



Search



Dmytro Yanovych

# Контроль безопасности харчових продуктів

**Валідація методів аналізу**  
(Частина I. Скринінгові методи.)

**Дмитро ЯНОВИЧ**  
yandmyt@gmail.com

12-14.12.2023  
ДНДКІ, Львів

# Визначення

- *Скринінг – тестування чи обстеження великої кількості людей на наявність захворювань, або продуктів на відповідність їх показникам безпеки.*
- *Скринінговим методом називається метод який використовують для скринінгу вмісту субстанцій, або класу субстанцій на рівні інтересу [2].*

# ЗАКОНОДАВСТВО ЄС

*Документи які встановлюють критерії, яким повинні відповідати методи скринінгу для використання в цілях регулювання: вмісту мікотоксинів [1], вмісту залишків ветеринарних препаратів [2]*

- РЕГЛАМЕНТ КОМІСІЇ (ЄС) 519/2014 [1]*
- РЕГЛАМЕНТ КОМІСІЇ (ЄС) 2021/808 [2]*



# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

COMMISSION REGULATION (EU) No 519/2014

of 16 May 2014

amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis

(Text with EEA relevance)



# РЕГЛАМЕНТ КОМІСІЇ (ЄС) 519/2014

- РЕГЛАМЕНТ КОМІСІЇ (ЄС) № 519/2014 від 16 травня 2014 року про внесення змін до Регламенту (ЄС) № 401/2006 щодо методів відбору проб великих партій, спецій та харчових добавок, критеріїв ефективності для Т-2, НТ-2 токсину та цитриніну та **скринінгових методів аналізу** (Текст стосується ЄЕЗ)

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## *АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ*

- Для аналізу мікотоксинів все частіше використовуються методи скринінгу. Доцільно встановити критерії, яким повинні відповідати методи скринінгу для використання в цілях регулювання.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

*Цей документ описує процедури валідації скринінгових методів за допомогою міжлабораторної валідації, перевірки ефективності методу валідованого за допомогою міжлабораторних випробувань, і валідації скринінгового методу в умовах однієї лабораторії.*

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

### 4.3.2.1. Сфера застосування

Сфера застосування стосується біоаналітичних методів, заснованих на імунорозпізнаванні або зв'язуванні з рецепторами (*таких як ELISA, тестові смужки, імуно-хроматографічні тести бічного потоку, імуно-сенсори*), а також фізико-хімічних методів, заснованих на хроматографії або прямому виявленні за допомогою мас-спектрометрії (наприклад, MS із зовнішньою іонізацією). Інші методи (наприклад, тонкошарова хроматографія) не виключаються за умови, що генеровані сигнали стосуються безпосередньо цільових мікотоксинів і дозволяють застосувати описаний нижче принцип.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.2. Термінологія
- Скринінгова цільова концентрація *Screening Target Concentration* (STC): концентрація, що представляє інтерес для виявлення *мікотоксину* в зразку. **Якщо метою є перевірка відповідності регуляторним рівням\*, STC дорівнює затвердженому максимальному рівню.** Для інших цілей або якщо **максимальний рівень** не встановлено, **STC попередньо встановлюється лабораторією.**
- \*- Максимально Допустимий Рівень (МДР), або іншим встановленим законодавством межам

# РЕГЛАМЕНТ 2021/808 [2]

## **АНАЛІЗ ЗАЛИШКІВ**

- **«Цільова концентрація скринінгу» (STC)** означає концентрацію, **нижчу або рівну ССВ**, при якій скринінгове вимірювання класифікує зразок як потенційно невідповідний «позитивний скринінг» і запускає підтверджувальне тестування;
- **Для дозволених фармакологічно-активних речовин ССВ має бути нижчим, ніж МДР або МР**

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.2. Термінологія
- Метод скринінгу: означає метод, що використовується для відокремлення таких зразків, рівні мікотоксинів в яких перевищують *STC*, із заданою вірогідністю. ***Для цілей скринінгу придатні методики які дозволяють визначати вміст мікотоксинів з вірогідністю не меншою 95 %.***
- Результати аналізу зразків, що перевищують граничне значення, повинні бути перевірені шляхом повного повторного аналізу вихідної проби ***підтверджуючим методом.***

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.2. Термінологія
- «Підтверджуючі методи» означають методи, які надають повну або додаткову інформацію, що дозволяє ідентифікувати та однозначно кількісно визначити мікотоксин на рівні інтересу.
- «Негативний зразок» означає, що вміст мікотоксинів у зразку < **STC** з вірогідністю 95 % (тобто існує 5 % ймовірність того, що зразок буде хибно ідентифіковано, як негативні).

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.2. Термінологія
- «Хибно негативний зразок» означає, що вміст мікотоксинів у зразку  $> STC$ , але він був ідентифікований як негативний.
- «Підозрілий зразок» (позитивний скринінг) означає, що зразок перевищує **граничний рівень** (див. нижче) і може містити мікотоксин на рівні, вищому за **STC**. Будь-який **підозрілий результат** ініціює застосування **підтверджуючого аналізу** для однозначної ідентифікації та кількісного визначення мікотоксину.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.2. Термінологія
- «Фальшивий підозрілий зразок» — негативний зразок, який ідентифіковано як *підозрілий*.
- *(Cut-off)Граничне значення: відповідь, сигнал або концентрація, отримані за допомогою методу скринінгу, вище якого зразок класифікується як «підозрюваний». Граничне значення визначається під час валідації та враховує мінливість вимірювання.*

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.2. Термінологія
- Зразок **негативного контролю** (порожня матриця): зразок, про який відомо, що він вільний <sup>(1)</sup> від мікотоксину, який необхідно перевірити, напр. попереднім визначенням з використанням підтверджуючого методу достатньої чутливості. **Якщо порожні зразки не можуть бути отримані, тоді можна використовувати матеріал з найнижчим доступним рівнем, якщо цей рівень дозволяє зробити висновок, що метод скринінгу підходить для мети.**

<sup>(1)</sup> Зразки вважаються вільними від аналіту, якщо кількість, присутня в зразку, не перевищує більше 1/5 STC. Якщо рівень можна кількісно визначити за допомогою підтверджуючого методу, цей рівень необхідно враховувати для оцінки валідації.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.2. Термінологія
- **Позитивний контрольний зразок:** зразок, що містить мікотоксин у цільовій концентрації скринінгу, напр. **сертифікований еталонний матеріал, матеріал відомого змісту (наприклад, тестовий матеріал перевірки кваліфікації)** або іншим чином достатньо охарактеризований підтверджуючим методом.
- **За відсутності будь-якого з перерахованого вище можна використовувати суміш зразків із різними рівнями забруднення або зразок із додаванням, підготовлений у лабораторії та достатньо охарактеризований, за умови, що можна довести, що рівень забруднення було підтверджено.**

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.3. *Процедура валідації.*

Метою валідації є демонстрація **придатності методу скринінгу**. Це робиться шляхом визначення **граничного значення** та **хибно негативних і хибно підозрілих випадків**. У цих параметрах закладено такі характеристики продуктивності, як **чутливість, специфічність і точність**. Методи скринінгу можуть бути валідовані шляхом **міжлабораторної** або **внутрішньо-лабораторної валідації**.

- Якщо дані міжлабораторної валідації вже доступні для певної комбінації мікотоксин/матриця/**STC**, **верифікація методу є достатньою в лабораторії, яка впроваджує метод**.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.3.1. Початкова валідація шляхом ***валідації в умовах однієї лабораторії.***

Мікотоксини: валідація проводиться для кожного окремого мікотоксину в групі. У випадку біоаналітичних методів, які дають комбіновану реакцію на певну групу мікотоксинів (наприклад, афлатоксини B1, B2, G1 і G2; фумонізени B1 і B2), необхідно продемонструвати **застосовність і обмеження в межах застосування методу.**

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.1.1. *Якщо можливо, при самотійній валідації методики силами однієї лабораторії бажано використовувати сертифікований референсний матеріал.*
- 4.3.2.3.1. *Матриці:* початкову валідацію слід проводити для **кожного продукту** або, якщо відомо, що метод застосовний до кількох продуктів, **для кожної групи продуктів**. В останньому випадку з цієї групи вибирається один репрезентативний і відповідний продукт (**див. таблицю А**).

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

Table A

### Commodity groups for the validation of screening methods

Commodity groups	Commodity categories	Typical representative commodities included in the category
High oil content	Tree nuts	Walnut, hazelnut, chestnut
	Oil seeds and products thereof	Oilseed rape, sunflower, cottonseed, soybeans, peanuts, sesame etc.
	Oily fruits and products thereof	Oils and pastes (e.g. peanut butter, tahina)
High starch and/or protein content and low water and fat content	Cereal grain and products thereof	Wheat, rye, barley, maize, rice, oats Wholemeal bread, white bread, crackers, breakfast cereals, pasta
	Dietary products	Dried powders for the preparation of food for infants and small children

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.3.2. Початкова валідація шляхом спільних випробувань. Валідація шляхом спільних випробувань повинна проводитися відповідно до міжнародно-визнаного протоколу спільних випробувань (наприклад, ISO 5725:1994 або Міжнародного гармонізованого протоколу IUPAC), який **вимагає включення дійсних даних щонайменше з восьми різних лабораторій**. Відмінність від валідації в одній лабораторії в тому, що  $\geq 20$  зразків на продукт/рівень може бути розподілена між лабораторіями-учасниками.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.3.1. **Кількість зразків:** мінімальна кількість зразків, для валідації - 20 гомогенних зразків негативного контролю і 20 гомогенних зразків позитивного контролю, з вмістом мікотоксину на рівні **STC**, проаналізованих в умовах проміжної точності ( $RSD_{Ri}$ ) протягом 5 різних днів. За бажанням додаткові серії з 20 зразків, що містять мікотоксин на інших рівнях, можна додати до плану перевірки, щоб отримати уявлення про те, наскільки метод може розрізняти різні концентрації мікотоксинів.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- **Концентрація:** Для кожної STC, яка буде використовуватися в рутинному застосуванні, необхідно виконати перевірку.
  - (1) Зразки вважаються вільними від аналізу, якщо кількість, присутня в зразку, не перевищує більше 1/5 STC. Якщо рівень можна кількісно визначити за допомогою підтверджуючого методу, цей рівень необхідно враховувати для оцінки валідації.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## *АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ*

- 4.3.2.5. Розширення області застосування методу
- 4.3.2.5.1. Розширення сфери застосування на інші мікотоксини: коли нові мікотоксини додаються до сфери застосування існуючого методу скринінгу, необхідна повна перевірка, щоб продемонструвати придатність методу.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.5.2. Поширення на інші товари: якщо очікується що метод скринінгу буде застосовний до інших товарів, його придатність для інших товарів має бути перевірена. Якщо новий товар належить до товарної групи (див. таблицю А), для якої вже було виконано первинну перевірку, достатньо обмеженої додаткової перевірки. *Для цього мінімум 10 зразків гомогенного негативного контролю та 10 зразків гомогенного позитивного контролю (при STC) повинні бути проаналізовані в умовах проміжної точності. Усі зразки позитивного контролю повинні бути вище граничного значення. Якщо цей критерій не виконується, необхідна повна перевірка.*

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.4. Визначення **граничного значення** та частоти хибних підозрілих результатів від порожніх зразків. (Відносні) відповіді для зразків негативного та позитивного контролю беруться як основа для розрахунку необхідних параметрів.

Для методів скринінгу з відповіддю, **пропорційною** концентрації мікотоксину, застосовується наступне:

- **Граничне значення** =  $R_{STC} - t\text{-значення } 0,05 * SD_{STC}$
- $R_{STC}$  = середня відповідь зразків позитивного контролю (при STC )
- t-value: *однобічне t-значення для частоти хибнонегативних результатів 5 % (див. таблицю B)*
- $SD_{STC}$  = стандартне відхилення.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

Table B

One tailed t-value for a false negative rate of 5 %

Degrees of Freedom	Number of replicates	t-value (5 %)
19	20	1,729
20	21	1,725
21	22	1,721
22	23	1,717

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- Аналогічно, для методів скринінгу з відповіддю, **обернено пропорційною** до концентрації мікотоксину, граничне значення визначається як:
- **Граничне значення** =  $R_{STC} + t\text{-value}_{0,05} * SD_{STC}$
- Використовуючи це конкретне t-значення для встановлення **граничного значення, кількість хибно негативних результатів встановлена за замовчуванням на 5 %.**

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- 4.3.2.6. **Верифікація методів, раніш валідованих шляхом спільних випробувань.** Для методів скринінгу, які вже були успішно валідовані шляхом спільного лабораторного випробування, ефективність методу повинна бути перевірена. Для цього необхідно проаналізувати щонайменше **6 зразків негативного контролю та 6 зразків позитивного контролю (при STC)**. Усі зразки позитивного контролю повинні бути вище *граничного значення*. Якщо цей критерій не відповідає, лабораторія повинна провести аналіз першопричини, щоб визначити, чому вона не відповідає специфікаціям, отриманим під час спільного випробування.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## *АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ*

- Тільки після вжиття коригувальних дій потрібно повторно перевірити ефективність методу у своїй лабораторії. У випадку, якщо лабораторія не в змозі перевірити результати спільного випробування, їй потрібно буде встановити власне *граничне значення* в повній перевірці у одній лабораторній.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- **4.3.2.7. Безперервна перевірка методу/поточна перевірка методу.** Після первинної перевірки додаткові дані перевірки отримують шляхом включення принаймні двох зразків позитивного контролю в кожну партію зразків які будуть перевірятись. Один позитивний контрольний зразок — це відомий зразок (наприклад, той, що використовувався під час початкової валідації), інший — це товар із тієї самої товарної групи (якщо аналізується лише один товар, замість нього використовується інший зразок цього товару). Включення *зразка негативного контролю* є не обов'язковим. Результати, отримані для двох зразків позитивного контролю, додаються до існуючих даних для внутрішньо-лабораторного контролю .

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- *Оцінка придатності для мети.*

Результати *негативних контрольних зразків* використовуються для оцінки відповідного рівня *хибних підозрілих результатів*. Значення *t* розраховується відповідно для випадку, коли результат *негативного контрольного зразка* перевищує *граничне значення*, тому помилково класифікується як *підозрілий*.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- Оцінка придатності для мети.
- $t\text{-value} = (\text{граничне значення} - \text{mean}_{blank}) / \text{SD}_{blank}$   
для методів скринінгу з відповіддю, **пропорційною концентрації мікотоксину,**  
або
- $t\text{-value} = (\text{mean}_{blank} - \text{граничне значення}) / \text{SD}_{blank}$   
для методів скринінгу з відповіддю, **обернено пропорційною концентрації мікотоксину.**

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

- З отриманого  $t$ -значення, заснованого на ступенях свободи, розрахованих на основі кількості експериментів, **ймовірність хибно-підозрілих зразків** для одностороннього розподілу може бути розрахована (наприклад, функція розширеної таблиці «T.DIST») або взята з таблиці  $t$ -розподілу. Відповідне значення одностороннього  $t$ -розподілу визначає частоту помилкових підозрілих результатів.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

Принаймні один раз на рік **граничне значення** встановлюється заново та валідність методу повторно оцінюється. **Безперервна перевірка методу** служить для кількох цілей:

- контроль якості для партій перевірених зразків;
- надання інформації про стійкість методу в умовах лабораторії, яка його застосовує;
- обґрунтування застосовності методу до різних товарів;
- надання можливості коригувати **граничне значення** у разі поступового дрейфу значень з плином часу.

# РЕГЛАМЕНТ 519/2014

## Критерії ефективності для афлатоксину

(a) Performance criteria for aflatoxins

Criterion	Concentration Range	Recommended Value	Maximum permitted Value
Recovery-Aflatoxins B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	< 1,0 mg/kg	50 to 120 %	
	1-10 mg/kg	70 to 110 %	
	> 10 mg/kg	80 to 110 %	
Reproducibility RSD <sub>R</sub>	All	As derived from Horwitz Equation (*)(**)	2 × value derived from Horwitz Equation (*)(**)

Repeatability RSD<sub>r</sub> may be calculated as 0,66 times Reproducibility RSD<sub>R</sub> at the concentration of interest.

(\*) Рівняння Горвіца для концентрацій  $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$ :

$$RSD_R = 2(1 - 0,5 \log C)$$

(посилання: W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, J.Assoc.Off.Analy.Chem.,1980, 63, 1344)

(\*\*) Модифіковане рівняння Горвіца (\*) для концентрацій  $C < 1,2 \times 10^{-7}$ :

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

*Приклади валідації* методики скринінгового аналізу мікотоксинів показано із застосуванням набору **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 (Art. No. R1211)** для конкурентного імуноферментного аналізу афлатоксину В1 у зернових культурах і кормах.

Тест-набору достатньо для 96 визначень. Набір складається із необхідних для аналізу реагентів, із стандартами включно.



# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

- При виконанні початкової валідації ***в умовах однієї лабораторії*** згідно рекомендацій (п. 4.3.2.3.1.) валідація для визначення афлатоксинів має враховувати присутність в зразках кожного окремого представника з групи. Оскільки вибраний нами метод дає комбіновану реакцію для різних представників групи афлатоксинів B1, B2, G1 і G2; необхідно продемонструвати **застосовність і обмеження в межах застосування методу.**

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

- Інформація про специфічність антитіл які застосовано в наборі надається виробником набору

- **Специфічність:**

Aflatoxin B1 .....	100 %
Aflatoxin B2 .....	approx. 13 %
Aflatoxin G1 .....	approx. 29 %
Aflatoxin G2 .....	approx. 3.2 %

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

- Оскільки п.4.3.2.3.1. передбачено можливість одночасної валідації для різних представників групи продуктів, зокрема: пшениці, жита, ячменю, кукурудзи, рису, овса (див. таблицю А), є можливість вибору як, одного репрезентативного представника, так і можливості одночасної перевірки впливу кількох зазначених матриць.

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

Виробником було визначено перехресну специфічність тесту Aflatoxin B1 30/15, і його реактивність до афлатоксинів у **буферній системі** і наголошено, що специфічність в реальних зразках може відрізнятися через матричні ефекти, тому, для реальних зразків необхідно визначити межу виявлення та витягу для цільового аналізу у відповідній матриці зразка, що узгоджується з рекомендацією п.4.3.1.1.

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

- ***п.4.3.1.1. Якщо можливо, при самотійній валідації методики силами однієї лабораторії бажано використовувати сертифікований референсний матеріал.***
- ***Враховуючи рекомендації, валідацію проводять на референсних зразках кукурудзи, як **негативного**, так і **позитивного** контролю, які нативно контаміновані афлатоксинами, і тестовано фірмою TRILOGY (межа кількісного визначення 1,0 мкг/кг) :***
- ***негативний контроль 12280(MMND);***
- ***позитивний контроль 121233(MM8A);***

# ΙΦΑ (ELISA) ΑΝΑΛΙΖ ΜΙΚΟΤΟΚΣΙΝΙΒ

## Quality Control Materials:

Batch Code 12280(MMND);

Aflatoxin	LOQ (ppb)	Mean(ppb)
-----------	-----------	-----------

B1	1,0	ND
----	-----	----

B2	1,0	ND
----	-----	----

G1	1,0	ND
----	-----	----

G2	1,0	ND
----	-----	----

Batch Code 121233(MM8A).

B1	1,0	28,3
----	-----	------

B2	1,0	1,6
----	-----	-----

G1	1,0	ND
----	-----	----

G2	1,0	ND
----	-----	----



# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

***Межа детектування, яка вказується виробниками тест наборів, зазвичай є найменшим значенням концентрації зразків, які входять до складу набору, і використовуються для побудови калібрувального графіка***

- Межа детектування:
- Зерно .....1 мг/кг (ppb)
- Відсоток витягу: приблизно 93% (відповідає витягу з референсних зразків нативно забрудненої кукурудзи)

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

***Межа детектування, яка вказується виробниками тест наборів, зазвичай є найменшим значенням концентрації зразків, які входять до складу набору, і використовуються для побудови калібрувального графіка.***

- Межа детектування:
- Зерно .....1 мг/кг (ppb)
- Відсоток витягу: приблизно 93% (відповідає витягу з референсних зразків природно забрудненої кукурудзи)



# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- Спрощені підходи, які не описані Регламенті 519/2014, описують **межу виявлення (детектування) (LOD)**, як найнижчу концентрацію аналіту, яку можна визначити і чітко відрізнити від значень порожніх зразків. **LOD** визначається експериментально шляхом вимірювання концентрації не менше ніж **20 негативних зразків (blanc)** матриці, і розраховується за формулою:

$$\mathbf{LOD} = R_{blanc} + 3 \times SD_{blanc}$$

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- ***Межа кількісного визначення (LOQ)*** є найнижчою концентрація аналіту, яка може бути виявлено кількісно з допустимою похибкою. Визначається LOQ експериментально шляхом вимірювання концентрації щонайменше 20 порожніх зразків матриці, а потім розраховується за формулою:

$$**LOQ** = R_{blanc} + 9 \times SD_{blanc}$$

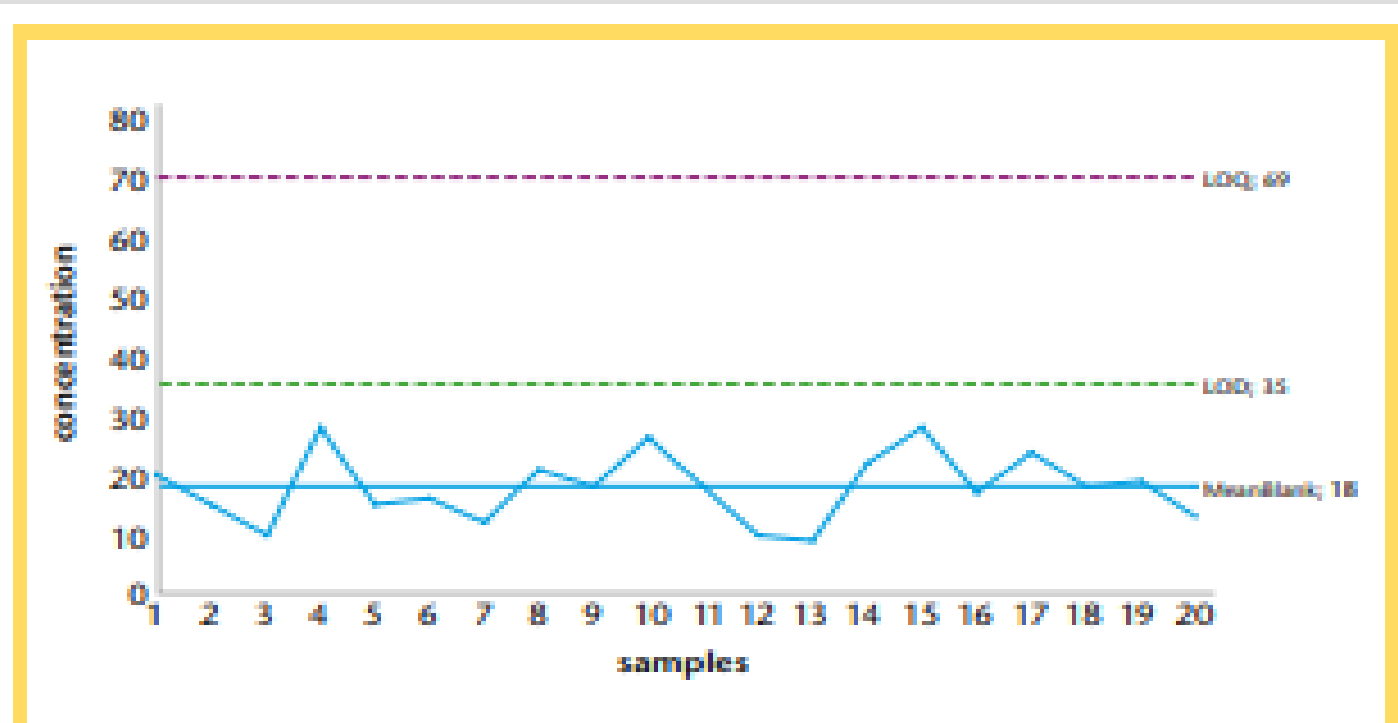
# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- Одержані значення меж ***виявлення*** та ***визначення*** потрібні для попередньої оцінки придатності методики при складанні плану валідації методики для досягнення ***регуляторного рівня*** . Результати нижче LOD вказують на наявність негативного зразка або, на те, що концентрація аналіту(ів) нижче LOD. Результати, які вище LOD і нижче LOQ – це лише якісні негативні/позитивні) результати. Це означає, що зразок містить аналіт, точну кількість якого неможливо визначити кількісно, оскільки одержане значення нижче LOQ (Рис.1)

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15



**Figure 31:** 20 blank samples were analyzed. Mean of blank samples = 18 ng/kg with a standard deviation of 5,7 ng/kg  
 $LOD = 18 \text{ ng/kg} + 3 \times 5,7 \text{ ng/kg} = 35 \text{ ng/kg}$   
 $LOQ = 18 \text{ ng/kg} + 9 \times 5,7 \text{ ng/kg} = 69 \text{ ng/kg}$

(Рис.1)

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- Згідно п.4.3.2.3.1. мінімальна кількість зразків, для валідації - 20 гомогенних негативних контрольних зразків і 20 гомогенних позитивних контрольних зразків, з вмістом мікотоксину на рівні **STC**, проаналізованих в умовах **проміжної точності\*** ( $RSD_{Ri}$ ) протягом 5 різних днів.

\*-«внутрішньолабораторна відтворюваність» або «**проміжна точність/власна відтворюваність**» означає точність вимірювання за сукупності внутрішньолабораторних умов у конкретній лабораторії.[2]

-**Проміжна точність** виражає варіації всередині лабораторії: різні дні, різні аналітики, різне обладнання тощо. Точність аналітичної процедури зазвичай виражається дисперсією, стандартним відхиленням або коефіцієнтом варіації серії вимірювань.

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

**Вибір Цільової концентрація скринінгу (STC)  
для валідації**

**Якщо метою є перевірка відповідності регуляторним рівням, STC дорівнює затвердженому максимальному рівню\*.**

**\*- Максимальний рівень 2 мкг/кг для афлатоксину B1 та 4 мкг/кг загального вмісту афлатоксинів у всіх зернових та продуктах, отриманих з зернових культур за винятком кукурудзи, яка підлягає сортуванню (COMMISSION REGULATION (EU) No 165/2010 of 26 February 2010)**

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- **STC** для цілей валідації дорівнює затвердженому максимальному рівню –2 мкг/кг (ppb) .
- Оскільки максимальний рівень нижче значень наведених в таблиці, (див. слайд 36), для **STC** можуть бути прийнятними найширші межі відхилень витягу - 50% до 120%. **Відтворюваність  $RSD_r$  може бути розрахована як 0,66 відтворюваності  $RSD_R$  (\*)** вибраної концентрації і не перебільшувати 22% (\*\*).

(\*) Рівняння Горовіца для концентрацій  $1,2 \times 10^{-7} \leq C \leq 0,138$ :

$$RSD_R = 2(1 - 0,5 \log C)$$

(\*\*) Модифіковане рівняння Горовіца (\*) для концентрацій  $C < 1,2 \times 10^{-7}$ :

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- З урахуванням інформації викладеної в попередніх слайдах можна скласти план валідації, результати якої дозволять провести оцінку придатності вибраної методики для мети скринінгу.
- Валідація виконується на 20 гомогенних **негативних контрольних зразках кукурудзи 12280(MMND)** і 20 гомогенних **позитивних контрольних зразках, референсного матеріалу кукурудзи 121233(MM8A)** з вмістом мікотоксину на рівні **STC**.

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- ***Примітка:*** — Значення, які застосовуються як до B1, так і до суми B1 + B2 + G1 + G2 — Якщо потрібно повідомляти про суму окремих афлатоксинів B1 + B2 + G1 + G2, тоді реакція кожного афлатоксину на аналітичну систему повинна бути відомою, з урахуванням еквіваленту.

# IΦΑ (ELISA) ΑΝΑΛΙΖ ΜΙΚΟΤΟΚΣΙΝΙΒ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

Quality Control Material  
Certificate of Analysis



Product Code TOC MME11-100  
 Batch Code 121233(MM8A)  
 Product description Multitoxin Quality Control Material in Corn  
 Certification date March 2021  
 Expiration date March 2026  
 Quantity 100g  
 Storage ≤ 8° C

Compound	Limit of Quantification	Mean (ppb)	Mean (SI Units)
Aflatoxin B1	1.0 ppb	28.3	(µg/kg)
Aflatoxin B2	1.0 ppb	1.6	(µg/kg)
Aflatoxin G1	1.0 ppb	ND	(µg/kg)
Aflatoxin G2	1.0 ppb	ND	(µg/kg)
Total Aflatoxins		29.9	
Std dev		4.1	
%CV or %RSD		13.6	

### Standard deviation ranges

1sd range 25.8 ppb to 34.0 ppb  
 2sd range 21.7 ppb to 38.1 ppb  
 3sd range 17.6 ppb to 42.2 ppb

Uncertainty k=2 9.3 ppb

Uncertainty range 20.6 ppb to 39.2 ppb

Method reference – LC-MS/MS Internal SOP 14-168 Matrix Matched Standards.

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- ***Оскільки з комерційно доступних референсних нативно контамінованих гомогенних зразків позитивного контролю не завжди можливо вибрати концентрацію, яка відповідає цілям валідації, допускається, як зазначено в п. 4.3.2.2, приготування її шляхом змішування наважки контамінованих зразків з чистими зразками, які не містить афлатоксинів:***

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

### **Розрахунок :**

- Згідно із сертифікатом, **позитивний референсний матеріал 121233(ММ8А)** містить окрім афлатоксину В1, також афлатоксин В2 в кількості 1,6 мкг/кг (ppb), до якого антитіла ІФА-набору мають специфічність 13%. Розрахунок поправки ІФА аналізу з урахуванням специфічності:

$$28,3+(13 \times 1,6/100) = 28,5 \text{ ppb}$$

маса **референс матеріалу** в аналітичній наважці (5 г)

$$(2 / 28,5) \times 5 = 0,35 \text{ г}$$

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- У 20 конічних поліпропіленових пробірок для центрифугування об'ємом 50 мл, потрібно зважити по 4,65 г. **негативних контрольних зразках кукурудзи 12280(ММND)**.
- До кожної пробірки додають по 0,35 г **контрольного зразка, референсного матеріалу кукурудзи 121233(ММ8А)**.
- Прогнозована концентрація суміші референсних матеріалів кукурудзи є близькою до 2 мкг/кг (ppb) афлатоксину В1, в межах похибки, зазначених в сертифікаті до зразка **121233(ММ8А)**.

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- **Розрахунок :**

- $(28,5 \times 0,35) : (4,65 + 0,35) = 1,995 \text{ мкг/кг(ppb)}$

**0,35 г** контрольного референсного матеріалу в загальній масі суміші зразків кукурудзи матиме концентрацію близьку до 2 мкг/кг , з врахуванням похибки середнього значення (13,6%) та специфічності антитіл набору до афлатоксинів В1 та В2. Прогнозоване відхилення значення афлатоксину В1 має бути в межах від 1,93 мг/кг до 2,26 мкг/кг.

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- **Окремо у конічні поліпропіленові пробірки для центрифугування, об'ємом 50 мл, готують 20 наважок по 5,0 г. *негативних контрольних зразків кукурудзи 12280(MMND),.***
- **Якщо числові значення концентрації негативних зразків, менші значень *Нижчого Рівня Калібрування (НРК) Lowest calibration level (LCL)* і одержані інтерполяцією даних в діапазоні між нулем та НРК, вони можуть слугувати межкою *технічного порогу або LOD.***

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- При повній валідації методики з розрахунком повторюваності та відтворюваності (п.4.3.2.3.1.) серії з 20 *негативних зразків* і 20 *позитивних зразків* на рівні ***STC***, розбивають на 5 етапів які виконуються *протягом різних днів* для одержання ***проміжної точності*** ( $RSD_{Ri}$ ). Відтворюваність  $RSD_r$  може бути розрахована як 0,66 відтворюваності  $RSD_R$

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- На першому етапі валідації одержують дані внутрілабораторної повторюваності при проведенні аналізу чотирьох негативних гомогенних контрольних зразків кукурудзи та чотирьох позитивних зразків референсного матеріалу кукурудзи на рівні STC. Паралельний аналіз проводиться протягом одного дня трьома операторами.***

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## *RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15*

- Для одержання числових значень вмісту Афлатоксину В1 у зразках, обрахованих за калібрувальним графіком для методу ІФА/ELISA використовують програмні продукти які пропонують фірми-виробники комерційних ІФА наборів. В нашому випадку було застосовано ПЗ Ridasoft Win.NET Version 1.91 від фірми R-biofarm, виробника набору *RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15*.
- Подальша статистична обробка даних валідації проводилась засобами ПЗ Microsoft Office Excel

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- Значення повторюваності для вибраного значення STC (4,668%), за обрахунком даних аналізу чотирьох позитивних контрольних зразків кукурудзи одержаних одним виконавцем в одній лабораторії, протягом трьох днів, представлені в таблиці 2 і відповідають критеріям ефективності методики. Вони близькі до значення одержаного як 0,66 відтворюваності  $RSD_R$ .**

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

Внутрішньолабораторна відтворюваність AFLB1					Дата	
Референс ррв					12.12.2023	
Оператор 1		Оператор 2		Оператор 3		
No	Конс	No	Конс	No	Конс	
1	1,950	1	2,120	1	2,080	
2	2,070	2	2,100	2	2,140	
3	2,160	3	2,060	3	1,910	
4	1,830	4	2,000	4	2,110	
M	2,003	M	2,070	M	2,060	
SD	0,144	SD	0,053	SD	0,103	
RSD	7,172	RSD	2,556	RSD	4,998	
Витяг %	100,13	Витяг %	103,50	Витяг %	103,00	
M					2,044	
SD					0,101	
RSD					4,951	

Таблиця 1

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

Повторюваність ELISA аналізів AFLB1						Оператор 1	
Референс ррб						2,0	
Дата		12.12.2023	Дата		13.12.2023	Дата	14.12.2023
No	Конс		No	Конс	No	Конс	
1	1,950		1	2,060	1	2,040	
2	2,070		2	2,100	2	2,200	
3	2,160		3	2,080	3	2,060	
4	1,830		4	2,120	4	2,030	
M	2,003		M	2,090	M	2,083	
SD	0,144		SD	0,026	SD	0,079	
RSD	7,172		RSD	1,235	RSD	3,809	
Витяг %	100,13		Витяг %	104,50	Витяг %	104,13	
M						2,058	
SD						0,096	
RSD					3,268	4,668	

Таблиця 2

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- *Значення внутрішньо лабораторної відтворюваності для вибраного значення **STC** (4,951%) представлені на таблиці 1 відповідають критеріям ефективності методики для визначення афлатоксину B1 і не перевищують рекомендованого значення. Витяг афлатоксину B1 дещо більший за 100% внаслідок впливу матриці зразка, але не виходить за межі рекомендованого діапазону (від 50% до 120%).*
- *Відтворюваність **RSD<sub>r</sub>** розрахована як **0,66** відтворюваності **RSD<sub>R</sub>** ( $4,951 \times 0,66 = 3,268\%$ )*

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- *В подальшому, одержані протягом першого етапу результати **20 негативних зразків** і **20 позитивних зразків** на рівні **STC** використовують для встановлення граничного значення:*

$$\text{Граничне значення} = R_{STC} - t\text{-value}_{0,05} * SD_{STC}$$

- *В таблиці 3 представлено середні значення даних **20 негативних зразків** і **20 позитивних зразків** на рівні **STC**, їх абсолютні (**SD**), та відносні стандартні відхилення (**RSD**) та **Граничне значення (Cut-off)** розраховане за формулою*

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

n-20	t-value	1,725
Зразки	Негативні (ppb)	Позитивні (ppb)
1	0,353	1,950
2	0,215	2,070
3	0,215	2,160
4	0,213	1,830
5	0,269	2,120
6	0,188	2,100
7	0,204	2,060
8	0,169	2,000
9	0,163	2,080
10	0,229	2,140
11	0,221	1,910
12	0,195	2,110
13	0,181	2,060
14	0,252	2,100
15	0,206	2,080
16	0,152	2,120
17	0,155	2,040
18	0,179	2,200
19	0,190	2,060
20	0,243	2,030
<b>R</b>	<b>0,210</b>	<b>2,061</b>
<b>SD</b>	<b>0,046</b>	<b>0,087</b>
<b>R+1,725*SD</b>	<b>0,289</b>	<b>1,912</b>
<b>RSD (CV%)</b>	<b>22,044</b>	<b>4,197</b>
<b>Витяг %</b>		<b>103,05</b>

Таблиця 3

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

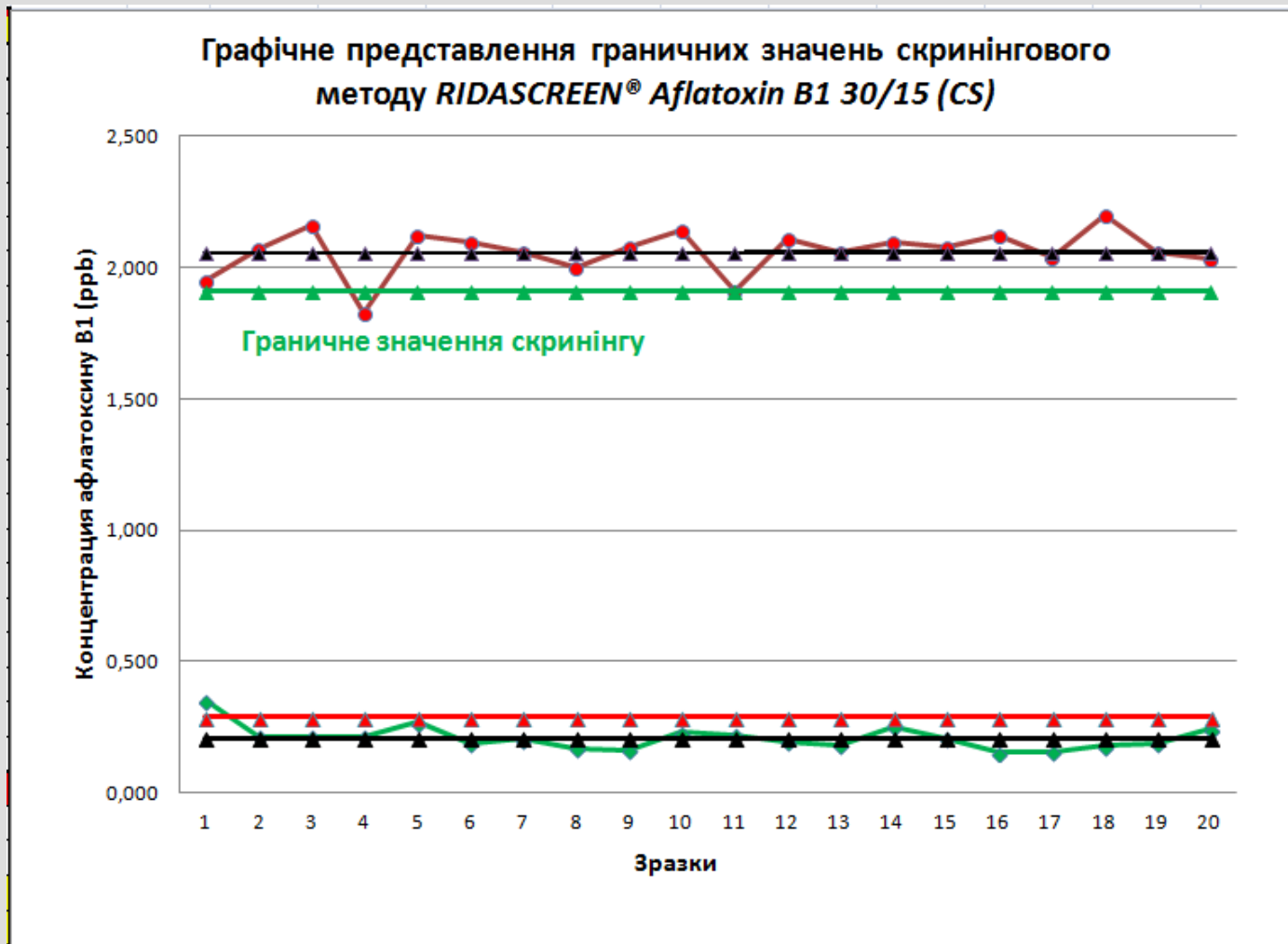


Рисунок 2

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- На рисунку 2 зображено графічне представлення **Граничного значення (1,912 ppb)** розраховане за формулою:

$$\text{Граничне значення} = R_{STC} - t\text{-value}_{0,05} * SD_{STC}$$

- Концентрація **контрольних негативних зразків**, які не перевищують значень *Std1*, одержана методом інтерполяції, дає приблизні значення, за умов застосування калібрувального графіку, побудованого за алгоритмом **Cubic Spline (CS)** рис.3-5.

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

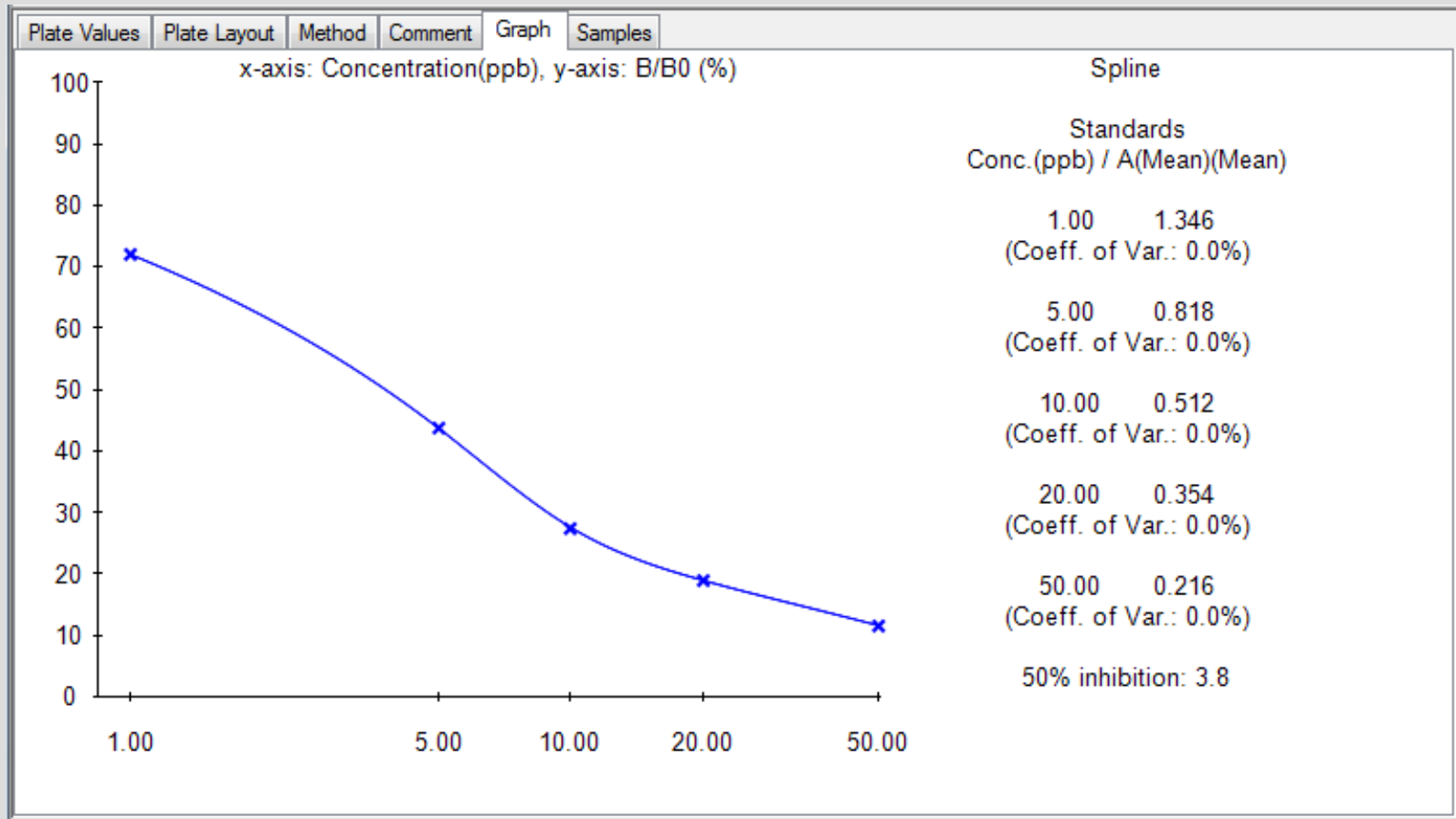


Рисунок 3

# IΦA (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

Plate Values		Plate Layout		Method		Comment		Graph		Samples		Standards	
Ser. No.	Concentration ppb	Absorbance (Mean)	(CV)	B/B0 (%)	calculated ppb	Deviation (%)							
1	0.00	1.824	0.0	100.0									
2	1.00	1.367	0.0	74.9	1.00	0.0							
3	5.00	0.814	0.0	44.6	4.99	0.2							
4	10.00	0.507	0.0	27.8	10.06	0.6							
5	20.00	0.354	0.0	19.4	19.90	0.5							
6	50.00	0.202	0.0	11.1	49.97	0.1							
												Samples	
Ser. No.	ID	Absorbance (Mean)	(CV)	(%)	calculated ppb	*	=	ppb					
1	blank	1.552	0.0	85.1	< 1.00	1.00		< 1.00					
2	blank	1.633	0.0	89.5	< 1.00	1.00		< 1.00					
3	blank	1.542	0.0	84.5	< 1.00	1.00		< 1.00					
4	blank	1.544	0.0	84.6	< 1.00	1.00		< 1.00					

Рисунок 4

# IΦA (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

The screenshot shows the software interface with a menu open over the 'Results' tab. The menu options are: Default, Linear Regression, Logit/Log, Cubic Spline, 4-Parameter, and Calculate samples out of range (which is checked and highlighted with a red box). Below the menu is a table of standards and a table of samples.

Standards				B/B0 (%)	calculated ppb	Deviation (%)
Ser. No.						
1	0.00	1.824	0.0	100.0		
2	1.00	1.367	0.0	74.9	1.00	0.0
3	5.00	0.814	0.0	44.6	4.99	0.2
4	10.00	0.507	0.0	27.8	10.06	0.6
5	20.00	0.354	0.0	19.4	19.90	0.5
6	50.00	0.202	0.0	11.1	49.97	0.1

Samples							
Ser. No.	ID	Absorbance (Mean) (CV) (%)		calculated ppb	*	=	ppb
1	blank	1.552	0.0	85.1	0.425 *	1.00	0.425 *
2	blank	1.633	0.0	89.5	0.259 *	1.00	0.259 *
3	blank	1.542	0.0	84.5	0.449 *	1.00	0.449 *
4	blank	1.544	0.0	84.6	0.444 *	1.00	0.444 *

Рисунок 5

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

- Виділені червоним значення менші за Std 1 (1ppb) – НРК (рис. 4)
- Інтерпольовані значення представлено на Рис. 5. Такий підхід одержання числових значень потрібний при розрахунку значень LOD та LOQ згідно з підходами, які були описані вище:

$$LOD = R_{blanc} + 3 \times SD_{blanc} = 0,21 + 3 \times 0,046 = 0,348$$

$$LOQ = R_{blanc} + 9 \times SD_{blanc} = 0,21 + 9 \times 0,046 = 0,626$$

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- Теоретично розраховані значення **LOD** та **LOQ** кращі за **межі виявлення і кількісного визначення**, декларовані виробником, що підтверджує здатність набору забезпечувати стійкість при роботі із зразками які мають значний матричний вплив.
- Аналізі даних **20 позитивних зразків**, показує наявність тільки одного значення (5%), нижчого за межі розрахованого **граничного значення**, що підтверджує можливість одержання результатів з вірогідністю 95% .

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- Як наголошувалось раніше метод інтерполяції за алгоритмом **Cubic Spline (CS)** дає приблизні значення в діапазоні нижчому за НРК (LCL), тому з метою одержання більш точних числових значень для **контрольних негативних зразків** можливе застосування регресійної моделі **кривої чотирьох параметрів (4P)**, яка часто використовується в методі ELISA. Сигмоподібна крива особливо часто більш придатна, оскільки лінійність спостерігається тільки в певному діапазоні величин концентрації.

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

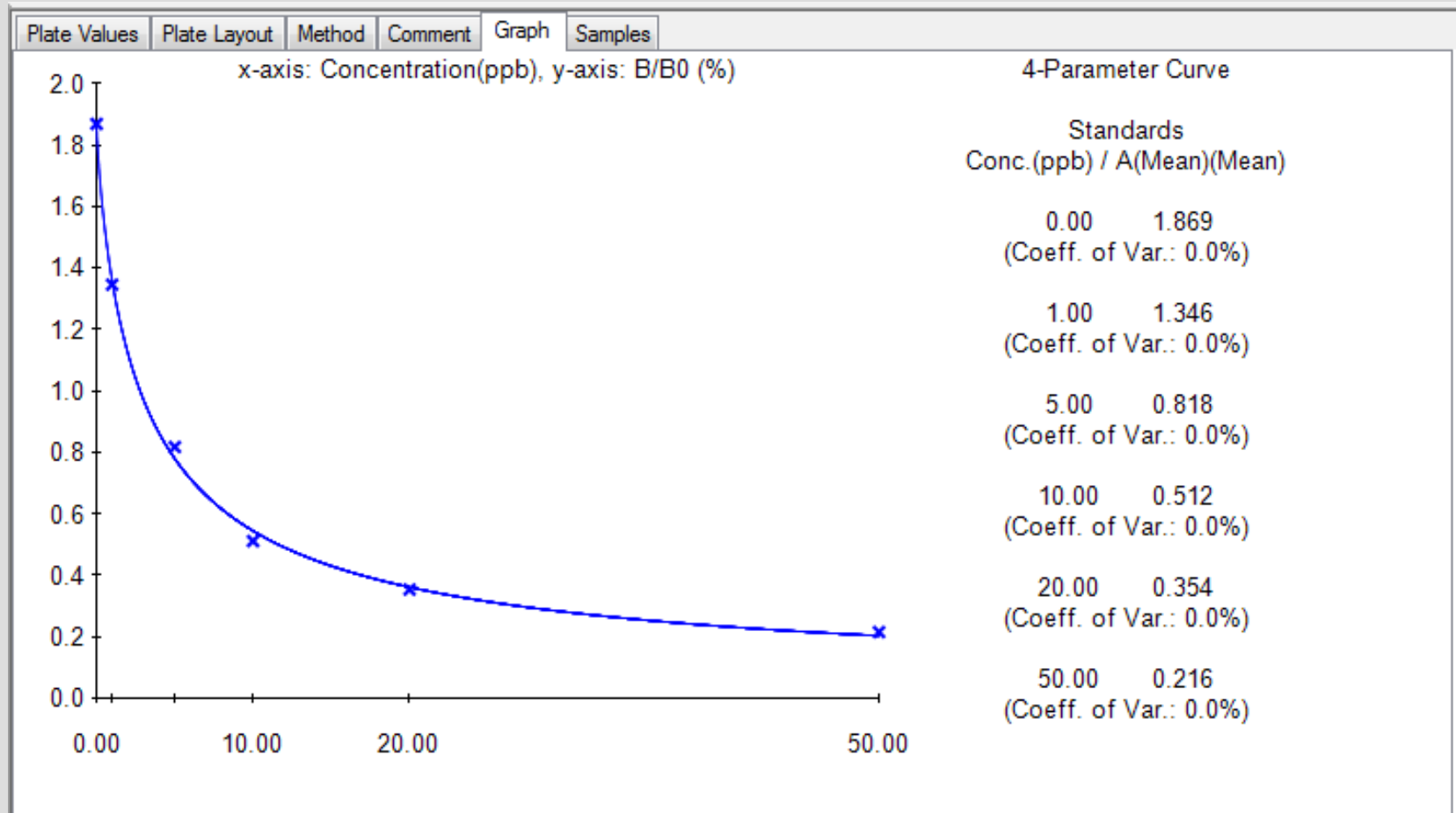


Рисунок 6

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

4P		1,725
No	Conc	Conc
1	0,461	1,780
2	0,307	1,870
3	0,307	1,940
4	0,305	1,680
5	0,370	1,910
6	0,275	1,900
7	0,295	1,860
8	0,251	1,810
9	0,242	1,880
10	0,324	1,930
11	0,315	1,740
12	0,284	1,900
13	0,266	1,860
14	0,351	1,890
15	0,296	1,880
16	0,229	1,910
17	0,232	1,850
18	0,263	1,970
19	0,277	1,870
20	0,341	1,840
<b>M</b>	<b>0,300</b>	<b>1,864</b>
<b>SD</b>	<b>0,054</b>	<b>0,069</b>
<b>M-SD*1,725</b>	<b>0,393</b>	<b>1,745</b>
<b>RSD</b>	<b>131,104</b>	<b>3,682</b>
<b>Recovery %</b>	<b>93,175</b>	

Таблиця 4

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- *Як видно на рисунку 6 регресійна модель кривої чотирьох параметрів (4P) дає графічне представлення лінійності в діапазоні нижчому за НРК, а представлені у таблиці 3 числові значення концентрацій дещо відрізняються від даних розрахунку за регресійною моделлю **Cubic Spline (CS)** (табл.3).*
- *Графічне представлення показує перевагу застосування **кривої чотирьох параметрів (4P)** для методик в яких очікується суттєвий вплив варіабельності матриці на результати аналізу.*

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

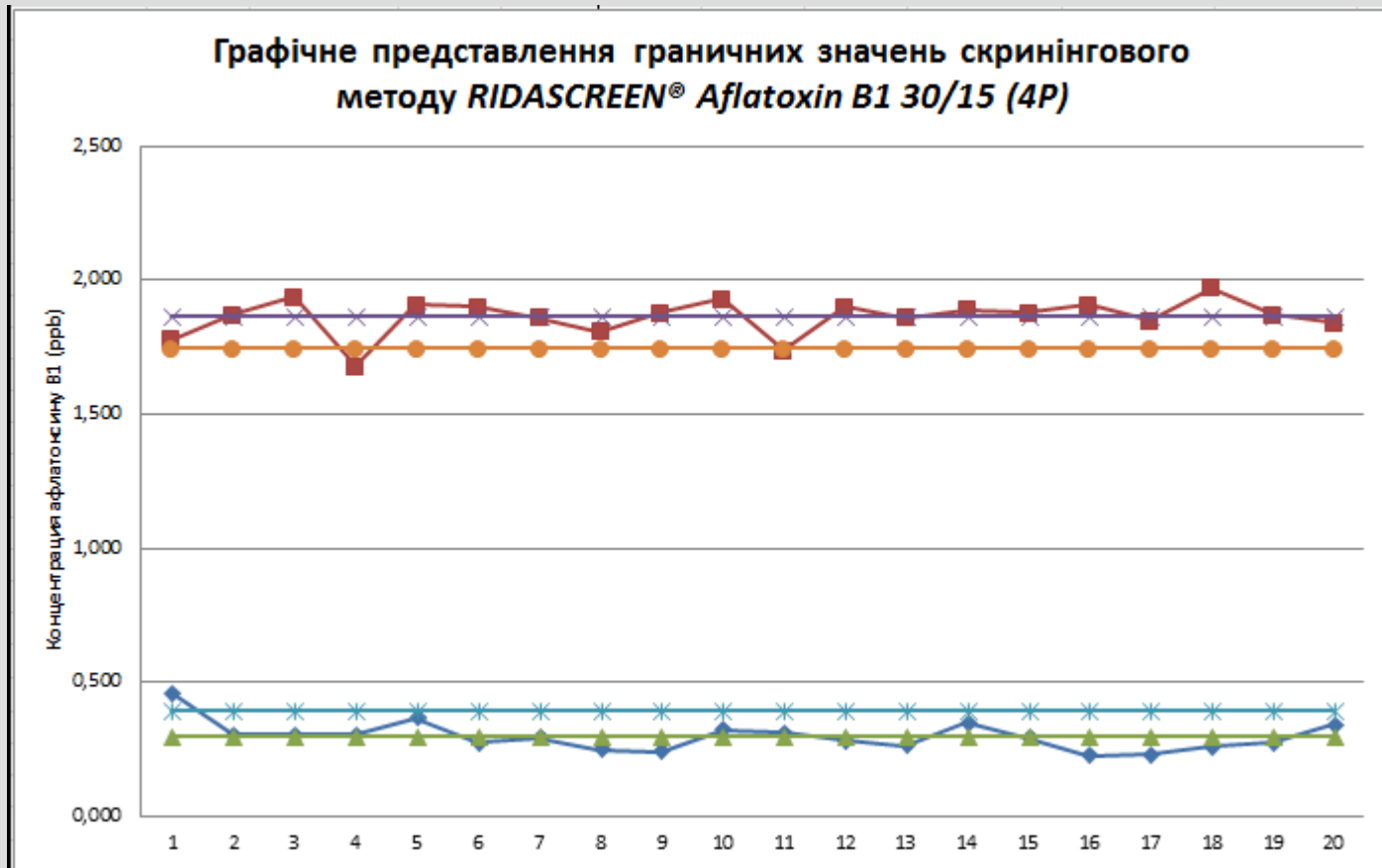


Рисунок 6

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- *Кожна із 4 регресійних моделей побудови кривої калібрувальній графіків, які реалізовані в програмному забезпеченні для обрахунку даних ІФА аналізу, має свою перевагу в залежності від вибраного комерційного набору і може бути застосована з урахуванням специфічності завдань. За відсутності власного досвіду варто використовувати підходи рекомендовані виробниками наборів.*

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- ***Наведений приклад валідації*** методики скринінгового аналізу Афлатоксину В1 із застосуванням набору ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 (Art. No. R1211)*** для аналізу кукурудзи дає підставу зробити висновок про придатність набору для цілей скринінгу вмісту афлатоксину В1 у вибраній матриці на рівні встановлених значень МДР з ***вірогідністю 95%*** .

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

- *Значення внутрішньої лабораторної відтворюваності для вибраного значення **STC** становить **4,951%**, що не перевищує рекомендованого значення.*
- *Витяг афлатоксину B1 не виходить за межі рекомендованого діапазону (від 50% до 120%): **103,05%** для регресійної моделі (**CS**) та **93,18%** для регресійної моделі (**4P**).*
- *Відтворюваність  $RSD_r$  розрахована як 0,66 відтворюваності  $RSD_R$  становить **3,268%**.*

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- ***Граничне значення*** за результатами експерименту розраховане за формулою становить ***1,912 мкг/кг (ppb)*** для регресійної моделі (***CS***), та ***1,745 мкг/кг (ppb)*** для регресійної моделі (***4P***).
- При проведенні контролю, результати аналізу зразків, що перевищують ***граничне значення***, повинні бути перевірені шляхом повного повторного аналізу вихідної проби ***підтверджуючим методом***.

# ***ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ***

## ***RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15***

- Подальше використання одержаних даних статистичної обробки проведених засобами ПЗ Microsoft Office дозволяє використовувати їх для ***Безперервної перевірки методу*** шляхом включення зразків позитивного контролю, які використовувалися під час валідації, в кожную нову партію дослідних зразків (див. п. 4.3.2.7.). Отримані результати зразків позитивного контролю доповнюють існуючі дані внутрішньо-лабораторного контролю (див. рис.7).

# ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ

## RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15

Дата валідації	Конс(ppb)	Дата випробувані	Конс (ppb)
14.12.2023	1,780	15.01.2024	1,87
14.12.2023	1,870	16.01.2024	2,05
14.12.2023	1,940	17.01.2024	1,99
14.12.2023	1,680	18.01.2024	1,71
14.12.2023	1,910	19.01.2024	1,91
14.12.2023	1,900	22.01.2024	1,9
14.12.2023	1,860	23.01.2024	1,86
14.12.2023	1,810	24.01.2024	1,81
14.12.2023	1,880	25.01.2024	1,98
14.12.2023	1,930	26.01.2024	1,93
14.12.2023	1,740	05.02.2024	1,74
14.12.2023	1,900	06.02.2024	1,9
14.12.2023	1,860	07.02.2024	2,1
14.12.2023	1,890	08.02.2024	1,89
14.12.2023	1,880	09.02.2024	1,88
14.12.2023	1,910	19.02.2024	1,95
14.12.2023	1,850	20.02.2024	1,85
14.12.2023	1,970	21.02.2024	1,97
14.12.2023	1,870	22.02.2024	1,99
14.12.2023	1,840	23.02.2024	1,84
<b>M</b>	<b>1,864</b>	<b>1,906</b>	
<b>SD</b>	<b>0,069</b>	<b>0,095</b>	
<b>Граничний знач.</b>	<b>1,745</b>	<b>1,906</b>	
<b>M+SD*2</b>	<b>2,001</b>	<b>2,096</b>	

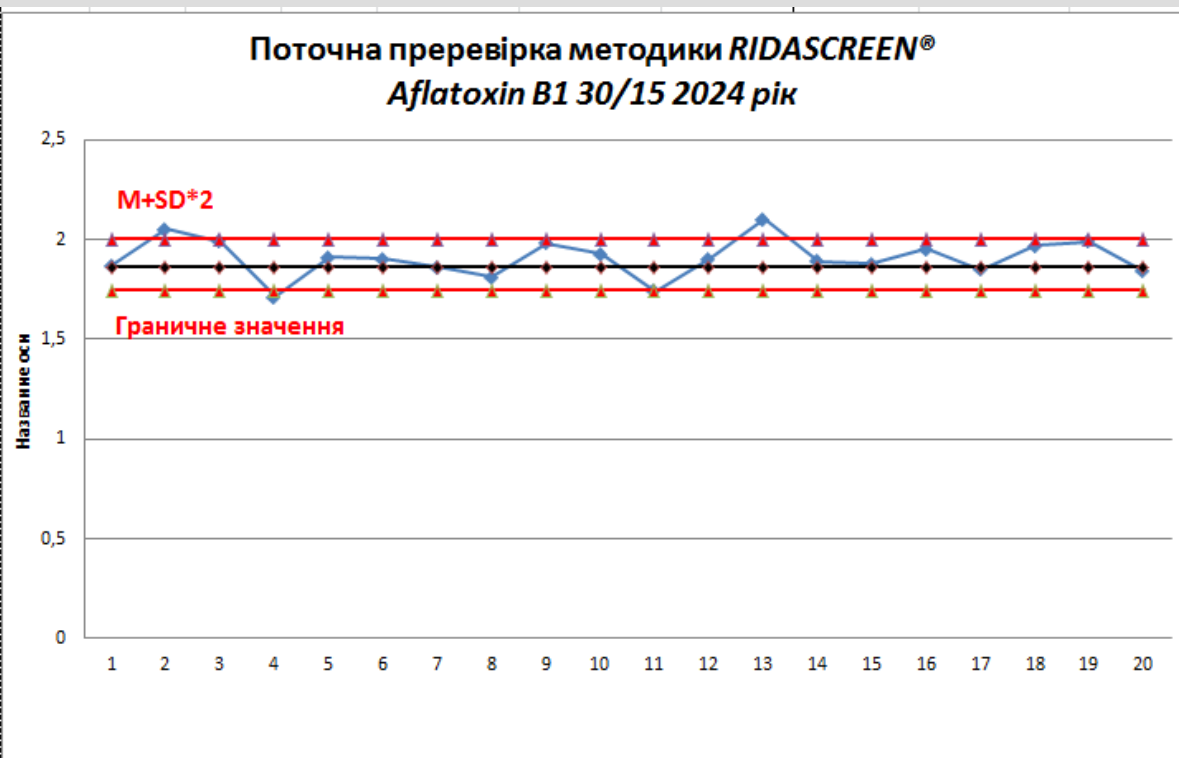


Рисунок 7

# **ІФА (ELISA) АНАЛІЗ МІКОТОКСИНІВ**

## **RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15**

- При проведенні поточної перевірки усі зразки позитивного контролю повинні бути вище **граничного значення**. Якщо ця вимога не дотримується, лабораторія повинна з'ясувати причини, та негайно вжити коригувальні дії для перевірки ефективності методу. У випадку виявлення причини потрібно повторно перевірити здатність лабораторії дотримуватись встановленого **граничного значення** і випадку необхідності повторно встановити його нове значення .

***Дякую за увагу!***