителем (то есть еще 18 чашек).

Количество микроорганизмов, полученное каждым исполнителем переводится в логарифмический формат: $\log_{10}(N)$.

Для каждого образца и исполнителя рассчитывается стандартное отклонение (коэффициент вариации) по следующей формуле [45].

В абсолютных значениях \log КОЕ	В относительных единицах
$SD_i = SD \log_{10}(N_i)$	$CV_i = \frac{SD \log_{10}(N_i)}{\log_{10}(N_i)}$

Затем определяют объединенный (средневзвешенный) коэффициент вариации:

В абсолютных значениях \log КОЕ	В относительных единицах
$SD_{polled} = \sqrt{\frac{\sum SD_i^2}{n}}$	$RSD_{polled} = CV_{polled} = \sqrt{\frac{\sum CV_i^2}{n}}$

n – общее количество результатов, для которых усредняются коэффициенты вариации.

Расширенная относительная неопределенность для 95% -ного охвата рассчитывается как удвоенное значение объединенного коэффициента вариации.

В абсолютных значениях \log КОЕ	В относительных единицах
$U = 2 * SD_{polled}$	$U = 2 * RSD = 2 * CV_{polled}$
Чтобы рассчитать неопределенность измерения как расширенную неопределенность для любого последующего лабораторного результата с использованием расширенной неопределенности, результат сначала преобразуется в значение \log_{10} , а расширенная неопределенность, равная, добавляется и вычитается из логарифмического значения, образуя крайние точки интервала в котором находится результат исследования.	Чтобы оценить неопределенность для любого последующего лабораторного результата с использованием полученной расширенной неопределенности, сначала вычисляется результат, преобразуется в логарифм 10, умножается на относительную расширенную неопределенность. Затем эта расширенная неопределенность добавляется и вычитается из логарифмического значения, образуя крайние точки интервала в котором находится результат исследования.

Результат и неопределенность могут быть представлены как в логарифмических единицах, так и в виде интервала от наименьшего до наибольшего значений КОЕ.

Результат = 150 КОЕ/г, Преобразуем 150 в \log_{10} ; $\log_{10}(150) = 2,1761$
--

ПРИМЕР (с применением U в абсолютных значениях КОЕ)	ПРИМЕР (с применением относительной U)
$U (\log_{10} \text{КОЕ}) = 0,6696$ Сложение и вычитание 0,6696 из 2,1761 дает интервал от 1,5065 до 2,8457 в (\log_{10} (КОЕ)); преобразование обратно в количество дает: интервал неопределенности $10^{1,5065}$ до $10^{2,8457}$ от 32 до 701 КОЕ.	$U (\text{отн.}) = 0,3077$ Расширенная неопределенность в логарифмических подсчетах равна $2,1761 \times 0,3077 = 0,6696$ Далее интервал неопределенности рассчитывается как обычно.

ПРИМЕР 5: Верификация количественного метода на основании результатов участия в ППК:

Определить содержание St.aur в образце молочного продукта.

Во время испытаний в октябре 2023 получены следующие результаты посева:

	Разведения от первоначального 15 г продукта и 135 г воды (10 кратное разведение, d=0,1)				Содержание микроорганизмов в образце N, КОЕ/г	Содержание микроорганизмов в образце N (среднее для каждого лаборанта), КОЕ/г	logN
	100 КОЕ/мл	10 КОЕ/мл	Менее 10 КОЕ/мл	Менее 1 КОЕ/мл			
Результат	X ₁ , X ₂	X ₁ , X ₂	X ₁ , X ₂				
Лаборант 1	143; 257	16; 28	1; 3	0; 0	14414 25945	20180	4,30
Лаборант 2	156; 111	14; 12	1; 0	0; 0	15405 11081	13243	4,12
Лаборант 3	286; 181	38; 12	5; 0	0; 0	30540 17387	23964	4,38

Содержание микроорганизмов в образце, полученное первым лаборантом:

Для первой параллели чашек:

$$N_{11} = \frac{(143 + 16 + 1)}{1 \text{ мл} * (0,1 * 1 + 0,01 * 1 + 0,001 * 1) * 0,1} = \frac{160}{0,111 * 0,1} = \frac{160}{0,0111} = 14414 \text{ КОЕ/г или } 1,44 \cdot 10^4 \text{ КОЕ/г}$$

Для второй параллели чашек:

$$N_{12} = \frac{(257 + 28 + 3)}{1 \text{ мл} * (0,1 * 1 + 0,01 * 1 + 0,001 * 1) * 0,1} = \frac{288}{0,111 * 0,1} = \frac{288}{0,0111} = 25945 \text{ КОЕ/г или } 2,59 \cdot 10^4 \text{ КОЕ/г}$$

$$\bar{N} = \frac{14414 + 25945}{2} = 20180 \text{ КОЕ/г}$$

Аналогично рассчитывается количество микроорганизмов, полученное другими лаборантами.

Для этих результатов можно определить следующие эксплуатационные характеристики:

- 1. Повторяемость** для каждого лаборанта между 2-мя параллелями рассчитывается как расхождение выявленного количества колоний в условиях повторяемости:

$$r = \log N_{1 \text{ параллель}} - \log N_{2 \text{ параллель}} \leq 0,25$$

$$r = \log 14414 - \log 25945 = 4,16 - 4,41 = -0,26$$

- 0,26 ≤ ±0,25 т.е неравенство на пределе выполняется.

Аналогично проверяется повторяемость для всех лаборантов.

- 2. Воспроизводимость** рассчитывается как разность максимального и минимального результатов в логарифмических величинах

$$\log N_{\max} - \log N_{\min} = 4,38 - 4,12 = 0,26$$

- 0,26 ≤ ± 0,45 неравенство выполняется.

- 3. Правильность** может быть рассчитана после получения отчета о проверке квалификации. Например в отчете от 18.01.2024 устанавливается наиболее вероятное число микроорганизмов 2,2*10⁴ КОЕ/г.

В этом случае правильность для каждого лаборанта рассчитывается как

$$\text{Bias\%} = \frac{\log C_{\text{ref}} - \log C_{\text{lab}}}{\log C_{\text{ref}}} * 100\%$$

Bias% - смещение - количество обнаруженных микроорганизмов в процентах от значения проверки квалификации в логарифмических единицах. Например, для 1-ого лаборанта:

$$\text{Bias\%} = \frac{4,30 - 4,34}{4,30} = -0,9 \%$$

$$-0,9 \% \leq 5\%$$

- 4. Предел обнаружения LOD и предел количественного определения LOQ** определяется на основе полученных разведений.

	Лаборант 1		Лаборант 2		Лаборант 3			
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂		
Результат	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂		
100 КОЕ/г	143	257	156	111	286	181		
10 КОЕ/г	16	28	14	12	38	12	Сумма=	Рост на 100% чашек
10 КОЕ/г	1	3	1	0	5	0		Рост на 50% чашек
Менее 1 КОЕ/г	0	0	0	0	0	0		

$$LOD (X) = \frac{\text{Max}X(100\%) + \text{Min}X(50\% \text{ рост})}{2} = \frac{38+1}{2} = 19 \text{ КОЕ/г}$$

19 > 10, предел обнаружения не подтвержден.

или в log 10 КОЕ = log₁₀(19) = 1,28

$$LOQ = \frac{\sum X_i (100\% \text{ рост})}{\text{число чашек}} = \frac{120}{6} = 20 \text{ КОЕ}$$

20 > 15 – предел количественного определения также не подтвержден.

или в log 10 КОЕ = log₁₀(20) = 1,30

В данном примере получены достаточно большие пределы обнаружения и количественного определения, т.е. лаборатория не подтвердила предел обнаружения менее 10 КОЕ/г и пределе количественного определение не менее 15 КОЕ/г

3. Неопределенность может быть рассчитана с использованием этих же данных, а также данных рутинных испытаний естественно контаминированных проб молочных продуктов (мороженого, молока) за время ближайшее к участию в ППК (проба сухого молока), при выявлении таких проб, проводились параллельные испытания сразу 3-мя лаборантами. Например, были получены следующие данные:

№	Дата	Содержание микроорганизмов в образце N (среднее для каждого лаборанта), КОЕ/г			Содержание микроорганизмов в образце log N (среднее для каждого лаборанта), log КОЕ/г			Станд. отклонение	Коэф. вариации
		В	С	D	E	F	G		
		Лаборант 1	Лаборант 2	Лаборант 3	Лаборант 1	Лаборант 2	Лаборант 3	SD_i	CV_i
25	05.10.2023(ППК)	20180	13243	23964	4,30	4,12	4,38	0,13	0,031
26	16.10.2023	138500	263200	458390	5,14	5,42	5,66	0,26	0,048
27	21.11.2023	3568	1237	1567	3,55	3,09	3,20	0,24	0,074
28							SD pooled	0,219	0,054
29							$U=2*SD$	0,44	0,11

Для каждого образца и исполнителя рассчитывается стандартное отклонение (коэффициент вариации) по следующей формуле

В абсолютных значениях \log КОЕ	В относительных единицах
$SD_i = SD \log_{10}(N_i)$	$CV_i = \frac{SD \log_{10}(N_i)}{\log_{10}(N_i)}$
H25=СТАНДОТКЛОН.В(E25:G25)	I25=H25/CPЗНАЧ(E25:G25)

Затем определяют объединенный (средневзвешенный) коэффициент вариации:

В абсолютных значениях \log КОЕ	В относительных единицах
$SD_{pooled} = \sqrt{\frac{\sum SD_i^2}{n}}$	$RSD_{pooled} = CV_{pooled} = \sqrt{\frac{\sum CV_i^2}{n}}$
H28 = КОРЕНЬ(СУММКВ(H25:H27)/3)=0,219	I28=КОРЕНЬ(СУММКВ(I25:I27)/3)=0,054

n – общее количество результатов, для которых усредняются коэффициенты вариации. Расширенная относительная неопределенность для 95% -ного охвата рассчитывается как двойное значение объединенного коэффициента вариации.

В абсолютных значениях \log КОЕ	В относительных единицах
$U = 2 * SD_{pooled}$	$U = 2 * RSD = 2 * CV_{pooled}$
$U = 2 * 0,219=0,44 \log$ КОЕ	$U = 2 * RSD = 2 * 0,054=0,11 \text{ от } \log$ КОЕ

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

V.V. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Специфичность

Для демонстрации селективности и чувствительности тестируемый образец должен быть инокулирован штаммами конкретных исследуемых микроорганизмов, а также штаммами, которые считаются потенциально конкурентоспособными.

Для альтернативного качественного микробиологического метода проблема его способности обнаруживать ряд микроорганизмов, которые могут присутствовать в испытуемом материале, адекватно решается путем стимулирования роста в среде для качественных методов, которые основаны на росте, чтобы продемонстрировать присутствие или отсутствие микроорганизмов.

При валидации альтернативных микробиологических методик, принцип которых не основан на культивировании роста микроорганизмов, для оценки специфичности используют соответствующие вещества (например, внеклеточная АТФ, ДНК, ингибирующие соединения и др.), которые могут оказывать влияние на результат определения. Селективность анализа в этом случае гарантирует, что посторонние вещества в тест-системе не мешают тесту.

Для микробиологических методов, включающих стадию подтверждения, предполагаемый положительный результат принимается через культуральную процедуру и подтверждается как положительный или определяется как отрицательный. Другими словами, подтверждающие шаги позволяют реклассифицировать выборку как известную положительную или известную отрицательную. Таким образом, коэффициент селективности результатов после подтверждения всегда составляет 100%.

Это особенно важно с теми альтернативными методами, которые не требуют роста для подсчета микроорганизмов (например, любой, который не требует обогащения или может обнаружить микроорганизмы в диапазоне 1-50 клеток).

Робастность

Надежность качественного микробиологического метода является мерой его способности оставаться незатронутым небольшими, но преднамеренными изменениями параметров метода и служит показателем его надежности при нормальном использовании. Робастность - это параметр валидации, наиболее подходящий для определения поставщиком метода испытаний. Поскольку не существует согласованных стандартов для существующих методов, критерии приемлемости являются проблематичными и должны быть адаптированы к конкретной методике. Однако необходимо разработать оценку надёжности альтернативной процедуры. Мера надежности не обязательно является сравнением альтернативного метода с традиционным, а скорее необходимым компонентом проверки альтернативного метода, чтобы пользователь знал рабочие параметры метода.

Предел обнаружения

В случае сравнительной валидации, один из методов демонстрации предела обнаружения для количественных методов представляет собой оценку двух методов (альтернативного и референтного) путем инокуляции с низким числом целевых микроорганизмов (не более 5 КОЕ на единицу) с последующим измерением восстановления. Уровень инокуляции следует регулировать до тех пор, пока по крайней мере 50% образцов не покажут рост в референтном тесте. Необходимо повторить это определение несколько раз, так как предел обнаружения пробы определяется при повторных испытаниях (не менее 5).

Способность двух методов обнаруживать присутствие малых количеств микроорганизмов может быть продемонстрирована с помощью критерия Хи-квадрат.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 100 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

Предел количественного определения

Предел количественного определения - наименьшее количество микроорганизмов, которое может быть точно подсчитано. Поскольку невозможно получить надежный образец, содержащий известное количество микроорганизмов, важно, чтобы предел количественного определения анализа определялся из числа повторений ($n > 5$) в каждой из по меньшей мере 5 различных точек в рабочем диапазоне анализа. Предел количественной оценки не должен быть больше, чем у референтного метода. Альтернативный метод должен только продемонстрировать, что он по меньшей мере так же чувствителен, как и референтный метод к аналогичным нижним пределам.

Линейность

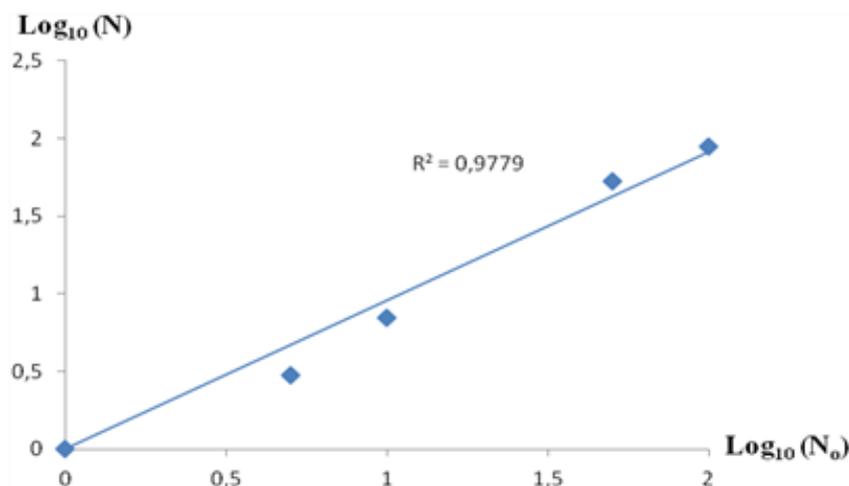


Рис. 31 График зависимости полученных результатов определения фактического содержания клеток (N) от инокулированных значений (N_0)

Для определения линейности могут быть взяты результаты из определения предела обнаружения. По полученным результатам рассчитывают логарифмы содержаний микроорганизмов и строят график зависимости $\bar{X}(1:1)$, $\bar{X}(1:10)$, $\bar{X}(1:100)$ от X_0 , $X_0 \cdot 10$, $X_0 \cdot 100$. Любой стандартный референтный метод является линейным. Поэтому при правильном его воспроизведении в лаборатории квадрат коэффициента корреляции R^2 должен **быть не меньше 0,98**.

При валидации референтного метода на другой матрице требуется обеспечить число степеней свободы характеристик прецизионности не менее 5 (6 повторов), т.е. требуется большее число разведений, и параллельных определений.

Правильность

Правильность альтернативного микробиологического метода заключается в близости результатов испытаний, полученных альтернативным методом испытаний, к значению, полученному референтным методом. Это должно быть продемонстрировано во всем рабочем диапазоне испытания. Правильность обычно выражается в процентах восстановления микроорганизмов методом анализа.

Рабочий диапазон альтернативного метода должен перекрывать диапазон действия референтного метода. Например, если альтернативный метод предназначен для замены референтного метода подсчета на чашках для жизнеспособных подсчетов, то разумный диапазон может составлять от 100 до 106 КОЕ на мл. По крайней мере 5 суспензий по всему диапазону теста должны быть проанализированы для каждого испытуемого организма. Альтернативный метод должен обеспечивать оценку жизнеспособных микроорганизмов не менее чем на 70% от оценки, обеспечиваемой референтным методом, или новый метод

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

должен быть продемонстрирован для восстановления по меньшей мере такого же количества организмов, как и референтный метод, путем соответствующего статистического анализа, примером которого является анализ ANOVA преобразования единиц \log_{10} точек данных. Следует отметить, что существует возможность того, что альтернативный метод может восстановить кажущееся большее число микроорганизмов, если он не зависит от роста микроорганизмов для образования колоний или развития мутности. Это определяется при оценке специфичности.

V.VI ВЕРИФИКАЦИЯ КОММЕРЧЕСКИ ДОСТУПНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ

В настоящее время широко распространены микробиологические экспресс тест системы. Как правило эксплуатационные параметры, коммерчески доступных микробиологических диагностические наборов полностью валидированы в соответствии с референтным методом, основанном на культивировании роста микроорганизмов.

Однако, каждая лаборатория должна выполнить внутрилабораторную верификацию для "первого использования" альтернативного метода, реализуемого тест системами [21]. Матрица, выбранная для проверки, должна быть одной из регулярно проверяемых в лаборатории. Для верификации используются шесть копий заражённой матрицы и шесть копий не привитой (чистой) матрицы.

Каждая заражаемая матрица, подлежащая испытанию, должна быть заражена на уровне, близком к пределу обнаружения, как правило, <30 КОЕ на анализируемый образец - 25 г продукта(или каких-либо других уровнях заражения, например, <30 КОЕ / 375 г композита) для определения наличия любых мешающих влияний со стороны матрицы.

Все 12 проб испытываются референтным методом и тест-набором. Если ложноположительные или ложноотрицательные результаты не получены (см. метод бинарной классификации), то альтернативный метод **проверяется таким же способом для каждой матрицы**, включённой в область применения метода.

Если из 6 проб наблюдаются ложноположительные или ложноотрицательные результаты, **тест-система не должна быть использована с данной матрицей**.

Для последующего использования метода лабораторные средства контроля качества **должны использоваться в каждом лоте** для подтверждения пригодности метода.

Описанные выше критерии проверки применимы только для продуктов питания, которые были частью валидационного исследования – **то есть только для тех матриц для которых рассчитана тест-система**.

Использованию тест-систем для пищевых матриц, которые не были включены в первоначальное валидационное исследование (то есть матрица не включена в область применения тест-набора) должно предшествовать исследование расширения пищевой матрицы.

V.VII ВАЛИДАЦИЯ РАСШИРЕНИЯ ПИЩЕВОЙ МАТРИЦЫ/БИОМАТЕРИАЛА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

Очень часто валидационные исследования не могут охватить все различные матрицы, а также невозможно предвидеть, какая матрица или матрицы будут задействованы в чрезвычайных ситуациях или в случае вспышки инфекционного заражения. В этих случаях заражённые образцы должны быть исследованы немедленно без предварительной валидации. Хотя обычно предполагается, что чем более тесно связана новая пищевая матрица с предварительно валидированной матрицей для обнаружения определенного аналита, тем больше вероятность того, что метод будет работать аналогично с новой матрицей, метод должен быть тем не менее проверен для всех новых матриц. Это делается для того, чтобы новая матрица не произвела высокий ложноположительный результат (матрица свободна от перекрестных реактивных веществ), ни высокие

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 102 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

ложноотрицательные показатели (матрица не содержит ингибирующих веществ). В случае возникновения подобной ситуации рекомендуется обязательно проводить «положительный» контроль: параллельно с испытуемым образцом проводить испытания заражённой чистой матрицы того же продукта[21].

Если существует множество пищевых матриц с различными физико-химическими свойствами то для верификации тест-системы выбираемое, количество продуктов для каждой матрицы образцов пищевых продуктов может быть одним или более.

Для валидации же тест-системы на новые типы пищевых матриц, используют 3-5 источников продуктов данной матрицы.

С учетом вышесказанного, для валидации тест-системы на новую для нее матрицу, требуется не менее 20 специально заражённых образцов (не менее 7 образцов каждого из не менее чем 3-х продуктов одной матрицы). Когда конкретный продукт дал как минимум семь положительных и никаких отрицательных результатов при использовании заражённой матрицы; или уровень достоверности > 95% (19 из 20 положительных), тест-система считается проверенной для данной матрицы.

После этого тест-систему можно использовать для этого продукта без дальнейшего положительного контроля с помощью заражённой матрицы.

Такой же подход применяется для расширения тест-системы на другой биоматериал.

VI ОСОБЫЕ АСПЕКТЫ ВАЛИДАЦИИ/ ВЕРИФИКАЦИИ НЕКОТОРЫХ ГРУПП МЕТОДОВ

VI.1 МЕТОДЫ КАЛИБРОВКИ

Валидация вновь разрабатываемых методов калибровки проводится в рамках ключевых сличений региональных метрологических организаций, в этой деятельности участвуют национальные метрологические институты. Вероятность того, что ООС КР будут участвовать в этой деятельности минимальна.

Эксплуатационные характеристики методов калибровки включают:

1. правильность в пределах заявленного диапазона;
2. внутрилабораторная воспроизводимость метода;
3. оценка неопределённости измерений (наилучшие измерительные и калибровочные возможности СМС (См. КЦА-ПЛ5).

1. Проверка правильности может выполняться одним из следующих способов:

- калибровка средства измерений или стандартного образца известной характеристикой;
- сопоставление результатов с более точным методом.
- участие в программах проверки квалификации или других межлабораторных сравнениях.

2. Внутрилабораторная воспроизводимость метода определяется путем сличений между специалистами, и расчет результатов с помощью критерия E_p .

При этом, если сопоставляются результаты калибровки, полученные с помощью одного и того же эталонного оборудования, или с помощью разного оборудования, но калиброванного в одной лаборатории, то критерием приемлемости предпочтительно принять E_p не более 0,7 – так как число факторов изменчивости результатов сокращается. Если, же используется разное эталонное оборудование, откалиброванное в разных лабораториях, то принимается критерий E_p менее 1.

3. Оценка неопределённости измерений проводится на основе принципов, изложенных в Руководстве по оценке неопределённости измерений (GUM), или на основе международных рекомендаций и руководств, описывающих оценку неопределённости измерений в специфических областях. Критерием приемлемости неопределённости измерений является 1/3 от допускаемой погрешности наилучшего средства измерений, которое может быть откалибровано. Например: При калибровке прессов для калибровки

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 103 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

прессов класса 0,5 (допускаемая относительная погрешность 0,5%) неопределенность измерений будет приемлема если она составит 1/3 от 0,5%, т.е не более 0,16%. Эту неопределенность целесообразно указывать в качестве наилучших измерительных возможностей СМС.

Если ООС использует международный метод калибровки, то такие методы не требуют валидации. Лаборатории только требуется верифицировать применение метода. Перечень стандартизованных методик, которые могут быть использованы для калибровки средств измерений весьма невелик. В связи с этим калибровочная лаборатория может разработать методику калибровки на основе имеющихся методов поверки. Однако, применяемые методы поверки в большинстве своём **не содержат информации об оценке неопределённости измерений**. В этом случае ООС требуется провести сравнительную валидацию метода в пределах применяемого диапазона **с лабораторией которая применяет международно-признанный метод**. Критерием приемлемости служит значение En индекса меньше 1.

Оценка неопределённости и технические детали процесса проведения калибровки описываются в процедурах калибровки. Процедура калибровки – это документ разрабатываемый, на основе международных, региональных рекомендаций и руководств в соответствующих областях измерений.

Процедура калибровки должна содержать как минимум следующую информацию:

- область применения (для калибровки каких средств измерений, в каком диапазоне, каким методом она предназначена);
- применяемое оборудование;
- список сокращений и математических символов;
- основные термины и определения;
- руководства, рекомендации, ГОСТ, МИ и др. документы на основе которых построена процедура;
- техника безопасного обращения с оборудованием при выполнении калибровочных работ в соответствии с данной процедурой;
- подготовка к калибровке (проверка условий окружающей среды, очистка СИ, акклиматизация, юстировка, если необходимо);
- поэтапное описание процесса калибровки;
- описание всех выполняемых расчётов, включая оценку неопределённости измерений. Если расчёты выполняются с помощью программного обеспечения, в том числе с использованием программы Excel, описание этапов вычислений, проводимых программой, описание выводимых ею результатов.
- выполнение юстировки, если она может быть необходима;
- формат сертификата калибровки;
- установить формат «Уведомления об отклонениях». в случае отклонений каких-либо параметров средства измерения, делающих невозможным продолжение его дальнейшей калибровки,
- маркировка СИ, если она проводится;
- форма ведения технических записей процесса калибровки.

VI. II МЕТОДЫ ФИЗИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

Методы физических измерений являются частным случаем методов калибровки. Часто такие методы являются методами прямых измерений. В этом случае неопределённость метода равна неопределённости применяемого для измерений средства измерения.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 104 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

В некоторых случаях, измерения не являются прямыми, а являются комбинацией измерений, получаемых разными приборами. В таких случаях, частью верификации является разработка модели измерения и оценки неопределённости согласно GUM. Для некоторых методов испытаний, например, определения электромагнитной совместимости (ЭМС), методы оценки неопределённости измерений уже разработаны.

Частью верификации методов измерений, также как и для методов калибровки является описание всех выполняемых расчётов, включая оценку неопределённости измерений. Если расчёты выполняются с помощью программного обеспечения, в том числе с использованием программы Excel, описание этапов вычислений, проводимых программой, описание выводимых ею результатов.

В силу специфики физико-механических методов, из перечисленных выше будут применимы следующие эксплуатационные параметры:

- повторяемость;
- внутри и межлабораторная воспроизводимость;
- правильность/смещение.

Специфичность для физико-механических методов – это свойства самого испытуемого объекта (материал, конструкция и др.). Например, тяжелые бетоны и пенобетоны имеют разную специфичность, что обусловлено их составом.

Проверка характеристик/параметров методов должна проводиться в соответствии с целевыми значениями, установленными в стандарте на метод измерения. Данная процедура рассматривается как **верификация метода испытания**.

Если стандарт на метод не имеет всех или некоторых целевых значений параметров рабочих характеристик метода, они должны быть установлены лабораторией на основе технических документов, публикаций или внутри/межлабораторного эксперимента.

Если перечисленные характеристики точности в методе не установлены, то их определение посредством внутри/межлабораторного эксперимента рассматривается как **валидация метода испытаний**.

Если метод был модифицирован, по отношению к стандартному методу, то требуется сопоставить средние значения результатов, получаемых с помощью двух разных методов. Для этой цели могут быть использованы En индекс или другие характеристики функционирования.

Эксплуатационный параметр	Методика определения	Критерии приемлемости
контроль правильности испытаний заложенный в методе (при наличии);	Некоторые методы, содержат критерии, в соответствии с которыми, можно сделать заключение о правильности выполнения метода	Соответствие поставленным критериям
повторяемость внутрилабораторная воспроизводимость	3 серии испытаний в 2-х параллелях в течении 3-х дней	$S_r, S_R \leq$ указанным в методе испытаний
межлабораторная и воспроизводимость/ правильность	Межлабораторные сличительные испытания Участие в программах ППК	значение $ En < 1$ $Z, \zeta \leq 3$.
неопределенность результатов измерений	Оценка неопределённости измерений аналитическим методом в соответствии с GUM	Если расширенная неопределенность U метода не сообщается заказчику, то $U \leq \frac{1}{3}$ интервала между

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

		градациями показателей* целевых
--	--	---

* Указанное требование может быть не применимо для всех методов физико-механических испытаний.

План эксперимента желательно разработать таким образом, чтобы число степеней свободы для получения стандартного отклонения повторяемости/ воспроизводимости было не менее 6. Из этих же данных могут быть рассчитаны средние значения, которые используют для сопоставления расхождения средних значений.

КАЧЕСТВЕННЫЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ

К методам качественных физико-механических испытаний относятся методы, которые выполняются с помощью или без помощи оператора, результаты которых оцениваются по шкале – «выдержал/не выдержал испытания». Например: испытания двигателей самолетов на работоспособность при попадании птиц, испытания на всевозможных испытательных стендах.

Для верификации качественных методов физико-механических испытаний должна быть рассмотрена вероятность обнаружения (POD) и потенциальная частота ошибок (см. раздел VI.II АНАЛИЗ РИСКОВ И ПРЕДПРИНИМАЕМЫЕ МЕРЫ). Проводится анализ в возникновения возможных ошибок, оценки риска их появления и разработки системы мер для их минимизации.

Определение внутриэкспертной и межэкспертной надежности не всегда возможно провести на идентичных объектах испытаний, если объекты являются крупными, сложными и дорогостоящими, или они теряют смысл, если испытания проводятся на стендах без участия оператора.

Одним из методов валидации является сравнение результатов испытания с реальными результатами в полевых условиях (а не только в условиях лаборатории), если это применимо. Например, эффективность теплоотдачи радиаторов для охлаждения двигателей может быть сопоставлена между лабораторными результатами, выраженными в соответствующих единицах и результатами полевых испытаний, которые показывают длительность работы двигателя без закипания охлаждающей жидкости. Эти результаты нельзя сравнить напрямую, но они отражают корреляцию теплоотдачи и эффективности работы двигателя, что может расцениваться как подтверждение (валидация) лабораторного метода испытаний теплоотдачи радиатора.

VI.III СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Селективность/специфичность

Аналитическая **селективность** диагностического анализа (которая определяется как доля образцов из известных неинфицированных эталонных образцов, которые отрицательно тестируются в анализе) может быть оценена с помощью панели образцов, полученных из образцов, подвергшихся воздействию генетически связанных организмов, которые могут стимулировать перекрестно-реактивные антитела, или сывороток из образцов с аналогичными клиническими проявлениями. Этот "анализ ближнего соседа" полезен для определения вероятности ложноположительных реакций в анализе. Также целесообразно документировать критерий групповой специфичности, который включает обнаружение интересующего анализита в сыворотках от субъектов, которые испытали инфекции / воздействие на всю группу или серотип интересующего организма. Также важно оценить аналитическую селективность анализа с использованием образцов от животных или людей (в зависимости от того, что применимо), которые были вакцинированы. Для проведения анализа может потребоваться различие между живым вирусом, вакцинированными штаммами и вирусными фрагментами в зависимости от

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 106 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

предполагаемого использования анализа. Если анализ нацелен на антитело, вызванное вирусом, вакцинация против этого вируса может произвести антитело, которое мешает выводам анализа об инфекции. Также, если вирусный антиген, используемый в анализе, получен из цельноклеточного вирусного культурального препарата, содержащего антигенные реагенты (белки-носители и др.) в дополнение к вирусу, вакцинированное животное или человек могут иметь ложно положительный результат теста из-за обнаружения невирусных антител.

Для диагностических методов, клиническая чувствительность и селективность (специфичность) должны также оцениваться в конкретных, местных популяциях пациентов (например, больница, сообщество пациентов), где это возможно.

2. Чувствительность

Аналитическая чувствительность диагностического анализа может быть оценена путем количественного определения наименьшего количества анализируемого вещества, которое обнаруживается в образце при приемлемом коэффициенте вариации. Это может быть сделано путем ограничения разведений стандарта анализируемого вещества известной концентрации. Однако доступность таких стандартов известной концентрации или активности (Международный стандарт) очень ограничена для обычных лабораторий.

Другой подход заключается в использовании анализа конечной точки разбавления образцов из известных положительных образцов, чтобы определить предпоследнее разбавление образца, в котором анализируемый аналит уже не обнаруживается или, по крайней мере, неразличим от активности отрицательных сывороток.

Когда результаты для разрабатываемого анализа сравниваются с результатами уже применяемого метода на тех же образцах, можно оценить относительную меру аналитической чувствительности.

3. Линейный диапазон

Диапазон значений, составляющих линейный рабочий диапазон диагностического анализа, может быть определен серией разведений, в которой высокая положительная сыворотка последовательно разбавляется отрицательной сывороткой. Каждое разбавление затем выполняется при оптимальном рабочем разбавлении в буфере и результаты строятся на графике. Стандарты сыворотки и другие реагенты могут быть использованы для согласования анализа с ожидаемыми результатами, полученными из эталонных реагентов известной активности. Внутренний контроль сыворотки (используемый для нормализации данных) и дополнительные вторичные стандарты сыворотки, такие как низкая положительная, высокая положительная и отрицательная сыворотки (используемые для оценки повторяемости в последующих рутинных запусках анализа), могут быть приспособлены к кривой ответа для достижения ожидаемых значений для таких сывороток.

4. Диапазон

Диапазон метода представляет собой интервал значений измерений от нижнего предела чувствительности на протяжении всего линейного участка градуировочного графика.

VI. IV МЕТОД ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Дополнительные термины, применяемые для метода ПЦР [48, 49]

Метод одноплексной ПЦР - метод анализа, позволяющий обнаружить единственную последовательность ДНК-мишени в одной реакции.

Метод мультиплексной ПЦР - метод анализа, позволяющий одновременно обнаружить две или более последовательности ДНК в одной реакции.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 107 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Метод ПЦР может состоять из нескольких этапов анализа (подготовка образца, извлечение/очистка ДНК, ПЦР-анализ и оценка данных), каждый из которых представлен одним или несколькими модулями. Один и тот же модуль может использоваться в разных методах.

Модули ПЦР, применяемые для обнаружения, идентификации и количественной оценки ГМО, подразделяются на следующие категории в зависимости от желаемой специфичности к целевому объекту:

Модуль, специфичный для таксона - модуль, который обнаруживает последовательность, которая, как известно, специфична для целевого таксона.

Примечание: целевая последовательность должна постоянно присутствовать в целевом таксоне и отсутствовать в других таксонах. В случае, если модуль предназначен для количественных целей, предпочтительно наличие целевой последовательности в виде единственной копии в геноме таксона.

Модуль, специфичный для конкретного элемента - модуль, предназначенный для одной дискретной последовательности ДНК.

Примечание: Генетический элемент может быть, например, промотором, терминатором, интроном или кодирующей частью гена. Элементы часто являются производными от встречающихся в природе вирусов, бактерий, растений и т.д. Положительный результат теста с использованием модуля, специфичного для конкретного элемента, иногда, но не всегда, является подтверждением наличия в образце ДНК, полученной из ГМО.

Модуль, специфичный для конструктора - модуль, который нацелен на вставленную последовательность ДНК, состоящую, по меньшей мере, из двух элементов, которые естественным образом не сосуществуют в этой конформации, и в котором 5'- и 3'-концы последовательности получены из двух отдельных элементов.

Событийно-специфический модуль - модуль, который нацелен на последовательность, уникальную для одного события генетической модификации. Примечание: Событийно-специфическая последовательность является признаком конкретного ГМО и создается de novo, когда конструкция интегрируется в геном реципиента. Специфичные для события последовательности обычно, но не всегда, являются областями, граничащими с интеграцией, т.е. последовательностью слияния, состоящей из концевых пар оснований встроенной ДНК и соседних пар оснований генома хозяина-реципиента в месте вставки. Специфичная для конструкции целевая последовательность не может быть привязана к конкретному событию, поскольку одна и та же конструкция может многократно использоваться для разработки новых событий генетической модификации.

Идентификация - тест с целью проверки наличия или отсутствия определенного ГМО (явления) в образце.

Примечание: Идентификация может проводиться одновременно с количественным определением, но идентификация всегда является качественной характеристикой.

Количественная оценка - тест с целью определения количества целевой последовательности (тей).

Специфика верификации ПЦР состоит из двух особенностей:

- во-первых, это специфика расчета количественных результатов ПЦР, связанная с тем, что результат ПЦР зависит от отношения двух случайных величин,

- во-вторых, это связано с тем, что методика ПЦР состоит из двух модулей – модуль выделения и модуль обнаружения специфичных последовательностей собственно методом ПЦР, оба эти модуля требуются верифицировать.

Цикл количественной оценки (Cq), также известный как пороговый цикл (Ct), определяется как дробный номер цикла, при котором флуоресценция, генерируемая амплификацией ДНК-мишени в эксперименте ПЦР в реальном времени, достигает фиксированного порога и, таким образом, позволяет количественно определить количество ДНК-мишени.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

Репликации экстракции ДНК - ДНК, выделенная из разных тестируемых порций одного и того же аналитического образца.

Динамический диапазон - Диапазон концентраций, при котором метод **обеспечивает линейную корреляцию** между результатами измерения и количеством исследуемого вещества с приемлемым уровнем правильности и точности.

Вероятность обнаружения (POD) - Вероятность положительного (т. е. обнаружения присутствия) аналитического результата для качественного метода для данной матрицы при данной концентрации. Его оценивают по ожидаемому соотношению положительных и отрицательных результатов для данной матрицы при данной концентрации аналита.

Практический предел обнаружения (практический LOD) - это наименьшее количество ГМО, выраженное как массовая доля или соотношение числа копий ДНК, которое можно надежно обнаружить в образце, когда известное количество копий генома таксона (ингредиента) определено или оценено.

Практический предел количественного определения (практический LOQ)

это наименьшее количество ГМО, выраженное как массовая доля или соотношение числа копий ДНК, которое можно надежно определить количественно в образце, когда известное количество копий генома таксона (ингредиента) определено или оценено.

Рабочая концентрация ДНК - Наивысшая концентрация ДНК, предназначенная для использования в ПЦР-анализе.

Эффективность усиления - скорость амплификации, рассчитанная по наклону стандартной кривой, полученной после десятичного полулогарифмического графика значений Ct в зависимости от количества копий ДНК. Эффективность (в %) может рассчитана с помощью следующего уравнения:

$$\text{Эффективность} = (10^{-1/\text{наклон}} - 1) \times 100$$

I. Модуль выделения ДНК

I.1 Извлечение и очистка ДНК

Оценка методов выделения ДНК является решающим шагом, поскольку качество и количество экстрагированной ДНК могут существенно повлиять на конечный результат. Метод выделения ДНК следует оценивать на ряде репрезентативных материалов и обеспечивать ДНК подходящего качества и количества для последующего анализа.

Метод выделения ДНК следует применять к тому же материалу, что и для валидационного исследования, а также к репрезентативным образцам, которые предполагается анализировать. Даже если метод выделения ДНК ранее был апробирован на конкретной матрице, экстракцию ДНК следует проводить не менее двух раз (рекомендуется трижды) на двух независимых тестовых порциях, по возможности в разные дни и с разными операторами. Экстрагированная ДНК должна соответствовать критериям приемлемости по концентрации и качеству ДНК1 (например, путем контроля эффективности амплификации и присутствия ингибиторов с помощью ПЦР в реальном времени).

Методы экстракции ДНК, примененные к одной матрице, могут оказаться непригодными для других матриц. Эту процедуру может потребоваться выполнить на разных матрицах. Для проверки метода выделения ДНК тестируемая матрица не обязательно должна содержать ГМО.

I.2 Концентрация ДНК

Концентрацию ДНК можно поределить тем же методом, который предусмотрен для анализа образцов. Метод должен обеспечивать получение ДНК в количестве, подходящем для предполагаемого анализа (по крайней мере, достаточном для соответствия практическим требованиям LOD/LOQ). При необходимости, выход должен быть сопоставим с результатами, полученными в ходе валидационного исследования.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Если метод экстракции ДНК не дает соответствующего результата для предполагаемого анализа на конкретной матрице, это влияет на практические эксплуатационные характеристики анализа.

1.3 Чистота извлеченной ДНК

Процедуры экстракции ДНК позволяют исключить или значительно сократить количество веществ, ингибирующих ПЦР. Однако конечное количество ингибиторов в образце во многом зависит от природы образца и применяемой процедуры экстракции. Растительный материал может содержать вторичные метаболиты, такие как полифенолы, масла и полисахариды, которые могут образовывать комплексы с нитями ДНК, и в процессе выделения ДНК могут быть добавлены ингибиторы: KCl и NaCl, ионные детергенты, этанол, изопропанол и фенол и др. Таким образом, выделение ДНК может привести к дополнительной очистке от веществ, которые ингибируют реакцию ПЦР, что приводит к отсутствию или снижению скорости амплификации. В первом случае могут быть получены ложноотрицательные результаты или, как и во втором случае, количественное определение анализируемого вещества может быть занижено.

Поэтому лаборатории необходимо убедиться в том, что процедура извлечения ДНК гарантирует удаление таких ингибиторов.

Наличие или отсутствие ингибиторов ПЦР можно проверить, протестировав различные разведения, приготовленные из раствора ДНК, таким образом, чем больше раствор ДНК разбавлен, тем меньше концентрация ингибиторов.

Два или более уровня разведения должны быть протестированы с использованием валидированной системы сравнения, специфичной для конкретного таксона (например, лектин для ДНК сои), при этом первый уровень разведения представляет собой "рабочую концентрацию ДНК", т.е. общее количество ДНК за реакцию, предназначенное для использования в процессе верификации и в рутинном анализе.

Для этого устанавливается соответствие между разбавлениями и различиями значений числа циклов C_t , соответствующих удвоению концентрации кодирующей нити ДНК, рассчитанным в предположении отсутствия ингибиторов ПЦР.

Значения, полученные из двух линейных разбавлений, должны быть пропорциональны определенному различию C_t и ΔC_t , например, теоретическое значение ΔC_t для разведения 1:4 составляет 2,0.

Критерий приемлемости: Разница между измеренным значением ΔC_t и теоретическим значением ΔC_t (2,0) образца должна быть $<0,5$.

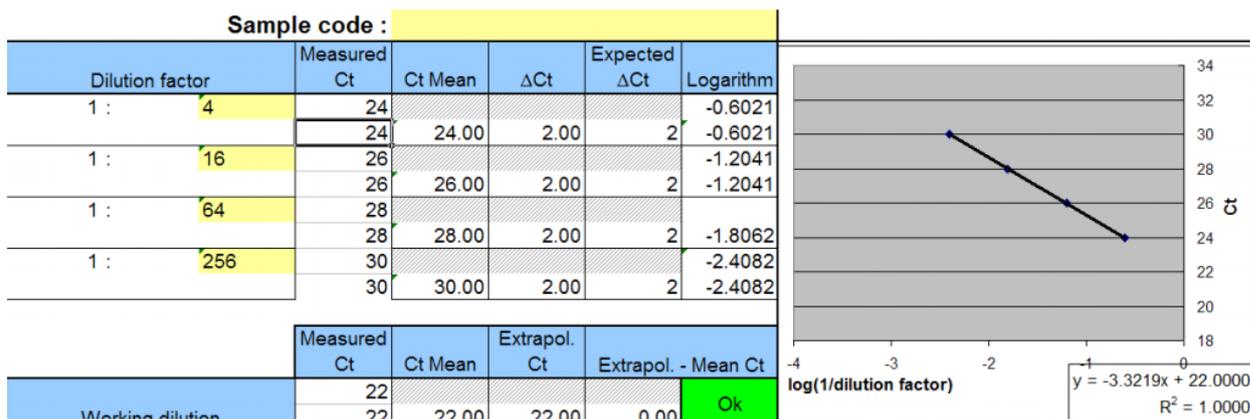
ПРИМЕР:

Качество ДНК (относительное отсутствие ингибиторов ПЦР) можно продемонстрировать путем анализа двух повторов ПЦР с использованием четырех точек четырехкратного серийного разведения (1:4, 1:16, 1:64 и 1:256) каждого повтора выделения ДНК (тесты ингибирования) с использованием системы отчета, специфичной для таксона. Экстракт ДНК сначала доводят до уровня, соответствующего самой высокой концентрации ДНК, предназначенной для использования в последующем методе ПЦР, так называемому «неразбавленному» образцу (рабочая концентрация ДНК). Из этой первой пробы готовят серию четырехкратных разведений (от 1:4 до 1:256). Для оценки присутствия ингибиторов значения C_t четырех серийно разведенных образцов наносят на график в зависимости от логарифма коэффициента разведения и рассчитывают уравнение с помощью линейной регрессии. Значение C_t «неразбавленного» образца, экстраполированное на основе линейной регрессии, сравнивается с значением C_t , измеренным в том же образце.

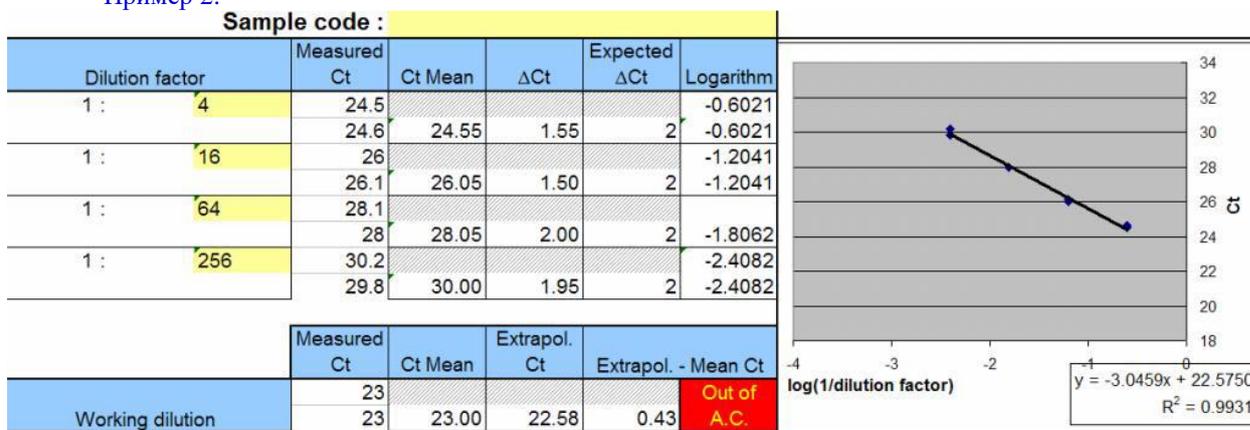
Для принятия экстрактов ДНК должны быть выполнены три условия:

- наклон линии регрессии должен находиться в пределах от -3,6 до -3,1;
- коэффициент детерминации (R^2) равен или превышает 0,98;
- разница между измеренным C_t и экстраполированным значением C_t (ΔC_t) должна составлять менее 0,5.

Пример 1:



Пример 2:



ДНК ингибируется. Даже несмотря на то, что ΔCt не превышает предела 0,5 (хотя оно близко к этому значению), неудовлетворительное качество ДНК демонстрируется задержкой начала реакции (Ct) для неразбавленного образца и образца, разбавленного 1:4. Последнее влияет на наклон, выраженный серийным разбавлением, который выглядит более пологим, чем приемлемо (-3,0).

Другие примеры и Excel файл для расчета ингибирования ДНК доступно на сайте <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidance-documents> “WG-MV-supplementary-Information (1).zip”

Если экстрагированная ДНК содержит ингибиторы, ДНК необходимо дополнительно очистить или разбавить до уровня, при котором не наблюдается ингибирования реакции ПЦР, прежде чем ее использовать для ПЦР в реальном времени.

Однако в некоторых случаях ингибиторные соединения, присоединенные к фрагментам ДНК, могут не устраняться при разбавлении образца, что приводит к получению меньшего количества копий ДНК, доступных для амплификации, чем ожидалось при номинальной концентрации ДНК в образце.

II Модуль ПЦР

Правильный расчет содержания целевой ДНК, например, ГМО и его стандартного отклонения с помощью ПЦР-анализа в большинстве экспериментов представляет собой двухэтапный процесс, объединяющий средние значения, которые рассчитываются двумя различными способами. Процедура, подробно описанная ниже, начинается с измерения значений числа копий целевого и эталонного генов. По результатам этих испытаний рассчитывается оценка содержания ГМО и стандартное отклонение. Большинство экспериментальных процедур позволяют получить несколько таких значений (например,

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

по результатам испытаний на одной и той же или разных планшетах) содержания ГМО и стандартного отклонения.

Эти оценки могут, если необходимо и целесообразно, быть объединены стандартным способом, например, путем вычисления среднего арифметического в случае содержания ГМ-днк.

Оценка среднего значения, стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения повторяемости содержания целевой ДНК, например ГМО, методом ПЦР в реальном времени (только для количественных методов)

Определение содержания ГМ-днк по количеству копий целевого и эталонного генов

Для определения процентного содержания ГМ-ДНК в образцах в режиме реального времени требуются два анализа ПЦР: один анализ используется для определения числа копий последовательности ДНК-мишени ГМ (X), другой - для определения числа копии эндогенного эталонного гена последовательности ДНК (Y). Оценка процентного содержания ГМО получается с использованием следующего соотношения

$$\%GM = \frac{\text{число копий целевой ДНК}}{\text{число копий эталонной ДНК}} \quad (1)$$

$$100 = \frac{X}{Y} 100 \quad (2)$$

В этом выражении и X и Y являются случайными величинами. Стандартной практикой является проведение анализов для целевого и эталонного генов в дубликатах, тройках и т.д. Это приводит к получению 2, 3 и т.д. результатов теста для ГМ-последовательности ДНК-мишени и 2, 3 и т.д. результатов теста для эталонной геновой последовательности ДНК-мишени, и все, что требуется, - это вычисление среднего ГМ-процентного содержания из этих двух наборов результатов теста. К сожалению, не существует точной формулы для определения среднего значения и дисперсии отношения случайных величин, но существуют приближенные формулы. Среднее значение, обозначаемое $E[Y]$, и дисперсия отношения независимых случайных величин аппроксимируются формулой

$$E \left[\frac{X}{Y} \right] \approx \frac{\bar{x}}{\bar{y}} + \frac{\bar{x}}{\bar{y}^2} var(y) \quad \text{- среднее значение результата (3)}$$

и

$$var \left[\frac{X}{Y} \right] \approx \left(\frac{\bar{x}}{\bar{y}} \right)^2 \left(\frac{var(x)}{\bar{x}^2} + \frac{var(y)}{\bar{y}^2} \right) \quad \text{- вариация (дисперсия) результата (4)}$$

Где, \bar{x} – среднее арифметическое значений целевых копий генетической ДНК и среднее арифметическое значений эталонных копий ДНК. Эти приближения предполагают, что корреляция между X и Y отсутствует. Стандартное отклонение определяется как

$$SD \left[\frac{X}{Y} \right] = \sqrt{var \left[\frac{X}{Y} \right]} \quad \text{- стандартное отклонение результата (5)}$$

ПРИМЕР: Для ниже представленных результатов извлечения 1

ген-мишень ГМО		Эталонный ген	
Сt	Число копий	Сt	Число копий
24,41	16 119	21,30	156 758
24,61	13 954	21,18	171 196

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Расчеты по вышеприведенным формулам дают

$$\bar{x} = 15036,97, \bar{y} = 163977, \text{var}(x) = 2343612.5 \text{ и } \text{var}(y) = 104227922$$

Подстановка соответствующих значений в уравнение (2) дает среднее значение GM1, равное 0,092 или 9,2 %; использование уравнения (4) с приведенными выше значениями и извлечение квадратного корня (уравнение 5) дает стандартное отклонение SD1, равное 0,010943.

Для извлечения 2

ген-мишень ГМО		Эталонный ген	
Ст	Число копий	Ст	Число копий
25,50	13 405	21,10	172 089
25,44	14 000	21,19	160 907

Расчеты по вышеприведенным формулам дают

$$\bar{x} = 13702,5, \bar{y} = 166498, \text{var}(x) = 177012,5 \text{ и } \text{var}(y) = 62518562$$

Подстановка соответствующих значений в уравнение (2) дает среднее значение GM2, равное 0,082 или 8,2 %; использование уравнения (4) с приведенными выше значениями и извлечение квадратного корня (уравнение 5) дает стандартное отклонение SD2, равное 0,004654.

Комбинирование плашек

Вся эта процедура повторяется на четырех разных пластинах, в результате чего в дополнение к GM₁, GM₂, SD₁ и SD₂ получаются значения GM₃, GM₄,..., GM₈ и стандартные отклонения SD₃, SD₄,..., SD₈.

Затем можно рассчитать общее среднее значение выборки, взяв среднее арифметическое из GM₁... GM₈, т.е.

$$\overline{GM} = \frac{\sum GM_i}{8}$$

Используя n в качестве количества повторов на извлечение (n = 2 в этом примере) и k в качестве количества отдельных стандартных отклонений, которые должны быть объединены (здесь k = 8), стандартное отклонение общего среднего значения рассчитывается как средневзвешенное стандартное отклонение

$$SD_{GM} = \sqrt{\frac{\sum(n_i - 1) \cdot SD_i^2}{\sum(n_i - k)}}$$

в данном примере слагаемое в знаменателе равно 16 – 8 = 8. Стандартное отклонение относительной повторяемости

$$RSD_r = \frac{SD_{GM}}{GM} \cdot 100$$

1. LOQ

LOQ может быть определен для некоторого соотношения, т.е. массовой доли или отношения числа копий ДНК (относительный LOQ - LOQ rel), а также для количества измеримых копий ДНК (абсолютный LOQ - LOQabs).

Проводится серия разведений с известным количеством копий для каждой реакции, по крайней мере, в 10 ПЦР-повторах (например, 80, 60, 40, 20, 10, 5 копии и 1 копия на реакцию). Затем рассчитывается RSD_r для каждого уровня разбавления. LOQabs рассчитывается как последний уровень разбавления, при котором RSD_r по результатам измерений составляет менее 25 %. Стандартная кривая метода должна включать LOQabs.

Распределение вероятностей предполагает, что анализ по 1 копии на реакцию должен давать примерно 30 % отрицательных результатов. Чтобы убедиться в том, что целевые копии для каждой реакции серии разведений приблизительно верны, по крайней

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

мере, 1/10 реплик должны давать отрицательные результаты для анализа по 1 копии на реакцию.

Критерий приемлемости: LOQ должен быть \leq наименьшего количества копий на реакцию или соотношения, включенного в динамический диапазон.

2. LOD

Предел обнаружения может быть определен для некоторого соотношения, т.е. массовой доли или отношения числа копий ДНК (относительный LOD – LODrel), а также для количества измеримых копий ДНК (абсолютный LOD - LOD abs).

Чтобы оценить эффективность метода с 95%-ной достоверностью, необходимо проанализировать не менее 60 ПЦР-повторов для каждой тестируемой концентрации.

Поскольку это может оказаться неосуществимым, для проверки LOD можно использовать прагматичный подход, основанный на меньшем количестве повторов. Этот подход позволяет приблизительно оценить LOD.

Процедура определения относительного LOD (LODrel): референтный материал с низким содержанием искомой ДНК (например, ГМО) может быть измерен, например, в 10 ПЦР-повторах, и если все повторы положительные, это означает, что уровень содержания LODrel ниже или равен этому уровню. При необходимости может быть подготовлен референтный материал определенного уровня, см. Расчет промежуточных концентраций ГМО, ниже.

Критерий приемлемости: LODrel должен соответствовать валидационным данным. Для ГМО LODrel должен быть меньше 0,045 % м/м с уровнем достоверности 95%.

Процедура определения абсолютного LOD (LODabs): Серии разведений, представляющие диапазон выше и ниже ожидаемых значений LODabs, основанные на предварительных знаниях о LODabs в этом методе, тестируются, например, в 10 ПЦР-повторах для каждого уровня концентрации. **Самая низкая концентрация, при которой все повторы являются положительными, - это предполагаемая концентрация LODabs.** Корректность определения LOQabs, в тестируемой серии разведений может быть подтверждена результатами анализа образца с содержанием 1 копии на реакцию (см. приведенные выше LOQabs). LODabs не может быть меньше 3 копий на реакцию.

LOD должен соответствовать валидационным данным и/или < 25 копий с уровнем достоверности 95%.

Для качественных методов LOD определяется следующим образом: 10 повторов ПЦР с низким содержанием (например, 20, 10, 5 копий и 1 копия на реакцию). LOD тогда является самым низким содержанием в серии, где все реплики положительны. При этом, если все 10 повторов для разведения 1 копия/реакция положительны, содержание ДНК следует повторно оценить, поскольку оно, вероятно, выше ожидаемого.

Расчет промежуточных концентраций ГМО

Некоторые референтные материалы, (например, ГМО) доступны только в одной или нескольких ограниченных концентрациях. Возможно, потребуется смешать положительный материал с материалом, не содержащим ГМО, для получения других концентраций ГМО, например, для определения относительных значений LOQ и LOD.

Это можно сделать, измерив содержание эталонного гена для ГМ-положительного и -отрицательного препаратов ДНК на одном и том же планшете с использованием одной и той же стандартной кривой. После этого коэффициент разведения для двух препаратов ДНК можно рассчитать по следующей формуле:

$$X = \left(\frac{A}{B}\right) (Y - 1) + 1$$

A = номер копии эталонного гена для ГМ-положительного препарата ДНК

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 114 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

V = номер копии эталонного гена для ГМ-негативного препарата ДНК

Y = теоретический коэффициент разведения,

например, от 100% ГМ до 10% ГМ = 10x

ПРИМЕР:

ДНК А = 100 % ГМО, ДНК В = 0 %

В каждую лунку для ПЦР-анализа А и В добавляют по 5 мкл ДНК

Проводят количественное определение как неизвестного образца на кривой на калибровочной кривой эталонного гена

Результат:

А (из ДНК А): 10000 копий/5 мкл

В (из ДНК В): 8000 копий/5 мкл

Чтобы получить 10 % ГМО из 100 % ГМ, необходимо разбавить его в 10 раз (теоретически $Y = 10$).

X следует использовать так же, как Y , при расчете смешиваемых объемов. Если $X=12,25$, то практический коэффициент разведения $X: (10\ 000/8\ 000) \cdot (10-1) + 1 = ((10\ 000/8000) \cdot 9) + 1 = 11,25 + 1 = 12,25$, поэтому 1 мкл А должен быть смешан с 11,25 мкл В.

После объединения двух препаратов ДНК, раствор ДНК необходимо тщательно перемешать.

Для приготовления дальнейших разведений:

1 % ГМ можно получить, разбавив приготовленный 10 % раствором в соотношении 1:10.

0,1 % ГМ можно получить, разбавляя приготовленный 1 % раствором в соотношении

1:10.

Концентрация ДНК в 10-кратном разведении образца близка к концентрации исходного 0 % препарата ДНК, и эту концентрацию можно использовать при расчете дальнейших разведений.

Правильность смесей можно проанализировать, используя 100% смесь для стандартной кривой и анализируя 3 образца в трех экземплярах по 3 раза.

Дополнительные критерии приемлемости LOD для модулей мультиплексной качественной ПЦР

LODasum для каждого модуля метода мультиплексной ПЦР определяется путем тестирования его мишени аналита в низком количестве или концентрации (соответствующей или близкой к абсолютному LOD, т.е. не более 25 копий/реакцию) в присутствии увеличивающихся количеств другой мишени. (ы), которые амплифицируются параллельно другим модулем(ями) в мультиплексном анализе. Количество других мишеней не должно превышать 20 000 копий/реакцию.

LODasum выражается в абсолютных количествах копий/реакций и дается для соответствующего количества другой мишени, использованной в тестах.

LODasum уже должен быть исследован в контексте валидации метода. Для верификации должна быть протестирована хотя бы одна из наиболее критичных комбинаций по данным валидации. Рекомендуется тестировать целевой аналит при низком количестве (близком к абсолютному уровню обнаружения, но не ниже) в присутствии большого количества другой мишени(ей), например, не более 25 копий/реакцию целевой последовательности в наличие целевой ДНК, амплифицированной параллельно другим ПЦР-модулем(ями). Количество других мишеней не должно превышать 20000 копий/реакцию.

Критерий приемлемости: LODasum должен соответствовать валидационным данным.

2. Специфичность

Специфичность конкретного анализа уже должна быть исследована в контексте валидации метода.

Следовательно, нет необходимости повторно исследовать специфичность в проверочном исследовании, если условия анализа (например, концентрация праймеров/пробы; температура отжига; флуоресцентный краситель) не изменились.

3. Динамический диапазон, коэффициент R2 и эффективность усиления

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 115 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Динамический диапазон должен соответствовать значениям, ожидаемым для конкретного применения. В пределах динамического диапазона стандартные кривые должны соответствовать критериям приемлемости для эффективности усиления и R^2 .

Динамический диапазон, коэффициент R^2 и эффективность усиления проверяются одновременно по стандартным кривым при верификации других параметров, таких как правильность и прецизионность. Следует использовать средние значения по крайней мере двух стандартных кривых (подробнее см. таблицу 1).

Пример: Динамический диапазон от 0,09 % (м/м) до 4,5 % (м/м) для целевой концентрации ГМО 0,9 % (м/м) или от 50 до 2500 копий/реакция, если целевой показатель составляет 500 копий/реакцию.

Приемлемый критерий эффективности усиления: Среднее значение наклона стандартной кривой должно находиться в диапазоне $-3,6 \leq \text{наклон} \leq -3,1$, что соответствует эффективности усиления 90-110%.

Критерий приемлемости коэффициента R^2 : среднее значение R^2 должно составлять ≥ 0.98 .

4. Правильность

Правильность должна определяться на уровне содержания, близком к уровню, установленному законодательством (например, пороговое значение 0,9 % по массе ГМО), или в соответствии с предполагаемым использованием метода и, при необходимости, дополнительно на уровне, близком к LOQ. Правильность можно оценить с помощью CRM. Обычно следует исследовать две концентрации (например, 0,1 % и 1 % м/м) и, если возможно, третью концентрацию в верхней части динамического диапазона (например, 5 % м/м). В качестве альтернативы можно приготовить эталонный образец, предпочтительно из CRM с более высокой концентрацией.

Используемая аналитическая процедура, включая объем реакции, инструмент для ПЦР и т.д., должна быть такой же, как и при обычном тестировании образцов. Необходимо оценить результаты по крайней мере 16 повторений ПЦР. Примеры возможных схем тестирования приведены на рисунке 32.1.

Если CRM-системы для оценки правильности отсутствуют, можно использовать материалы для проверки квалификации с достаточной характеристикой. Однако присвоенное значение ПК материала должно быть эталонным значением, независимо установленным вне схемы ПК, т.е. содержание ГМО, установленное на основе "консенсусного значения по результатам участников", не подходит для оценки правильности.

Критерий приемлемости: Правильность результатов измерений лаборатории должна находиться в пределах $\pm 25\%$ от принятого опорного значения или Z-индекс менее

5. Повторяемость

Повторяемость может быть определена аналогичным образом, как описано в разделе "Правильность". Относительное стандартное отклонение повторяемости рассчитывается на основе результатов, полученных при повторном проведении ПЦР в условиях повторяемости. Повторяемость должна быть получена для всех тестируемых уровней содержания аналита (например, ГМО).

Используемая аналитическая процедура должна быть такой же, как и при обычном тестировании образцов. Необходимо оценить не менее 16 результатов отдельных тестов. Примеры возможных схем тестирования приведены в на рисунке 32.1.

Критерий приемлемости: RSD_r должен составлять $\leq 25\%$ в динамическом диапазоне метода.

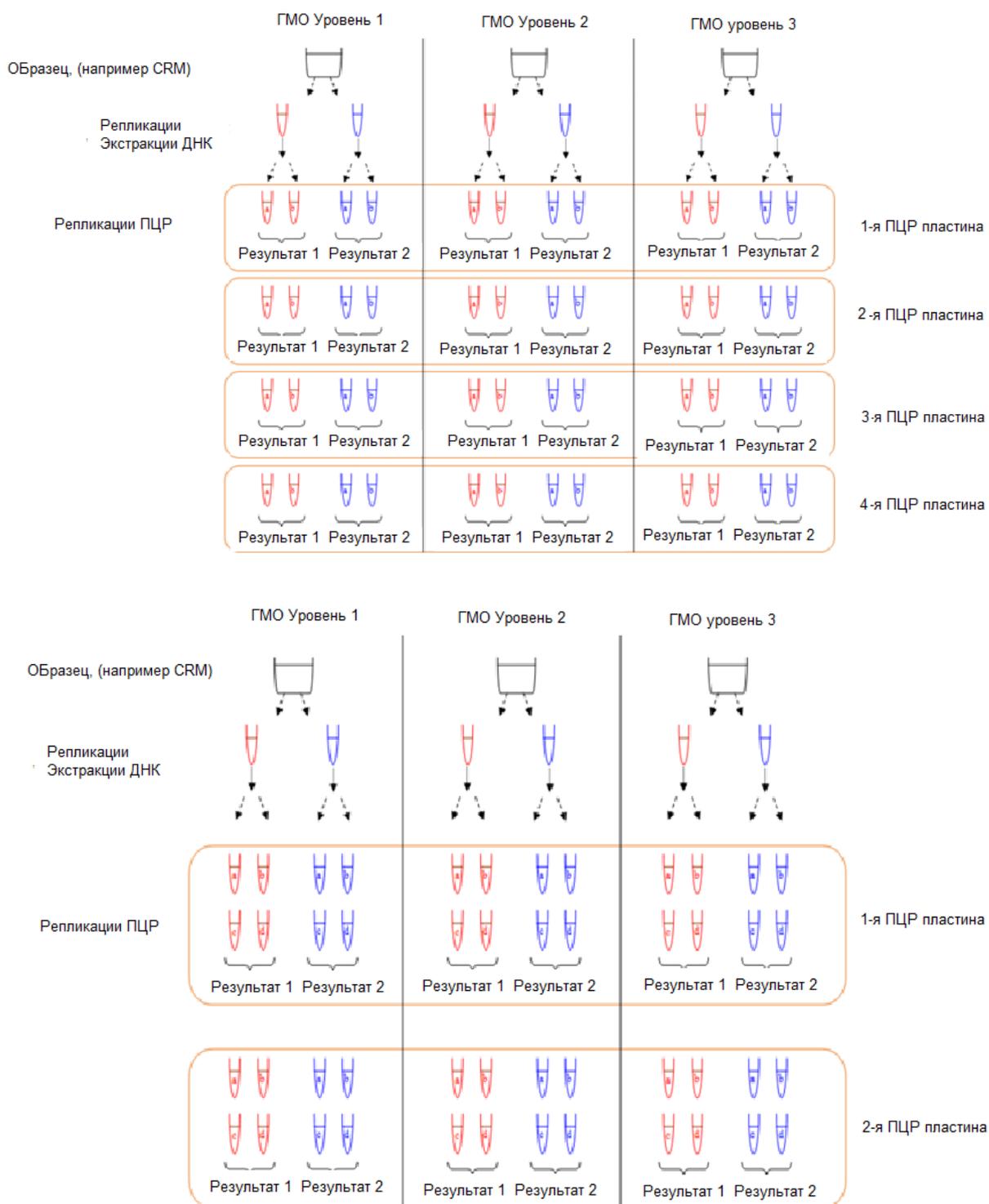


Рис.32.1 Пример экспериментального дизайна для верификации правильности и прецизионности
2. Неопределенность

Для оценки неопределённости в процессе внутрилабораторного эксперимента по валидации используется подход черного ящика.

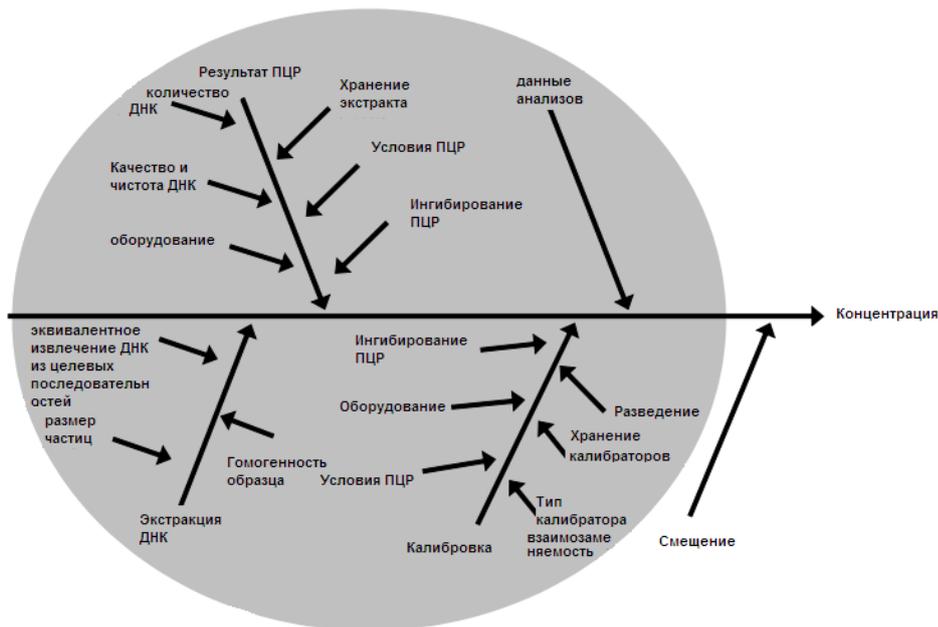


Рис.32.2 Причинно-следственная диаграмма примеров возможных вкладов в неопределённость измерения для количественного определения ДНК методом ПЦР в реальном времени. Вклады в воспроизводимость заштрихованы серым цветом.

Используется тот же подход, что и в микробиологических исследованиях – из каждой рутинной пробы проводятся параллельные испытания в условиях внутри лабораторной воспроизводимости: то есть обеспечивается максимальная изменчивость между результатами параллельных испытаний: испытания проводят на двух разных приборах, если они применяются оба для данного вида испытаний, испытания проводят два специалиста, используются разные партии реактивов и т. д. Затем рассчитывают средние значение для каждой пробы, размах между параллельными результатами по абсолютной величине и в %.

Номер анализа	Концентрация, c_{11} m/m %	Концентрация, c_{12} m/m %	Среднее	Размах	Относительный размах, %
1	0,104	0,101	0,102	0,003	2,9
2	0,155	0,147	0,151	0,008	5,3
3	0,142	0,170	0,156	0,028	17,9
4	0,177	0,174	0,176	0,003	1,7
5	0,220	0,320	0,270	0,100	37
6	0,295	0,254	0,274	0,041	14,9
7	0,328	0,262	0,295	0,066	22,4
8	0,280	0,340	0,310	0,060	19,4
9	0,303	0,331	0,317	0,028	8,8
10	0,347	0,414	0,381	0,067	17,6
		среднее	0,2432	0,0404	

На основе полученного среднего размаха, рассчитывают стандартное отклонение воспроизводимости.

$$S_R = \frac{R}{1,128} \quad S_R = \frac{\bar{R}}{1,128} = \frac{0,0404}{1,128} = 0,0358 \frac{m}{m} \% \quad CV = \frac{0,0404}{1,128} = \frac{0,0404}{0,2432} = 14,7 \%$$

Если измеряется более двух независимых результатов измерений, R отражает диапазон между самым низким и самым высоким измеренными результатами и для перевода в стандартное отклонение используется коэффициент из таблицы ниже.

n	коэффициент
2	1,128
3	1,693
4	2,059

Неопределенность, связанная со смещением, должна, где это возможно, оцениваться с помощью измерения сертифицированного стандартного образца. Общий подход заключается в измерении концентрации ДНК в CRM в ряде ($n > 6$) аналитических серий в

разные дни. Оценка неопределенности, связанной с смещением, получается путем объединения неопределенности, связанной со средним результатом измерения, с неопределенностью, связанной с сертифицированным значением концентрации CRM.

$$u_{bias} = \sqrt{\frac{S_R^2}{n} + \left(\frac{u_{CRM}}{c_{CRM}} * 100\right)^2}$$

Суммарная стандартная неопределенность (Relative standard uncertainty) воспроизводимости и смещения рассчитываются обычным способом:

$$RSU\% = \sqrt{S_R^2 + u_{bias}^2}$$

В отличие от других методов суммарная неопределенность включает значение неопределенности предела обнаружения [50]. Расширенная неопределенность рассчитывается умножением суммарной неопределенности на коэффициент охвата $k=2$.

$$U = 2 \times \sqrt{u_0^2 + (c \times RSU)^2}$$

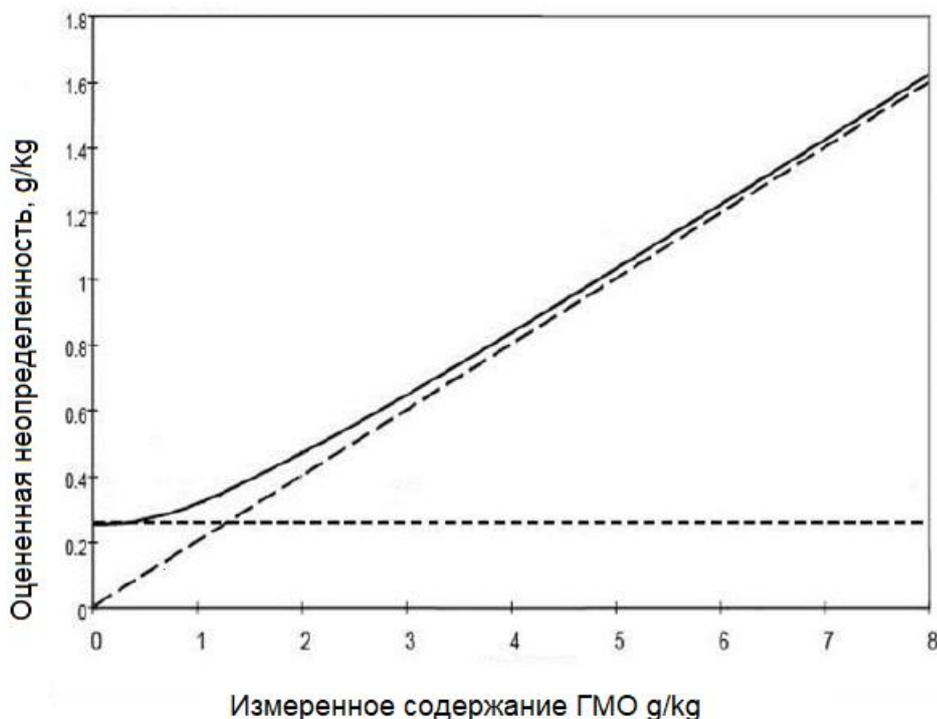


Рис.32.3 учет неопределенности предела обнаружения

u_0 – стандартное отклонение воспроизводимости (выраженное в абсолютных единицах) образца с самой низкой концентрацией, определенное в процессе совместного межлабораторного эксперимента по валидации.

Например: С.2 Метод количественного определения содержания сои линии GTS 40-3-2 (ГОСТ ИСО 21570-2009). S образца с самой низкой концентрацией 0,10 % ГМО составляет 0,05 % ГМО (т.е. в абсолютных значениях) – это и есть u_0 .

Если результаты на гистограмме показывают несимметричное распределение (см. рис. 34), или анализируются образцы с многократно отличными друг от друга содержаниями аналита (например образцы соскобов или крови пациентов) то сначала используют их логарифмическое преобразование, как при оценке неопределенности в микробиологии.

Например, определение содержания РНК вируса гепатита С в сыворотке крови

Номер анализа	Концентрация, C _{i1}	Концентрация, C _{i2}	Y _{i1}	Y _{i2}	Среднее значение	(Y _{i1} -Y _{i2})	((Y _{i1} -Y _{i2}) ²)/2
	Копий/мл	Копий/мл	LogC _{i1}	LogC _{i2}			
1	3600	12500	3,56	4,10	3,83	-0,54	0,14613
2	400	700	2,60	2,85	2,72	-0,24	0,02953
3	2500	7200	3,40	3,86	3,63	-0,46	0,10552
4	560	720	2,75	2,86	2,80	-0,11	0,00596
5	14200	9350	4,15	3,97	4,06	0,18	0,01647
6	6700	15600	3,83	4,19	4,01	-0,37	0,06736
7	320	810	2,51	2,91	2,71	-0,40	0,08134
8	2800	5860	3,45	3,77	3,61	-0,32	0,05144
9	5400	4500	3,73	3,65	3,69	0,08	0,00313
10	4800	6400	3,68	3,81	3,74	-0,12	0,00780

$$s_R = \sqrt{\frac{(Y_{i1}-Y_{i2})^2/2}{n}} = 0,23 \quad \log_{10} \text{ копий/мл}$$

$$U=2*s_R = 2*0,23= 0,45 \log_{10} \text{ копий/мл}$$

Тогда для любого результата (например 6-й)

$10^{4,01 \pm 0,45}$, что дает диапазон

От $10^{3,56} = 3630$

До $10^{4,46} = 28840$

Т.е. неопределённость результатов ПЦР представляют также как неопределенность результатов в микробиологии.

Например: $\pm 0,5 \log$ (аттестованного значения), для аттестованного значения 1250 копий на /мл составляет $\pm 0,5$ от $\log 1250$ копий/мл: составляет $(3,09 \pm 0,5) \log$ числа копий/мл, что составляет диапазон: от $(3,09 - 0,5) = 2,49 \log$ числа копий/мл до $(3,09 + 0,5) = 3,59 \log$ числа копий/мл; т.е. от **309 до 3890 копий/мл**.

VI.V ВЕРИФИКАЦИЯ МЕДИЦИНСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

Если метод исследования воплощает не персонал, а например роботизированное оборудование – современные биохимические, гематологические и другие виды анализаторов, то процедура верификации требуется для оценки качества работы анализатора [23].

Международные протоколы CLSI EP 15-A3, A4 специально разработаны для количественных медицинских исследований, что бы обеспечить их использование в медицинских лабораториях вне зависимости от их сложности и финансовых ресурсов и обеспечить статистически достоверные выводы, относительно верификационных исследований.

В CLSI EP 15 описаны 3 протокола:

- первый протокол предназначен для определения прецизионности и основан на ежедневном выполнении 3 репликаций контрольных проб в течение 5 дней;
- второй протокол предназначен для определения прецизионности и основан на выполнении исследований 20 образцов пациентов,
- третий - протокол предназначен для определения правильности на основании анализа по - крайней мере двух референтных материалов.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

Также описан протокол для определения предела обнаружения CLSI EP 17A. Этот документ устанавливает определение **предела бланка, предела обнаружения и предела количественного определения** для количественных медицинских исследований. Пробы для определения прецизионности, предела обнаружения и правильности (см. ниже) могут тестироваться в одних и тех же аналитических сериях.

С помощью указанных процедур верификации можно верифицировать как сами анализаторы, так и тест-наборы реагентов.

Верификация анализаторов проводится ежегодно, при этом получаемые верификационные характеристики сравниваются с характеристиками самого анализатора.

Верификация тест-наборов реагентов проводится для каждого набора нового поставщика по той же схеме, что и верификация анализаторов. При этом получаемые эксплуатационные характеристики сравниваются с указанными в инструкциях к реагентам. Для верификации новой серии (лота) реагентов тест-наборов одного и того же поставщика полная верификация не требуется.

Для проведения верификационного исследования требуется:

- Выбрать контрольный материал с концентрациями аналита близкими к уровням принятия клинического решения. Если есть возможность, то контрольные материалы должны быть идентичны тем, которые использовал производитель для определения своих спецификаций, либо они должны быть очень схожими материалами (должны иметь схожую матрицу).

В качестве контрольных материалов для **исследования прецизионности** могут быть использованы:

- сертифицированные контрольные материалы (CRM),
- внутрилабораторные контрольные образцы с аттестованным значением (см. раздел VI.VII РЕФЕРЕНТНЫЙ МАТЕРИАЛ/РЕФЕРЕНТНАЯ ПАНЕЛЬ)
- одну и ту же пробу пациента;
- пулированную пробу.

При этом при использовании образцов с аттестованным значением, из этих же самых данных могут быть рассчитаны и характеристики правильности (см. ниже).

1. Верификация прецизионности

Для верификации прецизионности необходимо сравнить насколько внутрилабораторное стандартное отклонение воспроизводимости сопоставимо с установленным производителем стандартным отклонением для конкретных реагентов (тест-системы).

Однако, как правило стандартное отклонение зависит от количества выполняемых измерений, и количество измерений выполненных для верификации лабораторией, не совпадает с количеством измерений, выполненным производителем, поэтому необходимо рассчитать стандартное отклонение скорректированное с учетом фактического числа степеней свободы (см. п.11 ниже).

$$\frac{\sigma}{s_l} = \frac{\sqrt{C}}{\sqrt{v}}$$

1. За день до начала эксперимента подготовить 15 аликвот контрольного материала (КМ) двух уровней (15 аликвот 1 уровня и 15 аликвот 2 уровня) и поместить их в морозильную камеру (от -20 до -25°C).
2. Ежедневно в течение последующих 5 дней (D=5) выполнить одну аналитическую серию, включающую 3 измерения (n=3) 2-х уровней КМ, используя для этого по 3 аликвоты каждого уровня КМ, поставив их в разные места рэка (штатив, планшет) для образцов, или разные рэки для образцов, см. пример ниже.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 121 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

3. Если, вследствие процедур контроля качества или из-за технических трудностей аналитическая серия должна быть отклонена, то тогда необходимо удалить данные и выполнить дополнительную аналитическую серию измерений.
4. В процессе выполнения протокола также необходимо проводить и рутинный внутренний контроль качества в соответствии с рекомендациями производителя.
5. Калибровать аналитическую систему следует точно так, как указано в инструкции производителя для операторов. Если производитель указал, что его данные для спецификации по прецизионности были получены в результате множественных калибровочных циклов, тогда оператор в течение эксперимента может провести повторную калибровку аналитической системы.

Расчеты: Для облегчения работы лабораторий рабочей группой по разработке настоящего документа был разработан мастер-файл Excel, который прилагается к настоящему документу и включает описанные ниже расчеты. Мастер-файл является защищенным файлом и лаборатория не может модифицировать формулы заложенные в этот файл. Ниже прилагается пример верификации этого файла. Если лаборатория предпочтет использовать собственные расчеты, то она также должна будет доказать правильность всех проведенных расчетов (верификация Excel расчетов).

Из данных 5 серий по 3 повтора рассчитываются:

Внутрисерийная средняя (среднее значение за каждый день) \bar{x}_d для каждого дня:

$$\bar{x}_d = \frac{\sum x_i}{n}$$

Внутрисерийная стандартное отклонение SD и дисперсия за каждый день SD^2 :

$$SD = s_{rd} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_d)^2}{(n - 1)}}$$

$$SD^2 = s_{rd}^2$$

На основе рассчитанных данных получают следующие статистические характеристики:

1. общее среднее значение

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\sum \bar{x}_d}{D}$$

2. средняя внутрисерийная дисперсия s_r

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}} = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D s_{rd}^2}{D}}$$

3. межсерийное стандартное отклонение.

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D - 1}}$$

4. межсерийную дисперсию.

$$S_b^2 = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{x})^2}{D - 1}$$

5. отношение внутрисерийной и межсерийной дисперсий

$$S_r^2 / S_b^2$$

6. общая дисперсия

$$s^2 = \frac{\sum (\bar{x}_d - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}$$

7. внутрилабораторное SD:

$$s_l = \sqrt{\frac{n - 1}{n} \cdot s_r^2 + s_b^2}$$

8. число эффективных степеней свободы:

$$v = \frac{((n - 1) \cdot S_r^2 + n \cdot s_b^2)^2}{\left(\frac{n-1}{D}\right) \cdot S_r^4 + \left(\frac{n^2 \cdot (s_b^2)^2}{D-1}\right)}$$

9. Определить теоритическое число степеней свободы на основании количества применяемых уровней контрольных материалов. Для этого рассчитывается вероятность $(1 - \alpha/l)$ распределения χ -квадрат со степенями свободы $(D-1)$. Здесь α – вероятность ошибки и число уровней испытаний. Вероятность ошибки при определении содержания вещества в пределах всего возможного диапазона составляет 5%. Поэтому, если определения проводят с применением контролей на 2-х, 3-х или 4-х уровнях, то ошибка 5% будет разделяться поровну между всеми уровнями.

Вероятность для квантиля С, соответствующая двум, трем и четырем уровням испытаний, составляет 97,5%, 98,33% и 98,75% соответственно.

10. По таблице квантилей распределения χ -квадрат со степенями свободы $(D-1)$ определить квантиль, соответствующий рассчитанной достоверности.

	2 уровня	3 уровня	4 уровня
	1-0,05/2	1-0,05/3	1-0,05/4
D-1	97,5	98,33	98,75
1	5,02	5,73	6,24
2	7,38	8,19	8,76
3	9,35	10,24	10,86
4	11,14	12,09	12,76
5	12,83	13,84	14,54

11. Расчет верификационного стандартного отклонения – стандартного отклонения, которое будет скорректировано с учетом количества фактически проведенных измерений:

$$Verification Value (VV) = \sigma = \frac{s_l \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$$

Критерии приемлемости

Если лаборатория получает величину внутрилабораторного стандартного отклонения ниже этого верификационного значения, **тогда спецификация производителя будет подтверждена.**

Если проводится верификация анализатора, который не использует тест-системы, например, гематологический анализатор, который проводит подсчет клеток крови, то сравнение проводят не с характеристиками прецизионности, указанными в тест-системах, а с характеристиками, указанными в руководстве по эксплуатации медицинского анализатора.

ПРИМЕР. Расчеты при верификации прецизионности

	A	B	C	D	E	F	G
1	CLSI EP15-A2 Оценка воспроизводимости				Аналит	Общая амилаза в сыворотке	
2	Количество повторов		3	Уровень		1	
3	Количество дней		5	Оператор		Клименкова	
4	Дата	Повтор 1	Повтор 2	Повтор 3	\bar{x}_d	s_{rd}	s_{rd}^2
5	05.06.2014	83	83	82	82,667	0,577	0,333
6	06.06.2014	83	83	84	83,333	0,577	0,333
7	09.06.2014	82	84	84	83,333	1,155	1,333
8	10.06.2014	84	84	84	84,000	0,000	0,000
9	11.06.2014	84	84	84	84,000	0,000	0,000
10	Хср.	83,2	83,6	83,6	83,467	0,462	0,400
11	Расчет лабораторного CD и CV						
12	Общее среднее		Среднее E5:E9		83,467		
13	Внутрисерийная дисперсия (Sr ²)		Средняя G5:G9		0,400		
14	Внутрисерийное SD		Корень (E13)		0,632		
15	Межсерийное SD		SD (E5:E9)		0,558		
16	Межсерийная дисперсия (Sb)		E5:E9		0,311		
17	Отношение Sr/Sb		E13/E16		1,286		
18	Общая дисперсия		((C2-1)/C2)*E13 + E16		0,578		
19	Лабораторное SD		SQRT (E18)		0,760		
20	Лабораторное CV		(E19/E12)*100		0,911		
21	Расчет фактического числа степеней свободы v						
22	(n -- 1)Sr				0,8		
23	nSb				0,933		
24	Сумма (A22 + A23)				1,733		
25	(A24 + A25) ²		Числитель		3,004		
26	(n -- 1)/D				0,4		
27	(n -- 1/D)*Sr ⁴				0,064		
28	nKB*(SbKB)/(D -- 1)				0,218		
29	Сумма (A27 + A28)		Знаменатель		0,282		
30	v		Числитель/знаменатель		10,66		
31	Расчет верификационного значения стандартного отклонения (VV)						
32	Спецификация производителя (SD согласно спецификации)				1,09		
33	Теоретическое число эффективных степеней свободы				11,14		
34	Эффективное число степеней свободы (v)				10,66		
35	Корень (E33)				3,34		
36	Корень (E34)				3,26		
37	VV E39/E40*Sclaim (E36)				1,12		
38	Калькулятор спецификации производителя						

39	CV (указано в инструкции к реагенту)	1,3
40	Среднее (указано в инструкции к реагенту)	84
41	SD согласно спецификации (E39*E40/100)	1,09

2. Верификация правильности

В качестве контрольных материалов для верификации правильности могут быть использованы только материалы, имеющие прослеживаемость к референтному значению:

Материал	Референтное значение	Неопределённость референтного значения
сертифицированный референтный материал (CRM)	Сертифицированное значение из инструкции к CRM	Стандартное отклонение из инструкции к CRM
референтный образец, которые остались от участия в программе ВОК	Значение референтного образца из отчета ВОК	Стандартное отклонение образца ВОК
материалы производителя тест-системы, предназначенные для выполнения верификации правильности или проведения контроля качества	Значение материала тест-системы	Стандартное отклонение из инструкции к CRM
внутрилабораторные контрольные образцы с аттестованным значением (см. раздел VI.VII РЕФЕРЕНТНЫЙ МАТЕРИАЛ/РЕФЕРЕНТНАЯ ПАНЕЛЬ)	Аттестованное значение внутрилабораторного контрольного образца	Стандартное отклонение из инструкции к CRM
стандартные образцы, разведенные до известных концентраций	Значение стандартного образца с учетом разведения	Расчитанная неопределенность с учетом разведения

1. За день до начала эксперимента подготовить 10 аликвот референтного материала каждого уровня, например, двух уровней (10 аликвот 1 уровня и 10 аликвот 2 уровня) и поместить их в морозильную камеру (от -20 до -25°C).
2. Ежедневно в течение последующих 5 дней выполнить одну аналитическую серию, включающую 2 измерения 2-х уровней референтных материалов, используя для этого по 2 аликвоты каждого уровня референтных материалов, поставив их в разные места рэка для образцов, или разные рэки для образцов.
3. В процессе выполнения протокола эксперимента выполнять и Внутрилабораторный Контроль Качества (ВКК) и калибровку.

Расчеты: Для облегчения работы лабораторий рабочей группой по разработке настоящего документа был разработан мастер-файл Excel, который прилагается к настоящему документу и включает описанные ниже расчеты. Мастер-файл является защищенным файлом и лаборатория не может модифицировать формулы заложенные в этот файл. Ниже прилагается пример верификации этого файла. Если лаборатория предпочтет использовать собственные расчеты, то она также должна будет доказать правильность всех проведенных расчетов (верификация Excel расчетов).

Расчитывается среднее значение

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

и отклонение среднего значения от значения референтного материала:

$$bias = \bar{x} - C_{ref},$$

После этого проводится проверка на выбросы - расчет пределов Граббса.

$$\text{Критические пределы Граббса} = \bar{x} \pm G_{0,95,p} \cdot S$$

Если все полученные результаты укладываются между значениями критических пределов

Граббса, то все значения приемлемы и не требуется повторять эксперимент.

ПРИМЕР. Расчеты при верификации правильности и оценки неопределенности измерений

	A	B	C	D			
1	CLSI EP15-A3 Оценка правильности						
2	Название контроля	MULTI IA+					
3	Серия контроля	35106210					
4	Срок годности						
5							
6	Приписанные значения контрольного материала						
7	Уровни			Уровень 1	Уровень 2		
8	Референтное значение, C _{ref}			36,30	70,4		
9	Диапазон	(C _{ref} -3σ)		25,40	49,2		
10		(C _{ref} +3σ)		47,10	91,5		
11	u(C _{ref})=((C _{ref} +3σ)-C _{ref})/3				3,63	7,07	
13							
14	Результаты исследований				Проверка на выбросы		
15	№ п/п	Дата		Уровень 1	Уровень 2	Уровень 1 Уровень 2	
16	1	28.04.2022		33,76	69,31	ОК ОК	
17	2	29.04.2022		39,42	77,62	ОК ОК	
18	3	30.04.2022		46,65	73,11	ОК ОК	
19	4	02.05.2022		44,21	76,32	ОК ОК	
20	5	03.05.2022		43,11	83,42	ОК ОК	
21	6	04.05.2022		44,78	83,49	ОК ОК	
22	7	05.05.2022		52,17	79,90	выброс ОК	
23	8	06.05.2022		55,02	86,65	выброс ОК	
24	9	07.05.2022		37,56	71,88	ОК ОК	
25	10	08.05.2022		41,76	72,00	ОК ОК	
26	11	09.05.2022		37,83	75,32	ОК ОК	

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	-------------------------------	--	--------------

27	12	10.05.2022	34,75	65,72	OK	OK	
28	13	11.05.2022	34,73	67,01	OK	OK	
29	14	12.05.2022	33,04	68,60	OK	OK	
30	15	13.05.2022	32,11	66,31	OK	OK	
31	\bar{x}	среднее	40,73	74,44			
32	Cref	D(E)8	36,30	70,40			
33	Bias	D(E)31-D(E)32	4,43	4,04			
34	$\bar{x} \pm G_{0,95,p} \cdot S$						
Расчет критических пределов Граббса							
35	Критическое знач. критерия Граббса для 0,01%; 5*3 количества результатов (табличное значение ISO 5725-2)			2,806			
36	Нижний критический предел (D(E)31-D35*D(E)11)			30,53	54,61		
37	Верхний критический предел (D(E)31+D35*D(E)11)			50,92	94,27		
38							
39	Оценка неопределенности измерений смещения						
41	S CRM	SD (D(E)16:D(E)30)	6,97	6,70			
42	S CRM/vn	(D(E)34/КОРЕНЬ(B30))	1,80	1,73			
43	u(Cref)	D(E)11	3,63	7,07			
44	Ubias	КОРЕНЬ(СУММКВ(D(E)39:D(E)41))	8,06	9,89			
45							
46			Ubias	sRw	U		
47	Неопределенность		8,06	0,611			

3. Оценка неопределенности измерений

На основании данных верификации прецизионности и правильности может быть рассчитана внутрिलाбораторная неопределенность измерений.

Внутрिलाбораторная неопределенность включает неопределенность внутрिलाбораторной воспроизводимости и неопределенность смещения:

$$u_c = \sqrt{SD^2_R + \left(\frac{SD_{bias}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u^2(C_{ref})}$$

Неопределенность референтного материала, доверительный интервал которого установлен с коэффициентом охвата k=3 (99%) рассчитывают по формуле:

$$u(C_{ref}) = ((C_{ref} + 3\sigma) - C_{ref}) / 3$$

Неопределенность референтного материала, доверительный интервал которого установлен с коэффициентом охвата k=2 (95%) рассчитывают по формуле:

$$u(C_{ref}) = ((C_{ref} + 2\sigma) - C_{ref}) / 2$$

После этого рассчитывается расширенная неопределенность при вероятности 95%

$$U_{95\%} = 2 * u_c$$

4. Верификация предела обнаружения

В качестве контрольных материалов для верификации предела обнаружения

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 127 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

- применяется холостая проба (чаще всего дистиллированная вода), и
- образец с концентрацией равной пределу обнаружения.
 1. 4 аликвоты бланка реагента (вода); поместить их в холодильник. Температурный режим 2-8 С°.
 Подготовить 4 аликвоты проб аналита с концентрацией близкой или равной заявленной производителем для предела обнаружения LOD; для этого, референтный материал развести дистиллированной водой до необходимой концентрации. Поместить их в морозильник. Температурный режим минус 20-25 С°.
 2. Ежедневно в течение последующих 4 дней выполнить:
 - Одну аналитическую серию, включающую 5 измерения бланка реагента.
 - Одну аналитическую серию, включающую 5 измерения концентрации аналита, близкой или равной LOD.

В процессе выполнения протокола эксперимента выполнять и Внутрिलाбораторный Контроль Качества (ВКК) и калибровку.

Количественно, LOD оценивают как сумму величин Предела Бланка (Limit of Blank (LOB)) и стандартного отклонения пробы с наименьшей концентрацией аналита умноженной на 1.645 (1.645σS).

$$LOD = LOB + 1.645\sigma S$$

Принципиально, верификация Предела Обнаружения основана на подсчете количества результатов исследования концентрации аналита (равной или близкой к величине LOD) превышающих величину спецификации производителя по LOB. Если же производитель не дает спецификаций по LOB, то её должна определить сама лаборатория.

Количественно, LOB оценивают как сумму среднего значения бланка (B) и его стандартного отклонения, умноженного на 1,645 (1.645 σB).

$$LOB = \mu B + 1.645 \sigma B$$

Спецификацию производителя по LOD следует взять из его инструкции к реагентам

Предел обнаружения бланка должен быть меньше или по крайней мере равен предеу бланка, установленному производителем. Если предел бланка не установлен производителем, то он должен быть не более 1/3 от предела обнаружения.

Предел обнаружения должен быть подтвержден - т.е. результаты измерения образца с наименьшей концентрацией, должны быть меньше установленногт предела обнаружения не более, чем в 3-х случаях из 20-ти.

Подход на основании стандартного отклонения холостой пробы не применим для определения предела обнаружения методов ПЦР. Для определения предела обнаружения методов ПЦР см. раздел Верификация ПЦР методов.

2 Сравнительная валидация нового и старого методов

Обычной практикой является валидация аналитической эффективности нового метода посредством анализа проб пациентов при помощи нового метода и метода подлежащего замене [24]. Допускается, что результаты, полученные при помощи метода сравнения, представляют собой правильные значения и являются основой, на которой производитель получил свои спецификации по правильности или аналитическому смещению. Вероятно, это будет аксиомой, если новый метод является обновленным вариантом предыдущего метода или предыдущей аналитической системы. Если же нет, тогда, для того, чтобы быть уверенным в надежности работы метода сравнения в условиях лаборатории, а также в том, что заявленные спецификации производителя соответствуют действительности, следует выполнить тщательное изучение спецификаций производителя.

А именно:

1. Провести исследование 20 проб, концентрации которых должны охватывать рабочий

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 128 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

диапазон метода. Ежедневно тестировать от 5 до 7 проб в течении 3-4 дней. Временной интервал между анализом проб одного пациента разными методами должен составлять не более 4-х часов.

2. Свежие образцы проб пациентов следует тестировать способом, который характерен для рутинных операций в данной медицинской лаборатории;
3. Для гарантии стабильности условий работы и валидности результатов тестирования, параллельно выполнять процедуры внутрилабораторного контроля качества;
4. Для идентификации каких-либо противоречивых результатов, выполнять оперативный анализ получаемых данных;
5. Чтобы симулировать реальные операции, требуется в каждую серию включить по 10 образцов реальных пациентов.
5. Строится график различий, отложив на оси Y полученную разницу, а на оси X - результаты, полученные при помощи метода сравнения;

Критерии приемлемости

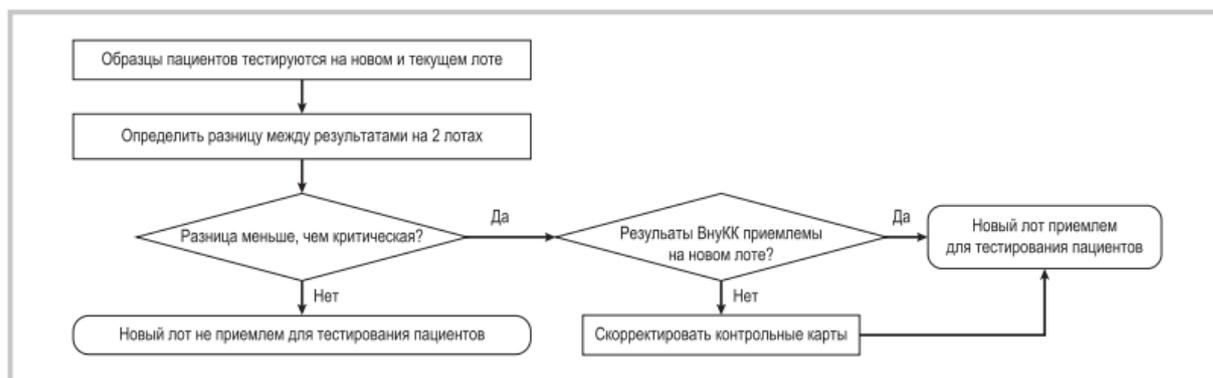
Абсолютная разница между двумя сериями не должна превышать $5,5 SD$. Также можно рассчитать доверительные или верификационные границы (см. Протокол №1).

Критерии приемлемости

Доверительные интервалы, полученные при реализации протокола 1 должны быть не выше заявленных производителем.

6. Верификация новой серии (лота) реагентов

Для верификации новой серии (лота) реагентов одного и того же поставщика достаточно сравнить результаты одних и тех же проб на разном уровне концентраций в старой и новой тест-системе и зарегистрировать это. При этом надо определить критерий обнаружения значимых изменений результатов при смене лота реагента — **это предел изъятия, который определяет принятие решения о приемлемости лота реагента**. Он должен свести к минимуму возможность принятия в работу лотов реагентов, дающих клинически значимое смещение результатов пациентов.



Как правило предел изъятия рассчитывают на основе максимальных допустимых расхождений по контрольной карте на основе правил Вестгарта. Для разного уровня достоверности он может быть принят как равный 2, 3 или 4 стандартным отклонениям применяемых тест-наборов. Некоторые производители указывают среди аналитических характеристик тест-системы (в формате стандартного отклонения), таких как внутрисерийная (S_r , англ. within-run imprecision) и межсерийная (SWRL, англ. within-reagent-lot imprecision) воспроизводимость за время использования лота реагента.

VI.VII РЕФЕРЕНТНЫЙ МАТЕРИАЛ / РЕФЕРЕНТНАЯ ПАНЕЛЬ

Для подтверждения правильности методов испытаний должен использоваться независимый от тест-сисемы референтный материал или контрольная панель. Как правило

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

такие материалы доступны на коммерческой основе. Но в Кыргызстане доступ к ним ограничен несовершенством законодательства, отсутствием собственных производителей и очень высокой стоимостью.

В том случае, если лаборатория не имеет достаточного количества референтного материала (референтных панелей) для определения антител к патогенам или самих патогенов, **как минимум**, она должна произвести собственный контрольный материал для применения в целях верификации метода и контроля качества [46].

Контрольный материал должен соответствовать по своей природе исследуемым образцам (например, если исследуется сыворотка крови, то контрольный материал изготавливается из сыворотки крови).

Для приготовления положительных образцов требуются образцы документально клинически подтвержденных пациентов. Как правило, в качестве отрицательных образцов, могут использоваться образцы от персонала самой лаборатории, так как состав лаборатории имеет регулярное подтверждение состояния здоровья.

Количество контрольного материала должно хватить не менее, чем на 100 постановок, он должен сохранять стабильность и не должен содержать маркеры других патогенов, кроме контролируемого.

Выбор разведения и приготовление контрольного материала.

Для приготовления контрольного материала, рекомендуется использовать сыворотку крови, поскольку плазма крови может быть неустойчивой при хранении, самопроизвольно свертывается при замораживании. При отсутствии сыворотки можно использовать плазму, которую предварительно рекальцифицируют.

Конверсия плазмы в сыворотку путем рекальцификации:

1. Приготовить раствор 2 моль /л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ на 10 мл дистиллированной воды).
2. Добавить 0,5 мл свежеприготовленного раствора хлорида кальция к 100 мл плазмы, перемешать и выдержать на водяной бане при 37°C в течение 1 часа. Для коагуляции больших объемов понадобится большее количество часов.
Если плазма не свернулась можно добавить большее количество CaCl_2 и продолжить инкубацию.
3. Когда плазма свернулась, достать ее из водяной бани, охладить, положить бутылку в прочный пластиковый пакет или лабораторный стакан, и поместить в морозильную камеру на минус 20°C на всю ночь.
4. Достать бутылку из морозильной камеры, оттаять при комнатной температуре, отделить сыворотку от фибринового сгустка. Для малых объемов для отделения можно использовать центрифугирование на 3000 об./мин в течение 10 минут.

Контрольный материал с низким содержанием аналита можно приготовить путем разведения сыворотки с высокой концентрацией (ОП более 3 ед. опт. плотности) отрицательной сывороткой. Для приготовления контрольного материала, объем отрицательной сыворотки используемой для разведения должен быть не менее 20-30 мл.

Положительные и отрицательные образцы пулируются с учетом критериев исключения и возможной кроссреактивности (см. Раздел верификация серологических методов). Например, если готовится контрольный образец на HbsAg, то отрицательная сыворотка не должна содержать антитела к HbsAg.

Наиболее предпочтительным случаем, является тестирование пулированного материала в разных разведениях параллельно с количественным калибратором или референтным стандартом с помощью любой тест-системы. Для этого, тестируемый собственный контрольный материал, разводится негативным биологическим материалом или транспортной средой в несколько ступеней до получения одинакового отклика с имеющимся стандартом (например, до одинаковой оптической плотности).

Ниже приведены примеры схем разведения для приготовления контрольного образца:

№	Разведения	Объем сыворотки, мкл	“+”	Объем сыворотки, мкл	“+”	Полученный объем, мкл
1	1:10	30		270		300
2	1:100	30	←	270	←	300
3	1:1000	300	←	2700	←	3000
4	1:5000	2500	←	10000	←	12500
5	1:10000	12500	←	12500	←	25000

Образец	Шаг разведения мкл:мкл	Титр
Образец 1 (Цельная положительная сыворотка)		1
Образец 2 (Образец 1 + отрицательная сыворотка)	200:200	1:2
Образец 3 (Образец 2 + отрицательная сыворотка)	200:200	1:4
Образец 4 (Образец 3 + отрицательная сыворотка)	200:200	1:8
Образец 5 (Образец 4 + отрицательная сыворотка)	200:200	1:16
Образец 6 (Образец 5 + отрицательная сыворотка)	200:200	1:32
Образец 7 (Образец 6 + отрицательная сыворотка)	200:200	1:64
Образец 8 (Образец 7 + отрицательная сыворотка)	200:200	1:128
И т.д.		

Параллельно с реальной положительной сывороткой титруют положительную контрольную сыворотку, для которой предельный титр антител известен.

Нужную концентрацию контрольного материала нужно получать путем поэтапного разведения сыворотки, например, как указано в таблице выше. Если сразу раввести положительную сыворотку отрицательной, в конечном объеме произойдет неравномерное распределение аналита в исследуемых пробах.

Все полученные разведения проставить в тест-системе и определить оптическую плотность образцов.

Для положительного контроля выбрать разведение у которого оптическая плотность (ОП) будет выше ОП критическое в 1,5-2,5 раза. Например, если ОП крит составляет 0,120, то необходимо выбирать разведения с ОП 0,240 – 0,350 ед.опт.плотности.

Для проведения верификации разведения проводятся до перехода образца из положительного в отрицательный (ОП меньше ОП крит.), в качестве образца с наименьшей положительной концентрацией берется последний или предпоследний образец перед переходом в отрицательный.

После определения нужных разведений готовится количество образцов, достаточных не менее чем для 100 постановок.

Во избежании повторного замораживания и оттаивания контрольного материала, которые приводят к деградации аналита, полученную сыворотку разлить в одноразовые пробирки Eppendorf в объеме достаточном для одной постановки + 10%.

Заложить на хранение при -20 °С. Размороженные образцы использовать однократно.

Аттестация контрольного материала

Контрольные материалы аттестуются путем постановки их в разных тест-системах.

Проводится статистически значимое (более 10) число повторных определений.

В этом случае, собственный материал может быть охарактеризован количественно.

Если количественный стандарт отсутствует, имеется только качественный или не имеется никакого, то приготовленный материал тестируется в разных, как минимум в трех тест-системах, для подтверждения его положительного или отрицательного статуса. В этом случае также используется статистически значимое (более 4 в каждой тест-системе, в сумме

12) число измерений. В этом случае, материал невозможно охарактеризовать количественно – он может применяться только для качественных исследований.

Требуется произвести не менее 20 измерений контрольного материала разными специалистами, в разные дни в разных тест-системах

Выписать данные ОП каждого измерения, выписать данные ОП крит каждой соответствующей тест-системы.

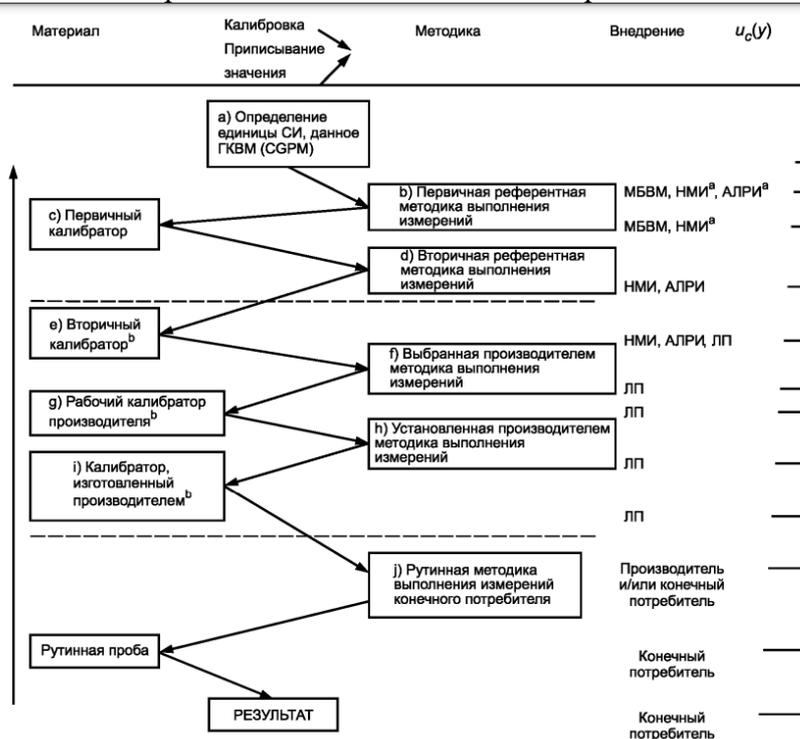
Рассчитать ОП/ОПкрит. Для унификации данных, полученных в разных тест-системах.

Определить аттестационные характеристики контрольного материала: Среднюю ОП/ОП крит, стандартное отклонение S и коэффициент вариации CV .

При создании новой серии контрольного материала – потребуется его повторная аттестация.

Некоторые коммерческие референтные материалы, производимые в ближайшем зарубежье, также являются не количественно, а полуколичественно охарактеризованными. В этом случае для них установлен диапазон отклика прибора и его коэффициент вариации (см. пример ниже).

Поэтому для качественных панелей, изготовленных самостоятельно, лаборатория также может установить диапазон отклика и его коэффициент вариации, что будет полезно для целей контроля качества и входного контроля тест-систем.



^a При утверждении международными научными/медицинскими организациями, например Международной федерацией клинической химии и лабораторной медицины, Всемирной организацией здравоохранения.

^b Калибратор может быть материалом с матрицей, напоминающей пробы человеческого происхождения, которые должны быть измерены рутинными методиками выполнения измерений конечных потребителей.

Рис.33 Схема цепочки метрологической прослеживаемости

Клинико - лабораторных тестов к единицам СИ(SI) ISO 17511: 2003

Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам

Подготовленные образцы должны быть приготовлены с учетом возможностей хранения (хранение при минус 20 °С менее длительное, чем при минус 80 °С). При приготовлении образцов следует обращать особое внимание на тщательность перемешивания. Однородность приготовленной партии должна быть подтверждена. А именно, для определения однородности следует отбирать на анализ при характеристике

образцы в случайном или систематическом порядке из всей заготовленной партии (порядка 10%). Для случайного отбора рекомендуется использовать таблицу случайных чисел.

Выше на рис.32 представлена одна из возможных цепочек определения прослеживаемости для контрольных панелей.

VII ВЕРИФИКАЦИЯ РЕФЕРЕНТНЫХ ИНТЕРВАЛОВ

Референтные интервалы, установленные в произведенных за рубежом тест-системах должны быть адаптированы к местной референтной популяции.

Референтный интервал (РИ) определяется на референтной выборке условно здоровых людей, соответствующих оговоренным критериям, т. е. на группе референтных индивидуумов, представляющих референтную популяцию. Референтное значение (РЗ) — это величина аналита у референтного индивидуума. Совокупность референтных значений формирует референтное распределение. РИ представляет собой 95% центральный диапазон РЗ, ограниченный верхним и нижним референтными пределами.

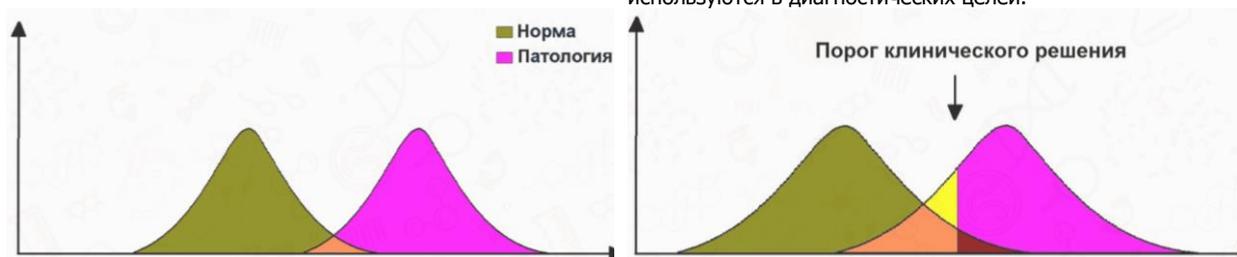
РИ является статистическим показателем и отражает биологические свойства референтной популяции, на которой был определен, — межиндивидуальную биологическую вариацию. Важно помнить, что по своему определению РИ предназначен быть зеркалом популяции и не может служить критерием суждения о здоровье или патологии. Для принятия решения об отнесении пациента к здоровым или больным, группе риска или для других клинических задач используются пороговые значения (ПЗ).

Порог принятия клинического решения - это некоторое пороговое числовое значение показателя, принятое в качестве критерия наличия или отсутствия конкретного заболевания в конкретной клинической практике.



а) Идеальный маркер заболевания – концентрации аналита для нормы и патологии не перекрываются

б) Диапазоны концентраций у больных и здоровых перекрываются слишком сильно. Такие анализы не используются в диагностических целях.



в) Всегда существует диапазон концентрации в который попадают как больные, так и здоровые

г) Предел принятия клинического решения



д) Серая зона - это такое значение измеряемого параметра, когда невозможно однозначно принять решение о том, болен человек или нет. В этом случае часто требуется повторное исследование через определенный период времени.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Рис. 34 иллюстрация отличия порога референтного интервала и порога принятия клинического решения

Как видно на рисунке по границам референтного интервала не всегда можно судить о наличии или отсутствии заболевания.

Различие между референтным интервалом и пороговым значением

Показатель	РИ	ПЗ
Количество значений	Два значения - верхний и нижний предел	Одно значение для конкретной клинической ситуации
Предназначение	Биологическая характеристика популяции	Принятие клинического решения
Применение	Общая популяция	Клиническая популяция
Влияющие факторы	Популяция, пол, возраст и др.	Клиническая задача, категория пациентов
Происхождение	95% центральный диапазон референтного распределения, определяемый статистическими методами	Консенсус экспертов на основе исследований клинических исходов с определением распространенности патологии, ROC – кривых и предсказательной ценности.
Кто определяет	Специалисты лабораторной службы	Клиницисты и лабораторные эксперты в клинических рекомендациях
Ведущие эксперты	Специалисты лабораторной службы	Клиницисты
Согласованный стандарт	Хорошо сформулирован, документ CLSI	Предстоит разработать

Примечание. Применение РИ имеет свои ограничения, в частности при интерпретации результатов анализов с низким индексом индивидуальности. У таких анализов внутрииндивидуальная вариация ниже межиндивидуальной вариации, значения пациента могут не выходить за пределы РИ, но значительно отличаться от значений, типичных для данного пациента. В этом случае целесообразнее использовать мониторинг уровня анализа и для интерпретации динамики сравнивать получаемый результат не с РИ, а с критической разницей значений.

В зависимости от способа получения данных по РЗ выделяют **прямой и непрямой методы определения РИ**. В первом случае для решения этой задачи проводится целенаправленный рекрутинг референтных индивидуумов, тогда как при непрямом подходе источником РЗ служит массив данных, уже накопленный в медицинской или лабораторной информационной системе.

Существуют различные методы верификации референтных биологических интервалов [44]:

- административный перенос;
- прямой метод верификация РИ с 20-тью пробами;
- прямой метод верификация РИ с 60-тью пробами;
- непрямой метод верификации РИ.

Административный перенос РИ

Проводят на основании изучения информации производителя и субъективной верификации приемлемости его РИ для популяции пациентов тестируемых в данной лаборатории, а также и для используемых в лаборатории аналитических методов.

Информация производителя должна включать демографические данные референтной выборки, преаналитические условия исследования (подготовка индивидуума и процедура взятия и обработки образца), используемая аналитическая система, информация относительно статистического метода, используемого производителем для определения референтных интервалов.

В первом случае лаборатория должна сопоставить свои характеристики с параметрами При задокументированном совпадении допускается применение переносимых РИ.

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Прямой метод верификации РИ

Если присутствует адекватная документация производителя об исследовании референтных величин, то перенос референтных интервалов можно выполнить посредством верификацию с использованием образцов от условно здоровых лиц, соответствующих критериям включения/исключения и представляющих популяцию, обслуживаемую лабораторией.

Экспериментально, это простой подход. Он только требует минимального количества данных, а результат исследования имеет четкий критерий для интерпретации данных и верификации переноса референтного интервала.

1. На основе данных литературы требуется проанализировать возможные факторы биологической и аналитической вариации для исследуемого аналита.
2. С учетом этих данных определить критерии включения/исключения и отразить это в анкете для участников исследования.

Проще всего в качестве верификации референтного интервала, выбрать популяцию взрослых индивидуумов, взрослых мужчин или женщин, чем представителей малой субпопуляции.

Примеры возможных критериев исключения:

- аномальное артериальное давление;
- наличие диабета, хронических заболеваний печени или почек;
- известное носительство гепатита В, С или ВИЧ;
- беременность и лактация, женщины, рожавшие менее 1 года назад;
- вид деятельности, профессия (например: креатинин у спортсменов всегда выше референтной нормы);
- генитические факторы;
- текущая или недавняя госпитализация (за последние 4 недели);
- недавняя болезнь, операция;
- донорство;
- злоупотребление витаминами;
- курение;
- наркотическая зависимость;
- недавняя гемотрансфузия;
- донорство крови за последние 3 месяца;
- ожирение;
- окружающая среда;
- прием лекарств, включая оральные контрацептивы;
- употребление алкоголя;
- состояние натощак или после приема пищи;
- участие в исследовательском проекте, содержащем экспериментальный препарат, за последние 12 недель.

Надо отметить, что критерии включения/исключения являются одним из самых дискуссионных моментов в исследованиях по определению РИ. Прежде всего, не существует единого понятия условно здорового человека. С практической точки зрения очень жесткие ограничения приведут к низкой реализуемости задачи рекрутинга требуемого количества референтных индивидуумов, а также существенно повысят стоимость предварительного обследования и отбора. При определении критериев включения/исключения важно помнить **об основном предназначении РИ — служить отражением исследуемой популяции**. Необходимо приводить четкое описание отобранной референтной популяции для ясного понимания ограничений применимости РИ, полученных в исследовании.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 135 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

3. Установить для данного анализа требуемое количество референтных индивидуумов в зависимости от предполагаемого статистического метода расчета пределов РИ, в том числе для каждой из подгрупп в случае возможного деления РИ по подгруппам.
4. Требуется подписать у предполагаемых участников информированное согласие на участие в исследовании и собрать заполненные анкеты.
5. Проверить отобранных потенциальных референтных индивидуумов по данным анкеты на предмет соответствия заранее определенным критериям включения/исключения. Исключить, если необходимо.
6. В случае ожидаемого деления РИ на подгруппы сформировать подгруппы референтных индивидуумов на основе данных анкеты.
7. Подготовить отобранных участников к взятию биоматериала в соответствии с процедурой, обычно используемой в лаборатории.
8. Собрать и обработать образцы.
9. Построить гистограмму РЗ и оценить распределение данных.
10. Идентифицировать возможные ошибки и/или выпадающие значения.
11. Проанализируйте РЗ: выбрать статистический метод и рассчитать референтные пределы и доверительные интервалы.
12. Документировать все шаги и процедуры.

Важно помнить, что необходимо, помимо обеспечения качества, на аналитическом этапе стандартизовать и строго контролировать различные преаналитические процедуры.

Описанный выше алгоритм прямого метода относится к так называемому подходу **a priori**, когда исключение по заданным критериям выполняется **до взятия биоматериала**. В случае **a posteriori** критерии исключения применяются **после сбора образцов**, и в такой ситуации придется рекрутировать заведомо большее число потенциальных референтных индивидуумов, чтобы в конечном итоге иметь достаточное их количество в референтной выборке с точки зрения статистики.

1. На первом этапе проверяются РЗ от 20 референтных индивидуумов на предмет наличия выбросов. Если потребовалось исключение, то для замены привлекаются новые референтные индивидуумы. Далее проводится сопоставление РЗ от 20 индивидуумов с переносимым РИ.

- РИ считается верифицированным, если **не более чем 2 образца из 20 вышли за пределы РИ**.

- Если таковых было **3 или 4, то требуется привлечение дополнительно новых 20 референтных индивидуумов**.

- Если в новой набранной группе **3 выхода за границы РИ или более или в первой двадцатке РЗ от 5 индивидуумов выходили за пределы РИ, то перенос РИ невозможен**. Требуется проверка аналитической процедуры на предмет исключения возможных ошибок и предполагается возможная разница в составе референтных популяций. В этих случаях лаборатория должна разработать собственные РИ. Обязательным также является анализ равномерности распределения РЗ, используемых для верификации. Если при наличии двух РЗ, выходящих за пределы верифицируемого РИ, также имеется смещение РЗ в сторону вышедших значений, то верификация РИ вызывает сомнение. В таком случае целесообразно применять другие методы верификации. Когда более 90% РЗ попадают в верифицируемый РИ, автоматическое принятие такого РИ не рекомендуется в связи с тем, что, возможно, принимаемый РИ слишком широк для обслуживаемой популяции.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 136 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

При верификации РИ, установленных для подгрупп, стандарт CLSI допускает проверку РИ для одной из подгрупп: в случае ее успешной верификации возможно сделать заключение о верификации РИ для всех подгрупп. Однако такое решение может вызывать сомнения, и желательно проводить верификацию для каждой из подгрупп.

Наиболее частыми критериями для разделения РИ по подгруппам являются пол и возраст. Опыт глобального многоцентрового исследования IFCC по РЗ свидетельствует о целесообразности проведения отдельно статистического анализа для мужчин и женщин при выяснении необходимости установить РИ для разных подгрупп. Повышенное внимание необходимо уделять анализу возможного разбиения на возрастные подгруппы у анализов, зависящих от индекса массы тела. Эти два источника вариации могут усиливать влияние друг друга на распределение РЗ, симулировать или маскировать эффект на РЗ в зависимости от аналита и возрастной динамики индекса массы тела в популяции. Следует отметить, что при расчете РИ для различных подгрупп требуется соблюдение рекомендованного минимального количества референтных индивидуумов в каждой из подгрупп.

Стандарт CLSI предусматривает дополнительный вариант переноса РИ для анализов с высокой клинической значимостью, правильная интерпретация которых критична для лаборатории. Это предполагает расчет РИ робастным методом на референтной выборке из 60 условно здоровых лиц. Полученные РИ сравниваются с РИ из полноценного исследования, включавшего не менее 120 РЗ. Для выявления значимых различий между двумя референтными выборками применяются упомянутые ранее правила выделения РИ для подгрупп (метод Harris/Boyd и др.). В этом варианте лаборатории также необходимо самостоятельно принять решение для каждого аналита о приемлемости ширины ДИ РИ, рассчитанных таким образом.

Непрямой метод верификации РИ

Помимо способов верификации, рекомендованных в стандарте CLSI, существуют и другие подходы, в частности **data mining** — использование локальных информационных баз данных, позволяющее отобрать сотни и тысячи результатов лабораторных исследований условно здоровых индивидуумов. В этом случае применяется оценка меры центральной тенденции распределения данных (медианы или моды), которая более устойчива к присутствию патологических результатов, чем пределы РИ.

Не рекомендуются использовать data mining, если нет четкого различия между распределениями РЗ здоровых и нездоровых лиц или существует значительное смещение между методами, приводящее к ложному завышению или занижению доли флагов.

При непрямом методе предпочтение отдается использованию данных обследуемых амбулаторно пациентов. В случае госпитальных баз необходима идентификация заболеваний по кодировке с исключением определенных подгрупп в зависимости от исследуемого аналита. Также для исключения могут использоваться другие доступные в системе данные о состоянии здоровья пациента. С целью снижения вероятности наличия патологического результата используются только РЗ пациентов с единственным результатом или в серии измерений выбирается последний результат.

РИ при непрямом методе рассчитываются с помощью специальных математических инструментов, в частности с использованием анализа Blattacharya и его модификаций, метода Hoffman, F. Arzideh, которые менее чувствительны к присутствию патологических результатов по сравнению с классическими параметрическим или непараметрическим методами. В Интернете доступны следующие приложения: на базе excel Bellview Bhattacharya analysis (Doug Chesher) <https://sourceforge.net/projects/bellview/>; на базе excel от Graham Jones <http://www.syddpath.stvincents.com.au/>; <https://www.r-bloggers.com/mining-your-routine-data-for-reference-intervals-hoffman-bhattacharya-and-maximum-likelihood/>.

В бурно развивающемся мире «биг дата» исследователи активно ищут решения для нивелирования недостатков непрямого метода, определения механизмов исключения

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 137 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

выпадающих значений, согласования минимального размера данных и возможных статистических допущений.

Для оценки аналитического или популяционного смещения сравниваются медиана данных, извлеченных из информационной системы, с медианой выборки РЗ, использованных для установления РИ. Помимо этого, необходимо мониторить процент аномальных результатов и оценить долю флагов, т. е. значений, попадающих за пределы используемого РИ, — текущую и ожидаемую при переходе к верифицированному РИ. Если изменение доли флагов не превысит допустимые пределы, то РИ считается приемлемым. Согласно концепции минимального, оптимального и желаемого предела смещения, доля флагов может варьировать в диапазоне от 1,0 до 1,8% для флагов о выходе за нижний предел РИ и от 5,7 до 3,3% для флагов превышения верхней границы РИ.

Альтернативный стандарту CLSI подход — мониторинг медианных значений и частоты результатов за пределами РИ может с успехом применяться не только для первичной верификации, но и при проведении периодических подтверждений корректности используемых РИ. При проведении верификации полезно дополнительно рассчитать РИ непрямым методом на основе данных информационной системы. В дальнейшем периодически проводить аналогичные расчеты и сравнивать получаемый РИ с первоначально рассчитанным непрямым методом РИ для подтверждения стабильности используемого РИ и отсутствия аналитического или популяционного смещения.

Статистические подходы при определении/верификации референтных интервалов

При определении РИ предполагается как визуальная оценка распределения РЗ, так и использование набора статистических инструментов.

Существует несколько методов для расчета пределов РИ: параметрический, непараметрический, робастный.

Первый предполагает нормальное (или «гауссово») распределение РЗ, и пределы РИ рассчитываются как среднее $\bar{PZ} \pm 1,96 SD$. Однако в случае биологических аналитов такое распределение встречается нечасто.

Для расчета пределов РИ непараметрическим методом форма распределения РЗ не имеет значения. По этой причине он рекомендован IFCC. Для определения РИ непараметрическим методом РЗ ранжируются от меньшего к большему. В случае выборки в 120 РЗ в качестве 2,5 перцентиля выбирается РЗ на третьей позиции и РЗ на 118-м месте для 97,5 перцентиля.

Для принятия решения об их исключении часто используют правило Dixon/Reed: если отношение разницы значений между выпадающим значением и соседним к нему РЗ к разнице между крайними значениями всего полученного диапазона РЗ $\geq 0,3$, то данное выпадающее значение подлежит исключению из референтной выборки. Если присутствуют 2—3 выброса с одной стороны распределения, то данное правило применяется к наименьшему выпадающему значению. IFCC также рекомендует подход, изначально предложенный Turkey и доработанный Horn, согласно которому выбросы идентифицируются в квартилях. Рассчитываются значения нижнего Q1 и верхнего Q3 квартилей, межквартильный размах $IQR = Q3 - Q1$. Исключаются РЗ., выходящие за нижнюю границу, определяемую как $Q1 - 1,5IQR$, или превышающие верхний порог $Q3 + 1,5IQR$. Заметим, что после удаления выброса подходящий тест необходимо применить к оставшимся РЗ на предмет выявления другого выпадающего значения.

Методы установления референтных интервалов могут основываться на предположении о нормальном распределении или логарифмически нормальном распределении, поскольку, в действительности биологические параметры, как правило, имеют логарифмически нормальное, а не арифметическое нормальное распределение (которое обычно называют просто нормальным распределением).

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 138 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

Объяснение этого логарифмически нормального распределения биологических параметров следующее: событие, при котором образец имеет половину значения среднего или медианы, как правило, имеет почти равную вероятность произойти, как событие, когда образец имеет значение, вдвое превышающее среднее значение или медиану. Кроме того, только логарифмически нормальное распределение может компенсировать неспособность почти всех биологических параметров принимать отрицательные значения (по крайней мере, при измерении по абсолютным шкалам), в результате чего нет определенного предела размера выбросов (экстремальных значений). в большую сторону, но, с другой стороны, они никогда не могут быть меньше нуля, что приводит к положительной асимметрии.

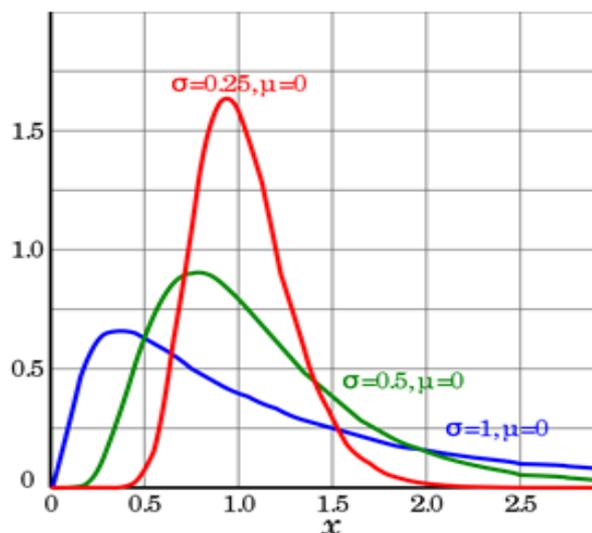


Рис. 35 Некоторые функции логарифмически нормального распределения (здесь показаны с нелогарифмированными измерениями), с одинаковыми средними значениями μ (вычисленными после логарифмирования), но разными стандартными отклонениями σ (после логарифмирования).

Как показано на рис.34, это явление имеет относительно небольшой эффект, если стандартное отклонение (по сравнению со средним значением) относительно невелико, поскольку оно делает логарифмически нормальное распределение похожим на арифметическое нормальное распределение. Таким образом, арифметическое нормальное распределение может быть более подходящим для удобства использования с небольшими стандартными отклонениями, а логарифмически нормальное распределение — с большими стандартными отклонениями.

В логарифмически нормальном распределении геометрические стандартные отклонения и среднее геометрическое более точно оценивают 95-процентный интервал предсказания, чем их арифметические аналоги.

Референтные интервалы для веществ, которые обычно находятся в относительно узких пределах (коэффициент вариации менее 0,213), таких как электролиты, могут быть оценены путем допущения **арифметически нормального распределения**, тогда как референтные интервалы для веществ, которые значительно варьируются (коэффициент вариации обычно превышает 0,213), таких как большинство гормонов, являются более точно устанавливаемыми по логарифмически нормальному распределению.

Метод оценки референтных интервалов для параметра с логарифмически нормальным распределением заключается в логарифмировании всех измерений с произвольным основанием (например, e), выводе среднего и стандартного отклонения этих логарифмов, определении логарифмов, расположенных (для 95%-ного интервала прогнозирования) на 1,96 стандартных отклонения ниже и выше этого среднего значения, а затем возведение в степень с использованием этих двух логарифмов в качестве показателей и с использованием того же основания, которое использовалось при

логарифмировании, при этом два результирующих значения являются нижним и верхним пределом 95% предсказываемого интервала.

ПРИМЕР 1: Нелогарифмическое определение

	Уровень глюкозы в крови натощак (FPG), в ммоль / л	Отклонение от среднего t	Квадрат отклонения от среднего t
Субъект 1	5.5	0.17	0.029
Субъект 2	5.2	-0.13	0.017
Субъект 3	5.2	-0.13	0.017
Субъект 4	5.8	0.47	0.221
Субъект 5	5.6	0.27	0.073
Субъект 6	4.6	-0.73	0.533
Субъект 7	5.6	0.27	0.073
Субъект 8	5.9	0.57	0.325
Субъект 9	4.7	-0.63	0.397
Субъект 10	5.0	-0.33	0.109
Субъект 11	5.7	0.37	0.137
Субъект 12	5.2	-0.13	0.017
	Среднее значение = 5,33 $n=12$	Среднее значение = 0,00	Сумма/($n-1$) = 1,95/11 = 0,18 = стандартное отклонение (SD)

Из таблицы выбранных значений t-распределения Стьюдента, процентиль 97,5% с (12-1) степенями свободы соответствует $t_{0,975;11} = 2,20$

Нижний и верхний пределы стандартного референтного интервала вычисляются как:

$$\text{Нижний предел} = t - t_{0,975;11} \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times SD = 5,33 - 2,20 \times \sqrt{\frac{13}{12}} \times 0,18 = 4,4$$

$$\text{Верхний предел} = t + t_{0,975;11} \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times SD = 5,33 + 2,20 \times \sqrt{\frac{13}{12}} \times 0,18 = 6,3$$

Таким образом, стандартный референтный диапазон для этого примера оценивается в 4,4-6,3 ммоль/ л.

ПРИМЕР 2: Логарифмическое определение

	Уровень глюкозы в крови натощак (FPG), в ммоль / л	$\ln(\text{FPG})$	$\ln(\text{FPG}) - \mu\ln(\text{FPG})$	Квадрат отклонения от среднего $\mu\ln(\text{FPG})$
Субъект 1	5.5	1.70	0.029	0.000841
Субъект 2	5.2	1.65	0.021	0.000441
Субъект 3	5.2	1.65	0.021	0.000441
Субъект 4	5.8	1.76	0.089	0.007921
Субъект 5	5.6	1.72	0.049	0.002401
Субъект 6	4.6	1.53	0.141	0.019881
Субъект 7	5.6	1.72	0.049	0.002401
Субъект 8	5.9	1.77	0.099	0.009801
Субъект 9	4.7	1.55	0.121	0.014641
Субъект 10	5.0	1.61	0.061	0.003721

Субъект 11	5.7	1.74	0.069	0.004761
Субъект 12	5.2	1.65	0.021	0.000441
	Среднее значение = 5,33 <i>n</i> =12	Среднее значение: 1,67 (μ_{\log})		Сумма/(<i>n</i> -1) : 0,068/11 = 0,0062 $\sqrt{0,0062} = 0,079$ = стандартное отклонение натурального логарифма (FPG) (σ_{\log})

Из таблицы выбранных значений t-распределения Стьюдента, процентиль 97,5% с (12-1) степенями свободы соответствует $t_{0,975;11} = 2,20$

Логарифмические нижний и верхний пределы стандартного референтного интервала вычисляются как:

$$\ln(\text{нижнего предела}) = \mu_{\ln} - t_{0,975;11} \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times \sigma_{\ln} = 1,67 - 2,20 \times \sqrt{\frac{13}{12}} \times 0,079 = 1,49$$

$$\ln(\text{верхнего предела}) = \mu_{\ln} + t_{0,975;11} \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times \sigma_{\ln} = 1,67 + 2,20 \times \sqrt{\frac{13}{12}} \times 0,079 = 1,85$$

Преобразование обратно в нелогарифмированные значения выполняется как:

$$\text{Нижний предел} = e^{\ln(\text{нижнего предела})} = e^{1,49} = 4,4$$

$$\text{Верхний предел} = e^{\ln(\text{верхнего предела})} = e^{1,85} = 6,4$$

Таким образом, стандартный референтный диапазон для этого примера оценивается в 4,4-6,4 ммоль/ л.

Пределы РИ должны представляться с 90% ДИ, описывающими диапазон значений истинного предела РИ с 90% вероятностью. Чем уже ДИ, тем надежнее РИ. Считается приемлемым, если ДИ не превышает 0,2 ширины РИ. Наиболее сильно на ДИ влияет размер выборки. В связи с этим, согласно рекомендациям IFCC, для расчета РИ непараметрическим методом требуется как минимум 120 РЗ. Для определения пределов РИ параметрическим методом необходимо более 200 РЗ, так как в районе 150 РЗ и ниже параметрический метод нестабилен.

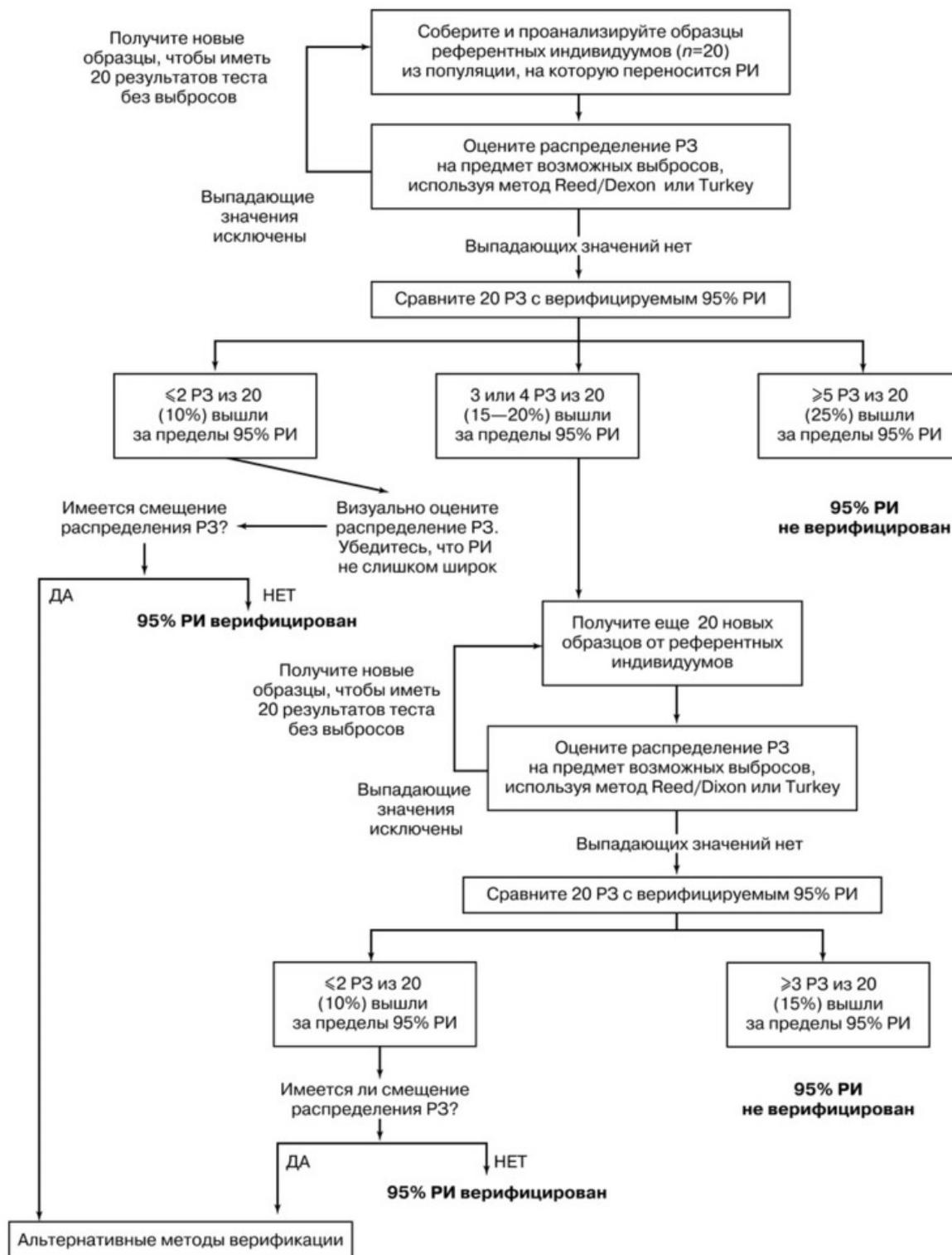


Рис 35 Блок-схема для прямого метода верификации референтных интервалов

Непрямой метод верификации РИ Непрямой метод РИ верификации РИ

При непрямом методе предпочтение отдается использованию данных обследуемых амбулаторно пациентов. В случае госпитальных баз необходима идентификация заболеваний по кодировке с исключением определенных подгрупп в зависимости от исследуемого анализата. Также для исключения могут использоваться другие доступные в системе данные о состоянии здоровья пациента. С целью снижения вероятности наличия

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	---	---------------------

патологического результата используются только РЗ пациентов с единственным результатом или в серии измерений выбирается последний результат.

РИ при непрямом методе рассчитываются с помощью специальных математических инструментов, в частности с использованием анализа Bhattacharya и его модификаций, метода Hoffman, F. Arzideh, которые менее чувствительны к присутствию патологических результатов по сравнению с классическими параметрическим или непараметрическим методами. В Интернете доступны следующие приложения: на базе excel Bellview Bhattacharya analysis (Doug Chesher) <https://sourceforge.net/projects/bellview/>; на базе excel от Graham Jones <http://www.syddpath.stvincents.com.au/>; <https://www.r-bloggers.com/mining-your-routine-data-for-reference-intervals-hoffman-bhattacharya-and-maximum-likelihood/>.

Помимо способов верификации, рекомендованных в стандарте CLSI, существуют и другие подходы, в частности **data mining** — использование локальных информационных баз данных, позволяющее отобрать сотни и тысячи результатов лабораторных исследований условно здоровых индивидуумов. В этом случае применяется оценка меры центральной тенденции распределения данных (медианы или моды), которая более устойчива к присутствию патологических результатов, чем пределы РИ. Для оценки аналитического или популяционного смещения сравниваются медиана данных, извлеченных из информационной системы, с медианой выборки РЗ, использованных для установления РИ. Помимо этого, необходимо мониторить процент аномальных результатов и оценить долю флагов, т. е. значений, попадающих за пределы используемого РИ, — текущую и ожидаемую при переходе к верифицированному РИ.

Если изменение доли флагов не превысит допустимые пределы, то РИ считается приемлемым. Согласно концепции минимального, оптимального и желаемого предела смещения, доля флагов может варьировать в диапазоне от 1,0 до 1,8% для флагов о выходе за нижний предел РИ и от 5,7 до 3,3% для флагов превышения верхней границы РИ. Не рекомендуют использовать **data mining**, если нет четкого различия между распределениями РЗ здоровых и нездоровых лиц или существует значительное смещение между методами, приводящее к ложному завышению или занижению доли флагов.

Критерий приемлемости (переноса интервала)

Если два или менее результатов не будут попадать в заявленные производителем референтные границы, референтный интервал следует рассматривать в качестве верифицированного.

Альтернативный стандарту CLSI подход — мониторинг медианных значений и частоты результатов за пределами РИ может с успехом применяться не только для первичной верификации, но и при проведении периодических подтверждений корректности используемых РИ. При проведении верификации полезно дополнительно рассчитать РИ непрямым методом на основе данных информационной системы. В дальнейшем периодически проводить аналогичные расчеты и сравнивать получаемый РИ с первоначально рассчитанным непрямым методом РИ для подтверждения стабильности используемого РИ и отсутствия аналитического или популяционного смещения.

VIII ВАЛИДАЦИЯ ОТБОРА ПРОБ

Когда испытуемый объект является неоднородным, фактическая неопределенность (неточность) результата испытаний будет включать кроме аналитической неопределенности, о которой шла речь в предыдущих разделах, неопределенность отбора и физической подготовки пробы к анализу (стирание, квартование).

Неопределенность отбора проб будет влиять не на компоненты матрицы (например, для руд – не на содержание породобразующих компонентов), а на аналиты, содержание которых в пробах мало.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 143 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

$$u(X) = \sqrt{u_{\text{Sampling}}^2 + u_{\text{analytical}}^2}$$

Пренебрегать вкладом пробоотбора по сравнению с анализом нельзя, так как зачастую именно вклад пробоотбора, оказывается более существенным. Ниже представлены примеры вкладов неопределённости результат испытаний согласно [35]

Аналит и объект испытаний	Расширенная неопределенность		
	Отбор проб	Анализ	Суммарная
Нитраты в свежих овощах	14,5 %	7,6 %	16,4 %
Свинец в почве	83,3%	10,5 %	83,9 %
Железо в подземных водах	11 %	1,9 %	11 %
Витами А в каше для детского питания	9,9 %	17 %	20 %

Соотношение вкладов 2:1 уже является очень удачной ситуацией и реализуется для более гомогенных продуктов. Даже если, мы не принимаем в расчет вклад неопределенности отбора пробы (включая физическую подготовку, например, истирание, квартование и др.), он **существует помимо нашего желания. Что отражается в разногласиях относительно заявленного результата (на производстве для производственной лаборатории, с заказчиками и др.) при подтвержденной, участием в ПК и МЛС, аналитической неопределенности испытаний.**

Неоднородность также будет проявляться в разбросе физических свойств объектов, если они имеют неоднородный состав (шифер, арматура, бетонные кубики и др.)

В некоторых отраслях, неопределенность отбора пробы, несмотря на ее наличие, не оценивается, а оцениваются специально устроенные показатели. Например, в фармацевтике – неоднородность дозирования – устанавливает допускаемый вклад неоднородности объекта испытаний – лекарственного средства в лекарственной форме.

Рассмотрение отбора пробы как неотъемлемой части процесса испытания, делает необходимым **определить вклад неопределенности отбора пробы в общую неопределенность испытаний** - проводить валидацию отбора проб. Однако, в соответствии с F.2.6.2. GUM установлено, что для искусственно созданных объектов не требуется верификация неопределенности отбора проб.

Даже в случае гомогенного объекта **должно быть доказано**, что отбор проб не влияет на общую неопределенность испытания. В этом случае, вместо проведения эксперимента по исследованию двойных проб, пример которого приведен ниже, как минимум, для одних и тех же отобранных образцов неизменного объекта, должен быть запланирован и выполнен эксперимент по сравнению неопределенности анализа и общего разброса результатов испытаний для отобранных объектов.

Для этого отбирается большее количество проб, чем запрашивается процедурой или методом отбора проб, чтобы обеспечить большую изменчивость пробы (минимум 6 - что обеспечивает 5 степеней свободы). Объекты анализируются с оценкой неопределенности анализа $x_i \pm U_a$. Также рассчитывается общее среднее \bar{x} и стандартное отклонение всех полученных результатов испытаний s . Неопределенность отбора можно считать незначимой, при соблюдении следующего комплекса условий:

- разница между каждым отдельным результатом испытания и общим средним меньше расширенной неопределенности анализа:

$$|x_i - \bar{x}| < U_a$$

- стандартное отклонение результатов испытаний для разных проб меньше 1/3 стандартной неопределённости анализа (1/6 расширенной неопределённости анализа)

$$s < \frac{1}{6} U_a$$

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Если, по результатам проведенного эксперимента указанные условия не выполняются, или даже для гомогенного объекта невозможно обеспечить стабильность объекта от которого отбирается проба (испытание потоков газов, жидкостей) следует проводить валидацию проботбора, например, методом двойных проб.

Валидация представляет собой единоразовое оценивание составляющих неопределенности, определенных при предполагаемых условиях регулярного применения метода отбора – она включает случайную и систематическую составляющие. В общем случае, валидация может быть проведена для метода отбора пробы (первичная валидация) или места отбора пробы – для метода, применяемого "по месту" ("on line") к выбранному целевому объекту (валидация по месту применения. Например для карьера, подземного водоема и др.).

Первичную валидацию используют тогда, когда отбор проб выполняют как единоразовую процедуру (точечный отбор проб, например, при исследовании очага загрязнения), а валидацию на месте повторяют через определенные интервалы времени (повторный отбор проб, например, пропорциональный времени или расходу отбор проб сточной воды).

Прецизионность отбора пробы и анализа можно оценить путем повторения некоторой части (например, 10 %) проб и анализов, соответственно. Смещение, связанное с отбором проб, можно оценить с помощью эталонного целевого объекта (эквивалент стандартного образца для отбора пробы). Альтернативный вариант – использование результатов измерений, полученных при межлабораторных сличениях, в которых смещение отбора пробы, потенциально вносимое каждым участником, **входит в оценку неопределенности**, основанную на суммарном разбросе данных.

Некоторые составляющие неопределенности, связанные с систематическими факторами, оценить сложно, однако это можно не делать, если существуют убедительные доказательства того, что влияние систематических факторов незначительно и они надежно контролируются. Такие доказательства могут быть качественными, например, основанными на знании химической или физической природы целевого объекта, или количественными, например, полученными по результатам выполненных ранее измерений на полных партиях.

Валидация демонстрирует реальную неточность результатов, вносимую конкретной принятой схемой отбора пробы. Понятно, что при изменении схемы отбора (задачи оптимизации), валидация повторяется.

Неопределённость отбора пробы по сути представляет разность дисперсии результата, дисперсии, связанной с различием испытываемых объектов и неопределённостью анализа. Т. е. это доля изменчивости результатов, вносимая процедурой отбора и физической подготовки пробы.

$$u_{\text{Sampling}} = \sqrt{u_{(X)}^2 - u_{\text{objects}}^2 - u_{\text{analytical}}^2}$$

Расчеты реализуются путём метода дисперсионного анализа (ANOVA – анализ вкладов дисперсий). Подробно методы валидации, контроля качества отбора пробы и описаны в [35]*.

В минимальном варианте повторение заключается в отборе двух проб из каждого целевого объекта при полном (и надлежащим образом рандомизованном) повторении процедуры отбора пробы (**метод двойных проб**). **Двойной пробой** называются пробы, полученные по отдельности в одно и то же время по одной и той же методике отбора.

Сравнения между схемами отбора должны быть выполнены не менее чем для 8 объектов.

Ниже приведен пример расчета неопределённости измерений отбора пробы **методом размахов**. Этот метод доступен для понимания и дает те же результаты**, что и результаты

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 145 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

полученные на основе расчета стандартных отклонений или применения дисперсионного анализа ANOVA в его классическом и робастном вариантах.

Пример.

Оценка концентрации нитратов производится для каждого участка поля до 20000 головок салата, и результат для каждого участка используется индивидуально при оценке соответствия предельно допускаемой концентрации (4500 мг/кг). Соответственно, целевым объектом считаются не отдельные головки салата, а каждый участок.

Ниже на рис. 34 приведена W-образная схема отбора на участках. Чтобы провести валидацию на каждом из восьми участков, были отобраны по две **объединенные** пробы с использованием W-образной схемы отбора. Причем для получения второй объединенной пробы с того же участка, схема отбора была применена в зеркальном варианте.



Схема S1 Схема S2

Рис 35 Зеркальные схемы отбора

Типовой эксперимент по определению неопределенности отбора выглядит следующим образом:

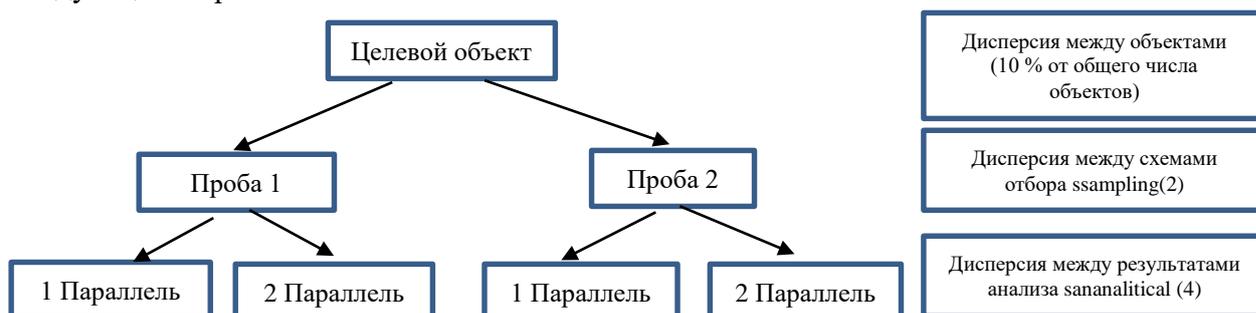


Рис. 36 Схема эксперимента по валидации отбора проб.

В примере ниже 8 объектов; 2 схемы отбора; 2 параллельных результата испытаний в каждом случае.

Целевой объект	Схема отбора S1		Схема отбора S2		Среднее по схеме S1	Среднее по схеме S2	Общее среднее	Размах для схемы S1	Размах для схемы S2	Размах между средними
	Результаты Параллельных испытаний		Результаты параллельных испытаний		\bar{S}_1	\bar{S}_2				
	X_{i1}	X_{i2}	X_{i1}	X_{i2}	$\frac{ X_{i1} + X_{i2} }{2}$	$\frac{ X_{i1} + X_{i2} }{2}$	$\frac{ \bar{S}_1 + \bar{S}_2 }{2}$	$ X_{i1} - X_{i2} $	$ X_{i1} - X_{i2} $	$ \bar{S}_1 - \bar{S}_2 $
$(i=1...k)$	X_{i1}	X_{i2}	X_{i1}	X_{i2}	В единицах измеряемой величины мг/кг					
1	3898	4139	4466	4693	4018,5	4579,5	4299,0	241	227	561
2	3910	3993	4201	4126	3951,5	4163,5	4057,5	83	75	212
3	5708	5903	4061	3782	5805,5	3921,5	4863,5	195	279	1884*
4	5028	4754	5450	5416	4891,0	5433,0	5162,0	274	34	542
5	4640	4401	4248	4191	4520,5	4219,5	4370,0	239	57	301
6	5182	5023	4662	4839	5102,5	4750,5	4926,5	159	177	352
7	3028	3224	3023	2901	3126,0	2962,0	3044,0	196	122	164
8	3966	4283	4131	3788	4124,5	3959,5	4042,0	317	343	165
	#	#	#	#	#	сумма Σ	27678,5	1704	1314	4181
						n	8	8	8	8
						среднее	4345,56	213	164	523
	Общее стандартное отклонение всех отдельных результатов				-	-	-	-	-	749

Для полученных результатов испытаний для каждого объекта вычисляют:

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

- размах результатов параллельных испытаний для каждой схемы (R1 и R2);
- среднее значение параллельных испытаний для каждой схемы (S1) и (S2);
- размах между результатами испытаний между схемами отбора R;
- общее среднее значение между результатами испытаний для двух схем отбора S.

На основании полученных оценок по каждому объекту, вычисляют:

- среднее средних размахов между параллельными испытаниями для обеих схем - (R_A);
- среднее размахов между результатами для каждой схемы – R_{S+A} - он связан с действием двух факторов анализа (индекс А) и отбора (индекс S – sampling);
- стандартное отклонение (s) средних результатов анализа - оно включает разброс связанный как с анализом и отбором, так и с различием между объектами.

Полученные размахи переводят в стандартные отклонения (для n=2, формула имеет вид

$$S = \frac{R}{1,128}$$

Источник дисперсии	Размах по факторам мг/л		Стандартное отклонение мг/л		Дисперсия (мг/л) ²
Анализ*	$R_A = \frac{R1 + R2}{2}$	$R_A = \frac{213+164}{2} = 188$	$S_A = \frac{R_A}{1,128}$	$S_A = \frac{188}{1,128} = 167$	$S_A^2 = 167^2 = 27962$
Отбор проб	$R_{S+A} = \frac{\sum R}{n_R}$	$R_{S+A} = \frac{4181}{8} = 523$	$S_{S+A} = \frac{R_{S+A}}{1,128}$	$S_{S+A} = \frac{523}{1,128} = 463$	$S_{S+A}^2 = 463^2 = 214665$
Между целевыми объектами	-	-	$S_{O+S+A} = s(\bar{S})$	$S_{O+S+A} = 749$	$S_{O+S+A}^2 = 749^2 = 561288$

Источник дисперсии	Дисперсия	Интерпретация		SD мг/кг	CV %	U% k=2
Анализ	S_A^2		= 27962	167	3,85	7,7
Отбор проб*	$S_{S+A}^2 = S_S^2 + S_A^2$	$S_S^2 = S_{S+A}^2 - S_A^2 / 2$	= 214665 – 27962 / 2	448	10,3	20,6
Между целевыми объектами	$S_{O+S+A}^2 = S_{S+A}^2 + S_O^2$	$S_O^2 = S_{O+S+A}^2 - S_{S+A}^2 / 2$	= 561288 – 214665 / 2	674	15,5	-
	Неопределенность измерений с учетом отбора	$S_{S+A}^2 = S_S^2 + S_A^2$	= 214665 + 27962	478	11	22

Чтобы разложить общую дисперсию результатов требуется пользоваться дисперсиями величин – поэтому находят квадраты стандартных отклонений.

* Если, число параллельных испытаний 3 или 4, в знаменателе выражений $R_A = \frac{R1+R2}{2}$ и $S_A^2/2$ будет стоять фактическое число параллельных испытаний, а для перевода размаха в стандартное отклонение потребуется коэффициент из таблицы раздела VI. IV (2.). Сам размах при этом рассчитывается как

$$R_A = \frac{R_{MAX} + R_{MIN}}{2}$$

*Такое большое отклонение, свидетельствует о том, что данный результат является выбросом. Поэтому, расчёты с использованием робастного дисперсионного анализа дают несколько иные результаты (представлены в таблицы в начале раздела).

Представление результатов валидации:

Расширенная неопределенность, коэффициент охвата k=2			Вариация содержания нитратов на участках
Анализа	Отбора проб	Неопределённость измерения, включая отбор проб	
7,7 %	20,6 %	22 %	15,5 %

Дальнейший контроль качества отбора для обеспечения уверенности, что первоначально определенное соотношение неопределенностей пробоотбора и анализа соблюдается. Для контроля качества проводится сопоставление не 8 наборов данных, а только одного, результаты контроля могут быть нанесены на контрольную карту Шухарта [35].

IX ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ВАЛИДАЦИИ / ВЕРИФИКАЦИИ МЕТОДОВ

IX.1 РАСЧЕТ ПРЕДЕЛА ПРИНЯТИЯ РЕШЕНИЯ

Если лаборатория указывает результаты испытаний как: «Ниже ПДК»/ «Выше ПДК», «Ниже предела обнаружения» / «Менее чувствительности метода», то ей требуется установить уровень риска, соответствующий этим заявлениям и предел принятия решения (критический уровень) для данного уровня риска.

В том случае, если проводятся испытания на подтверждения содержания аналита выше или ниже ПДК, требуется рассчитать критический уровень (предел принятия решения) CC_{α} (основанный на установленном правиле принятия решения и уровне риска принятия неверного решения).

$$CC_{\alpha} = ПДК + k * u$$

k – коэффициент основанный на уровне риска см ИЛАС G8 Руководство по правилам принятия решения.

CC_{α} фактически представляет собой тот же ПДК, с учетом уровня достоверности ($\alpha=95\%$ и более), в сторону потребителя (защитная полоса потребителя). Для запрещенных веществ превышение ПДК принято рассчитывать с 95% уровнем достоверности ($k=1,645$) [33].

k	Уровень достоверности α	Уровень риска неверного решения β
1	50 %	50 %
1,645	95 %	5 % (односторонний интервал)
2	97,5 %	2,5 % (двусторонний интервал)

Если лаборатория в своей практике использует этот подход в отчете об испытаниях должна сообщаться также предельно допустимая концентрация ПДК.

Другой случай касается ситуации, когда речь идет об обнаружении/необнаружении вещества [36].

В этом случае рассчитывается предел CC_{β} , где ($\beta=100-\alpha$) - вероятность не обнаружить аналит, присутствующий в концентрации, равной пределу обнаружения.

CC_{β} - это самый низкий результат измерения, который с достаточной уверенностью демонстрирует, что аналит присутствует в образце (концентрация > 0).

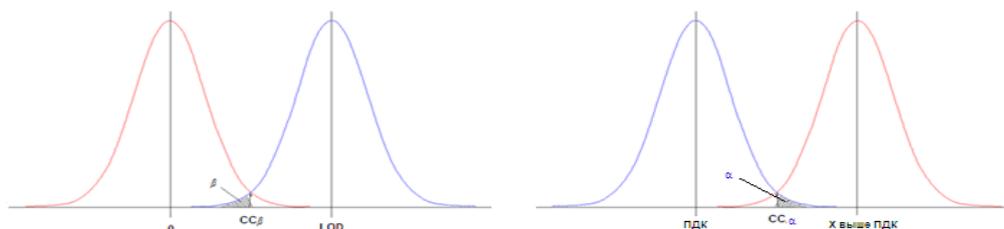


Рис. 37 Иллюстрация пределов принятия решения о содержании аналита в образце.

$$CC_{\beta} = k * s_0$$

Где s_0 – стандартное отклонение результатов холостой пробы. В некоторых случаях, например в ПЦР методе, используют не стандартное отклонение результатов холостой пробы, а наименьшую стандартную неопределенность u_0 .

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Если критические уровни не рассчитываются, а решение принимается с использованием ПДК и LOD ($k=1$) в качестве критического уровня, уровень риска неверного заключения составляет 50%.

IX. II ЦЕЛЕВАЯ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ

Тот факт, что неопределенность сообщается с результатом измерения, не гарантирует ее пригодность для предполагаемого использования.

Целевая неопределенность измерения (целевая MU) – максимально допустимая неопределенность, определяемая для конкретной цели измерения.

Эта целевая неопределенность является дополнительным требованием к определенным ‘в процессе верификации/валидации эксплуатационным характеристикам и имеет то преимущество, что суммирует в одном параметре требования ко всем источникам неопределенности, включая даже те, которые обычно остаются непроверенными, поскольку они не проявляются в обычных характеристиках производительности.

Целевая неопределенность может быть выведена из интервала допуска, определяемого его минимальным (Q_{min}) и максимальным (Q_{max}) пределами, или от значения количества, превышающего или ниже одного предела, за пределами которого должна быть низкая вероятность неправильного решения о соблюдении требований (см. этот же раздел выше).

Целевая расширенная неопределенность, U_{tg} , как правило, должна быть в 8 раз меньше диапазона соответствия:

$$U_{tg} = \frac{Q_{max} - Q_{min}}{8}$$

Коэффициент 8 выбран потому, что теоретически это позволяет одновременно разместить четыре неперекрывающихся результата измерений, сообщаемых с расширенной неопределенностью, считающихся минимальной способностью к распознаванию в пределах этого интервала [38]. В некоторых видах испытаний целевая неопределенность может составлять от 1/5 до 1/3 (например в метрологии)

$$U_{tg} = \frac{Q_{max} - Q_{min}}{3}$$

В принципе, фактически оцененная неопределенность должна быть меньше целевой неопределённости.

Если, целевая неопределенность не определена в правилах или спецификациях, можно рассмотреть дополнительный допуск в 20-30%, позволяющий учитывать изменчивость процесса оценки неопределенности от оцененной лабораторией.

X ОСОБЕННОСТИ ПОДХОДА ПЛАНИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА ВЕРИФИКАЦИИ МЕТОДОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДО ВВЕДЕНИЯ ТРЕБОВАНИЙ ISO/IEC17025:2017

На практике стран СНГ многие ООС не использовали подходы к планированию верификации в связи с применением стандартных методов. Если для верификации методов будут использоваться имеющиеся на текущий момент данные исследований ООС, то планирование верификационных исследований методов не применимо.

В этом случае, ООС требуется подготовить только отчет на текущий момент времени по верификации методов со ссылкой на исходные данные, полученные в процессах внутрिलाбораторного и межлабораторного контроля.

Если ООС приступает к внедрению стандартного метода, то планирование эксперимента для определения эксплуатационных характеристик метода обязательно.

№ издания	7	Дата введения	01.01.2025	Стр. 149 из 161
-----------	---	---------------	------------	-----------------

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Область применения метода и критерии его валидации /верификации должны быть определены и задокументированы. На первом этапе, необходимо установить цель и условия применения конкретного метода. Вторым этапом является экспериментальное определение выбранных эксплуатационных параметров в соответствии с настоящим документом на основе цели и условий применения метода. Подходы (Приложение А, Б) и результаты (Приложение В) должны быть документированы.

Приложение А Рекомендуемая форма плана валидации/верификации методов

Форма плана и отчет верификации должны быть к спецификае лабораторной деятельности, так:

- “вероятные образцы матриц” для физико-механических испытаний представляют собой вероятные образцы объектов, а для медицинских лабораторий – биоматериал.
- законодательные требования для медицинских лабораторий трансформируются в референтный интервал;
- Помехи могут возникнуть от не выполнения условий окружающей и др. для медицинских лабораторий трансформируются в интерферирующие влияния и т.д.

Название и идентификация метода	Метод измерений: Определение А {аналит или } в присутствии В {мешающие влияния} в С {тип образца/матрица} с использованием Д {принцип метода}
НД на метод/ Публикация на метод	Опубликованный стандартный метод (немодифицированный)/основанный на опубликованном стандартном методе (модифицированный)/ метод, разработанный в ООС
А: Цель измерения (что должно быть определено и почему)?	Аналит или аналиты
Измеряемая величина	Величина которая будет непосредственно измеряться в процессе эксперимента
В: Существуют ли какие-либо известные помехи, которые существуют для данного метода?	Мешающие влияния/аналиты, оказывающие мешающие влияния
С: Каковы вероятные образцы матриц?	Матрицы – по видам продукции, агрегатного состояния.
Диапазон применения метода согласно НД/публикации на метод испытаний	
Область применения метода в целях ООС (каковы ожидаемые уровни концентрации или диапазоны измерений)?	Диапазон от наименьшей до наибольшей величины, в процессе рутинной деятельности ООС
Законодательные или нормативные требования к объекту испытаний, референтный интервал	- ПДК, установленная ТР ТС; Сан ПиН и т.д. - требования технологического процесса (Технический регламент, схема технологического процесса)
Требования к температуре, влажности	

и др. во время процесса испытаний		
Помехи могут возникнуть от не выполнения условий окружающей среды и др.		
Какой тип оборудования должен использоваться? Выполняется ли метод одной конкретной единицей оборудования или он должен выполняться всеми единицами оборудования одного и того же типа?	Применяемое оборудование с указанием заводского №	
Метод, используемый для подготовки, отбора проб, включая используемое оборудование?	Наименование метода пробоподготовки, оборудование используемое для пробоподготовки (при необходимости)	
И др. (при необходимости)		
Цель исследования	валидация нового метода/верификация матрицы расширение области применения стандартного опубликованного метода/ или др.	
Определяемые эксплуатационные характеристики	Порядок определения Количество проб, концентрация образцов, число повторов, операторов и др.	Срок исполнения/ исполнитель
.....		
.....		
Неопределенность результатов измерений	Метод оценки неопределенности измерений	

Подписи:

Ответственный исполнитель _____ Руководитель подразделения _____

Дата:

Приложение Б Пример плана верификации для определения следовых количеств веществ

Название и идентификация метода	Определение мышьяка, кадмия, ртути и свинца методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой	
НД на метод/ Публикация на метод	ГОСТ 34141-2017 – опубликованный стандартный метод	
А: Цель измерения (что должно быть определено и почему)?	Определение кадмия	
Измеряемая величина	Программное обеспечение масс спектрометра автоматически рассчитывает массовую долю аналита	
В: Существуют ли какие-либо известные помехи, которые существуют для данного метода?	нет	
С: Каковы вероятные образцы матриц?	Молоко цельное, молоко восстановленное, кефир, йогурт	

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Диапазон применения метода согласно НД/публикации на метод испытаний	от 0,005 до 100,000 мг/кг	
Область применения метода в целях ООС (каковы ожидаемые уровни концентрации или диапазоны измерений)?	от 0,005 до 1,0 мг/кг	
Законодательные или нормативные требования к объекту испытаний	ПДК (Cd) 0,02 мг/кг ТР ТС 033/2013	
Требования к температуре, влажности и др. во время процесса испытаний	Условия для работы масс спектрометра.	
Помехи могут возникнуть от не выполнения условий окружающей среды и др.	Стабильность растворов при хранении без холодильника	
Какой тип оборудования должен использоваться? Выполняется ли метод одной конкретной единицей оборудования или он должен выполняться всеми единицами оборудования одного и того же типа?	Квадрупольный масс спектрометр с индуктивно-связанной плазмой ИСП-МС № 230-9565	
Метод, используемый для подготовки, отбора проб, включая используемое оборудование?	Микроволновая печь	
И др. (при необходимости)	-	
Цель исследования	Верификация матрицы – цельное молоко, восстановленное молоко, кефир, йогурт на примере молока	
Характеристики валидации/верификации	Способ валидации/верификации	Срок исполнения/исполнитель
Предел количественного определения LOQ	Рабочий раствор (C=ПДК) разбавить 10 раз. Не менее 10 измерений	
Предел обнаружения (LOD)	3*SD LOQ	
Стабильность основного раствора	повторно проанализировать <u>рабочие растворы</u> (C=ПДК) 6 серий, которые хранились при комнатной температуре, и в холодильнике при +5±3°C (в течение 2-х дней).	
Линейность	Выбор диапазон концентраций Число стандартов в калибровочной кривой (минимальное - 5)	
Повторяемость	Сравнение результатов, полученных в условиях повторяемости (ПДК±20%)	
Воспроизводимость (RSD, %)	Сравнение результатов полученных в условиях воспроизводимости (ПДК±20%)	

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Правильность измерений (смещение, bias, %)	Анализ референтного материала Анализ образца с добавкой Участие в сличительном испытании (ПК)	
Неопределенность результатов измерений	Оценка неопределенности результатов измерений с использованием глобального подхода TR Nopdtest 537	

Подписи:

Ответственный исполнитель _____ Руководитель подразделения _____

Дата:

Приложение В Рекомендуемый отчёт о валидации/верификации метода (пример)

Название и идентификация метода		
Ответственные за проведение испытаний\исследований		
Период проведение верификации		
Объект и показатель		
Диапазон применения метода согласно НД		
Диапазон рутинных проб (выбор точек диапазона)		
Законодательные или нормативные требования к объекту испытаний, референтный интервал		
Матрица		
Параметры валидации/верификации	Результат	Критерии приемлемости
Линейность Число стандартов в калибровочной кривой ____	$R^2 =$ Дата* $R^2 =$ Дата $R^2 =$ Дата	$R^2 > 0,99$
Повторяемость (SD, мг/кг)	SD= Дата* r	r не более 21 %
Воспроизводимость (RSD, %) Число повторных измерений ____ Число измерений в контрольной карте ____	RSD%= Дата* RSD%= Дата	0,005...0,010 RSD менее 22 % 0,010...0,1 RSD менее 14 % 0,1...100,0 RSD менее 7 %
Правильность измерений (смещение, bias, %) Анализ референтного материала	bias, % *	R

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--------------------------------------	--	---------------------

Анализ образца с добавкой	bias, %	
Участие в сличительном испытании	bias, % z- критерий	$Z \leq 2$
Неопределённость измерения $U = 2\sqrt{RSD^2 + bias^2}$ (Nordtest Technical Report 537)	U% *90%	20% U% менее целевой неопределённости; U менее 1/8 пределов допуска или др.
Общая оценка метода Выводы относительно соответствия/несоответствия эксплуатационных характеристик критериям приемлемости		

*Свидетельства валидации/верификации: полученные результаты, отчеты МЛС, ПК, протокольные записи валидации/верификации в рабочих журналах, бланках и т. д.

Ф.И.О., подписи:

Ответственный исполнитель _____ Руководитель подразделения _____

Дата:

Приложение Г Статистический план эксперимента по валидации /верификации метода [14]

Серия День	Повторы (Параллели)	Холостая проба (Бланк)	Повторяемость Воспроизводимость		CRM 1	CRM 2	Затравленный образец низкого уровня (LOQ)	Затравленный образец 1	Затравленный образец 2
			Образец 1	Образец m					
1	1	Бланк	Образец 1	Образец m	CRM 1	CRM 2	Затравленный образец	Затравленный образец 1	Затравленный образец 2
1	Бланк	Образец 1	Образец m	CRM 1	CRM 2	Затравленный образец	Затравленный образец 1	Затравленный образец 2
1	n	Бланк	Образец 1	Образец m	CRM 1	CRM 2	Затравленный образец	Затравленный образец 1	Затравленный образец 2
p	1	Бланк	Образец 1	Образец m	CRM 1	CRM 2	Затравленный образец	Затравленный образец 1	Затравленный образец 2
p	Бланк	Образец 1	Образец m	CRM 1	CRM 2	Затравленный образец	Затравленный образец 1	Затравленный образец 2
p	n	Бланк	Образец 1	Образец m	CRM 1	CRM 2	Затравленный образец	Затравленный образец 1	Затравленный образец 2

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Приложение Д Рекомендуемое содержание изложения стандартной операционной процедуры на методы

1. Область применения (НД на метод, анализ, диапазон, матрица).
2. Применяемые реактивы и оборудование (требуется не путать с описанием в ГОСТ):
 - конкретное применяемое в ООС оборудование (в общем виде или с указанием типов приборов),
 - конкретные применяемые реактивы – например: ацетонитрил для хроматографии, (а не ч.д.а, если используется зарубежный продукт и он не имеет такой валификации).
 - сухие питательные среды марок... и т.д.
3. Процесс пробоподготовки (схема, таблица, в той форме как удобно ООС) должно быть отражено количество проб, их объём, последовательность операций.
4. Процесс измерений (схема, таблица и т. д.) отражающий последовательность операций.
5. Проводимые расчёты.
6. Контрольные процедуры, проводимые наряду с рутинными испытаниями. Критерии приемлемости контрольных процедур для признания пригодными результатов рутинных испытаний.



easi-tab™ Reference Materials

Instructions for use

1. Storage

On receipt, the **easi-tab™ Reference Materials** should be stored in a freezer at $<-20^{\circ}\text{C}$. An expiry date is stated on the Statement of Measurement as being 6 or 12 months from the date received. This date should be added manually by the customer on receipt of the order. The products may still be suitable for use after the expiry date if the levels of microorganism on testing are still within the minimum and maximum limits given on the Statement of Measurement.

2. Presentation

The **easi-tab™ Reference Materials** provide an easy-to-use product available in packs of 10. The product may be presented in one of two different formats to ensure stability during transport and storage.

- A small tablet in a 2ml plastic tube
- A pellet of lyophilised material sealed under vacuum in a 2ml glass vial

3. Statement of Measurement

A Statement of Measurement accompanies each batch of **easi-tab™ Reference Materials** and this states the measured level of the microorganism(s) using the method described, along with the minimum and maximum (95% confidence) limits. The level on the Statement of Measurement represents the number of microorganism(s) per tablet or pellet of lyophilised material.

4. Reconstitution

Food microbiology enumeration tests

The **easi-tab™ Reference Materials** can be reconstituted in Maximum Recovery Diluent (MRD) or any comparable microbiological diluent. Different volumes of diluent can be used, e.g. 1ml, 10ml, 100ml, depending on the final level of microorganism (cfu/ml) required.

- The tablet format may be added directly to the final quantity of diluent required. Ensure that the diluent and tablet have both been held at room-temperature for at least 10 minutes before mixing. Once added to diluent, leave the tablet at room-temperature for at least 15 minutes in order to allow the microorganism to fully resuscitate. Mix again fully prior to starting the analysis and use the resulting suspension in accordance with your routine method.
- The pellet lyophilised material format must be first resuscitated directly in the vial. Ensure that diluent and vial have both been held at room-temperature for at least 10 minutes before mixing. Add 1ml of diluent to the vial and leave at room-temperature for at least 15 minutes in order to allow the microorganism to fully resuscitate. The 1ml may then be used directly or transferred to other volumes of diluent in order to give the desired final level.

Food microbiology detection tests

250ml of diluent should be used in order to be consistent with routine detection methods and also to ensure that low-levels of microorganisms are present as would be expected in routine samples. Procedures for resuscitation are the same as for "Food microbiology enumeration tests".

Water microbiology enumeration tests

100ml of diluent should be used in order to give levels of microorganism that are suitable for water testing using membrane filtration, with the exception of RM29. This product is designed for direct enumeration, and should therefore be reconstituted in a volume of diluent suitable for the target level. Procedures for resuscitation are the same as for "Food microbiology enumeration tests".



easi-tab™ Reference Materials

Instructions for use

Note

In every case, please remember to take all dilutions into account when calculating the expected final level. For example, if the Statement of Measurement reports a level of 1000 microorganisms per reference material

- If diluted in 1ml of diluent, this will give 1000 cfu/ml in the final volume
- If diluted in 10ml of diluent, this will give 100 cfu/ml in the final volume
- If diluted in 100ml of diluent, this will give 10 cfu/ml in the final volume

5. Adding directly to food samples

easi-tab™ Reference Materials may be used to spike real food or **easi-tab™ Sterile Materials**.

Once diluent has been added, allow a recovery period of at least 15 minutes, mix the resulting suspension thoroughly and test the sample in accordance with your routine method. If the **easi-tab™ Reference Materials** is to be added to food samples, consideration must be given to the potential inhibitory effects of the food material.

6. Stability information

Each microorganism used in **easi-tab™ Reference Materials** will be validated for stability at <-20°C for 12 months, 2-8°C for 1 month and 22°C for 3 days. The products are packaged and transported in such a way as to minimise the effects of environmental conditions on the viability of the microorganisms. If on receipt and testing of the **easi-tab™ Reference Materials** you find that the levels have fallen below the limits given in the Statement of Measurement, please report immediately to your local office or ptcustomerservices@lgcgroup.com

7. Safety information

All reference materials must be regarded as containing potentially pathogenic microorganisms and must be handled by, or under the supervision of, competent persons who have received training in microbiological techniques. The responsibility for ensuring the safe handling of reference materials after receipt rests with the recipient. LGC Ltd. cannot accept responsibility for any event resulting from the mishandling of reference material.

For Safety Data information, please refer to the Material Safety Data Sheet.



Приложение Ж Представление результатов проверки квалификации для моличественных микробиологических методов

(как видно количество микроорганизмов, может быть представлено в log 10 КОЕ)

Standard Dialog LLC
49/4 Mornitas ave.
0051 YEREVAN
ARMENIA
Karen Darbinyan



Final report for Laboratory Proficiency Testing in Food Microbiology Version 1

desember 13, 2016

Parameter	Sample	Number results	Your answer	Your answer (log)	Participants' mean (log)	S.d. (log, from all)	Lower tolerance limit (log)	Upper tolerance limit (log)	Your Z-score	Your Zeta-score
Aerobic colony count	A	132	22000	4,34	4,19	0,38	3,05	5,33	0,39	0,36
	B	129	30000	4,60	4,22	0,42	2,95	5,49	0,60	0,54
	C	130	24000	4,38	4,21	0,41	2,97	5,44	0,42	0,41
Enterobacteriaceae	A	107	3700	3,57	3,26	0,26	2,48	4,03	0,21	0,16
	B	103	3400	3,53	3,27	0,24	2,56	3,99	0,08	0,05
	C	105	4000	3,60	3,25	0,24	2,53	3,97	0,46	0,27
Coliform bacteria	A	79	2700	3,57	3,23	0,32	2,28	4,18	0,06	0,19
	B	76	3400	3,53	3,31	0,32	2,35	4,28	0,68	0,78
	C	76	3000	3,60	3,23	0,30	2,32	4,14	0,24	0,32
Thermot coliform	A	34	3600	3,56	3,29	0,29	2,42	4,15	0,93	0,95
	B	34	3200	3,51	3,32	0,27	2,50	4,13	0,70	0,68
	C	36	3500	3,54	3,24	0,25	2,48	3,99	0,23	0,10
E. coli	A	101	2200	3,51	3,15	0,35	2,11	4,18	0,03	0,12
	B	97	3000	3,48	3,20	0,29	2,33	4,07	0,96	0,89
	C	97	3200	3,51	3,15	0,32	2,20	4,11	0,10	0,10
Mould	A	106	5000	3,70	3,57	0,20	2,98	4,15	0,68	0,43
	B	103	3000	3,48	3,57	0,18	3,04	4,10	-0,52	-0,32
	C	104	5000	3,70	3,56	0,21	2,94	4,18	0,68	0,46
Yeast	A	102	500	2,70	2,53	0,42	1,26	3,80	0,40	0,74
	B	99	500	2,70	2,49	0,44	1,18	3,80	0,41	0,76
	C	100	500	2,70	2,49	0,45	1,14	3,84	0,47	0,91

Как видно на рисунке ниже, здесь использован квадратный корень (SQRT) из числа колоний.

Например: для приписанного значения (assigned value) 4,38

$SQRT(\text{count}) = \sqrt{\text{count}} = 4,39$, следовательно число колоний $4,38^2 = 20$ КОЕ/100мл

Table 1 (continued): Results and z-Scores for Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli*

laboratory number	organism							
	Total Coliforms assigned value: 4.39 SQRT cfu/100ml				<i>Escherichia coli</i> assigned value: 3.81 SQRT cfu/100ml			
	result cfu/100ml	SQRT cfu/100ml	method	z-score	result cfu/100ml	SQRT cfu/100ml	method	z-score
027	21 #	4.58	membrane filtration	0.1	15 #	3.87	membrane filtration	0.0
028	14	3.74	titration	-0.4	6	2.45	titration	-0.9
031	8	2.83	membrane filtration	-1.0	12	3.46	membrane filtration	-0.2
032	42	6.48	MEMF	1.4	26	5.10	MEMF	0.9
033	58	7.62	Membrane Filtration	2.2	42	6.48	Membrane Filtration	1.8
034	detected		GOST 31955- 2012 (ISO 9308-1:2000)		detected		GOST 31955- 2012 (ISO 9308-1:2000)	
035	40	6.32	MEMF	1.3	16	4.00	MEMF	0.1
037	9	3.00	membrane filtration	-0.9	7	2.65	membrane filtration	-0.8

z-scores outside $|z| > 2$ are shown in bold, see Section 5

italics indicate for information only

* samples analysed outside of the required time frame

samples received outside of the required time frame

**Приложение И Пример представления информации о верификации методов
медицинских исследований**

ANALYTE	hCG	Alkaline Phosphatase	Potassium	Albumin
ANALYTICAL GOAL	CV _A <5% at 25 IU/L Clinical requirement	CV _I = 6.4% (Westgard website) Desirable: < 0.5 CV _I = <3.2%	CV _I = 4.8% (Westgard website) Desirable: < 0.5 CV _I = <2.4%	CV _I = 3.1% (Westgard website) Desirable: < 0.5 CV _I = <1.6%
CV_A	5.4% at QC mean 22 U/L	1.45% at QC mean 87 U/L	1.06% at QC mean 4.2 mmol/L	1.75% at QC mean 38.4 g/L
FIT FOR PURPOSE	Borderline acceptable	Acceptable	Acceptable	Borderline unacceptable; assess relative QAP performance
REPORTABLE INTERVALS (Approximately 50% confidence – see Reference 8)	<20 IU/L: 1 U/L 20-100 IU/L: 2 U/L >1000 U/L: 100 U/L	< 300 U/L: 1 U/L > 300 U/L: 5 U/L	<10 mmol/L: 0.1 mmol/L	20-50 g/L: 1 g/L
ESTIMATION OF UNCERTAINTY OF MEASUREMENT FOR CLIENT INFORMATION	± 2 IU/L at 25 U/L ± 10% at >1,000 U/L	± 3 U/L for normal values ± 10 U/L at 500 U/L	± 0.1 mmol/L	± 1.5 g/L

Лист информации о внесенных изменениях в редакции №7

№ п.п., прилож.	Предыдущая редакция	№ п.п., прилож.	Новая редакция
Содержание		Содержание	Добавлено автоматически обновляемое Содержание
П.3		П.3	Дополнен список литературы
Г.III		Г.III	ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДОВ - дополнен
II.I		II.I	МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭКСПЛУАТАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК (ВАЛИДАЦИЯ) – дополнен подраздел 4 Линейность калибровки, подразде 8 Стабильность
VI		VI	Дополнена информация по верификации метода ПЦР в реальном времени
VIII		VIII	ВАЛИДАЦИЯ ОТБОРА ПРОБ - дополнен

	Кыргызский центр аккредитации	Процедура по аккредитации ООС. Руководство по валидации и верификации методов	КЦА-ПА11 ООС
--	--	--	---------------------

Лист ознакомления с изданием №7

Ф.И.О	Дата	Подпись
Бегалиева Г.		
Дайырбек к П.		
Элдосова М.		
Майлыкова Э.		
Асанкулова Н.		
Колбаев А.		
Дюшеналиева Ч.		
Мусаев С.		

Утвержденный вариант (Оригинал) находится в папке «Действующие документы» Сетевого окружения