



Республиканское унитарное предприятие  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ИНСТИТУТ МЕТРОЛОГИИ»  
(БелГИМ)

Старовиленский тракт 93, 220053, г. Минск, Республика Беларусь,  
Тел.: +375 17 374-55-01, Факс: +375 17 244-99-38, E-mail: info@belgim.by, www.belgim.by

## СВИДЕТЕЛЬСТВО об аттестации методики (метода) измерений

№ 038/2024 от 09 июля 2024 г.

Методика (метод) измерений массовой доли колистина в продовольственном сырье и пищевой продукции животного происхождения, комбикормах и кормовых добавках методом ИФА с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН ИФА-Колистин», с показателями точности, приведенными в приложении 1, установленными в результате проведения экспериментальных исследований,

(наименование измеряемой величины, шкалы величины (шкалы измерений или единицы величин); объект измерений; диапазон измерений; показатели точности измерений (допускается приводить в приложении на оборотной стороне свидетельства); указание способа установления показателей точности результатов измерений при аттестации)

разработанная: Институт биоорганической химии НАН Беларуси (220141, г. Минск, ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2),

(наименование разработчика, почтовый адрес юридического лица или фамилия, собственное имя, отчество (при наличии), место жительства – для физического лица, зарегистрированного в качестве индивидуального предпринимателя)

установленная: АМИ.МН 0162-2024 «Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь. Массовая доля колистина в продовольственном сырье и пищевой продукции животного происхождения, комбикормах и кормовых добавках. Методика измерений методом ИФА с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН ИФА-Колистин»,

обозначение и наименование документа с изложением методики (метода) измерений)

аттестована в соответствии с требованиями Правил осуществления метрологической оценки в виде работ по аттестации методик (методов) измерений, утвержденных постановлением Государственного комитета по стандартизации Республики Беларусь от 23 апреля 2021 г. № 43.

В результате аттестации методики (метода) измерений установлено, что методика (метод) измерений соответствует метрологическим требованиям к измерениям, а также своему назначению.

Директор

(должность руководителя  
уполномоченного юридического лица)



(подпись)  
И.П.

А.В.Казачок

(инициалы, фамилия)

Дата выдачи свидетельства об аттестации  
методики (метода) измерений

09 июля 2024 г.

Серия МН № 0172

Приложение 1 к свидетельству  
об аттестации № 038/2024 от 09 июля 2024 г.

Рабочие характеристики, включая показатели точности измерений, методики (метода) измерений

Таблица 1.1 - Диапазоны измерений, относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности

Виды продукции	Измеряемая величина	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости $\sigma_r, \%$	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_I(TO), \%$
Мясо, печень, почки продуктивных животных, объекты аквакультуры животного происхождения и пищевая продукция, их содержащая	Массовая доля колистина	от 10,0 до 600 включ.	8,5	10
Молоко, жидкие и восстановленные сухие молочные и составные молочные продукты, побочные продукты переработки молока, продукция детского питания на молочной основе и молочные смеси		от 2,50 до 125 включ.	6,7	9,4
Молочные продукты и составные молочные продукты плотной консистенции, мороженое на молочной основе, концентрированное и сгущенное молоко, яйца и яйцопродукты, пчелиный мед		от 10,0 до 600 включ.	7,7	9,9
Животные жиры и пищевая продукция, их содержащая		от 10,0 до 510 включ.	7,7	9,9
Комбикорма и кормовые добавки		от 20,0 до 1200 включ.	7,4	12

Таблица 1.2 - Неопределенность результатов измерений

Виды продукции	Диапазон измерений массовой доли колистина, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность $u_c$ , %	Относительная расширенная неопределенность $U$ , % ( $k=2$ , $P=95$ %)
Мясо, печень, почки продуктивных животных, объекты аквакультуры животного происхождения и пищевая продукция, их содержащая	от 10,0 до 600 включ.	12	24
Молоко, жидкие и восстановленные сухие молочные и составные молочные продукты, побочные продукты переработки молока, продукция детского питания на молочной основе и молочные смеси	от 2,50 до 125 включ.	12	24
Молочные продукты и составные молочные продукты плотной консистенции, мороженое на молочной основе, концентрированное и сгущенное молоко, яйца и яйцепродукты, пчелиный мед	от 10,0 до 600 включ.	12	24
Животные жиры и пищевая продукция их содержащая	от 10,0 до 510 включ	12	24
Комбикорма и кормовые добавки	от 20,0 до 1200 включ.	14	28

Директор



А.В.Казачок

УТВЕРЖДАЮ  
Директор Института  
биоорганической химии НАН  
Беларуси



А. В. Янцевич  
2024 г.


Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь

МАССОВАЯ ДОЛЯ КОЛИСТИНА В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ  
ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, КОМБИКОРМАХ И КОРМОВЫХ  
ДОБАВКАХ

Методика измерений методом ИФА с использованием тест-системы  
«ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин»

**АМИ.МН 0162-2024**

Разработчик:  
Заведующий лабораторией химии  
белковых гормонов Института  
биоорганической химии НАН  
Беларуси

  
О. В. Свиридов  
« 13 » 06 2024 г.

## Содержание

Вводная часть.....	3
1 Рабочие характеристики, включая показатели точности измерений, методики.....	3
2 Нормативные ссылки .....	5
3 Средства измерений, вспомогательные устройства, программное обеспечение, материалы, реактивы.....	6
3.1 Средства измерений .....	7
3.2 Вспомогательные устройства, программное обеспечение .....	8
3.3 Материалы, реактивы.....	9
4 Метод измерений.....	9
5 Требования безопасности .....	9
6 Требования к квалификации операторов .....	10
7 Условия измерений .....	10
7.2 Условия инкубации микропланшетов в помещении .....	10
8 Условия хранения тест-системы .....	10
9 Подготовка к выполнению измерений .....	10
9.1 Отбор образцов .....	10
9.2 Подготовка лабораторной посуды .....	11
9.3 Приготовление растворов.....	11
9.4 Восстановление сухих пищевых продуктов .....	11
9.5 Экстракция колистина из пищевых продуктов и комбикормов .....	12
9.6 Подготовка тест-системы .....	13
10 Порядок выполнения измерений .....	15
11 Обработка результатов измерений .....	16
12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости.....	16
13 Форма представления результатов измерений .....	17
13.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности.....	17
13.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки с использованием нижней границы диапазона измерений .....	17
13.3 Форма представления результата измерения в виде односторонней оценки с использованием значения верхней границы диапазона измерений .....	17
14 Контроль точности результатов измерений.....	18
14.1 Периодичность проведения контроля точности результатов измерений .....	18
14.2 Контроль результатов, полученных в условиях повторяемости .....	18
14.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности .....	18
14.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости .....	19
14.5 Контроль правильности .....	20
14.6 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта.....	21
Приложение А (справочное) Метрологические характеристики средств измерений .....	24
Приложение Б (справочное) Состав тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин».....	25
Библиография.....	26

## **Вводная часть**

Настоящий документ устанавливает методику измерений (далее – методика) массовой доли колистина методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин» (далее – тест-система) в продовольственном сырье и пищевой продукции животного происхождения, комбикормах и кормовых добавках:

- в мясе, печени, почках продуктивных животных, в объектах аквакультуры животного происхождения и пищевой продукции их содержащей \*;
- в молоке, жидких и восстановленных сухих молочных, составных молочных продуктах, побочных продуктах переработки молока, молочной продукции для питания детей раннего возраста;
- в молочных и составных молочных продуктах плотной консистенции, концентрированном и сгущенном молоке, мороженом на молочной основе, яйцах и яйцепродуктах, пчелином меде;
- в животных жирах и пищевой продукции их содержащей \*;
- в комбикормах и кормовых добавках.

Примечание – При указании области применения использованы термины согласно СТБ 2530.

Диапазоны измерений массовой доли колистина по настоящей методике приведены в таблице 1:

Методика разработана в соответствии с требованиями, изложенными в документах [1, 2, 3], и может быть использована в сфере законодательной метрологии, а также вне ее, в том числе в следующих областях;

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

Методика может применяться в испытательных лабораториях любой принадлежности при испытаниях согласно указанной выше области применения с целью определения массовой доли колистина в пищевой продукции животного происхождения, кормах и кормовых добавках при оценке соответствия требованиям технических нормативных правовых актов в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА) и для иных целей.

### **1 Рабочие характеристики, включая показатели точности измерений, методики**

1.1 В таблицах 1 и 2 указаны диапазоны измерений массовой доли колистина, относительные стандартные отклонения повторяемости и промежуточной прецизионности и приведены значения относительной стандартной неопределенности и относительной расширенной неопределенности, полученные по результатам экспериментов по оцениванию показателей точности.

1.2 В результате оценки показателя правильности для данной методики была установлена незначимость смещения во всем диапазоне измерений для всех видов продукции согласно области применения методики.

Данные о показателях точности измерений были получены согласно СТБ ISO 5725 - 2, [4] при оценке результатов внутрилабораторных экспериментов, проведенных в 2023 году в лаборатории химии белковых гормонов ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск [5]. Экспериментальные данные были

---

\* В качестве основного компонента животного происхождения

получены в условиях повторяемости и промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами: время и персонал. Для проведения экспериментов использовали образцы с добавками колистина. Выбросы в полученных результатах экспериментов отсутствовали.

Оценивание неопределенности проводилось в соответствии с ГОСТ 34100.1, СТБ ISO 21748, [4] на основании результатов измерений, полученных при проведении эксперимента по оцениванию показателей точности.

**Таблица 1 – Диапазоны измерений, относительные значения показателей повторяемости и промежуточной прецизионности**

Виды продукции	Изменяемая величина	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости $\sigma_r$ , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности $\sigma_{(TO)}$ , %
Мясо, печень, почки продуктивных животных, объекты аквакультуры животного происхождения и пищевая продукция, их содержащая	Массовая доля колистина	от 10,0 до 600 включ.	8,5	10
Молоко, жидкие и восстановленные сухие молочные и составные молочные продукты, побочные продукты переработки молока, продукция детского питания на молочной основе и молочные смеси		от 2,50 до 125 включ.	6,7	9,4
Молочные продукты и составные молочные продукты плотной консистенции, мороженое на молочной основе, концентрированное и сгущенное молоко, яйца и яичепродукты, пчелиный мед		от 10,0 до 600 включ.	7,7	9,9
Животные жиры и пищевая продукция их содержащая,		от 10,0 до 510 включ.	7,7	9,9
Комбикорма и кормовые добавки		от 20,0 до 1200 включ.	7,4	12

**Таблица 2 – Неопределенность результатов измерений, получаемых согласно методике**

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	Относительная суммарная стандартная неопределенность $u_c$ , %	Относительная расширенная неопределенность $U$ , %, ( $k=2, P=95\%$ )
Мясо, печень, почки продуктивных животных, объекты аквакультуры животного происхождения и пищевая продукция, их содержащая	от 10,0 до 600 включ.	12	24
Молоко, жидкие и восстановленные сухие молочные и составные молочные продукты, побочные продукты переработки молока, продукция детского питания на молочной основе и молочные смеси	от 2,50 до 125 включ.	12	24
Молочные продукты и составные молочные продукты плотной консистенции, мороженое на молочной основе, концентрированное и сгущенное молоко, яйца и яичепродукты, пчелиный мед	от 10,0 до 600 включ.	12	24
Животные жиры и пищевая продукция их содержащая	от 10,0 до 510 включ.	12	24
Комбикорма и кормовые добавки	от 20,0 до 1200 включ.	14	28

Исследование предела количественного определения, избирательности, устойчивости, характеристик градуировочных зависимостей было выполнено в ходе внутрिलाбораторного эксперимента, организованного и подвергнутого анализу в соответствии с [4, 6] в 2023 г. в лаборатории химии белковых гормонов Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск [5].

Исследование предела количественного определения проводили с использованием 11 образцов продукции, по одному из каждой группы, исследуемых продуктов. Экспериментально полученные оценки предела количественного определения не превышали нижней границы диапазона измерений методики. По результатам исследования предела количественного определения, а также оценивания показателей точности на соответствующих уровнях испытаний установленный диапазон измерений является подтвержденным.

При исследовании избирательности оценена перекрестная чувствительность по отношению к антибиотикам: полимиксину В, бацитрацину А, стрептомицину, пенициллину G. Перекрестная чувствительность по отношению к полимиксину В составила менее 2 %, и менее 0,01 % по отношению к бацитрацину А, стрептомицину, пенициллину G.

Устойчивость методики исследована и подтверждена в отношении следующих наиболее значимых параметров: температура и время при проведении экстракции колистина из исследуемых образцов, проведения иммунохимической и ферментативной реакций, время центрифугирования экстракта.

Полученная оценка аналитической чувствительности центральной части (диапазон, границы которого соответствуют точкам на градуировочном графике с массовой концентрацией колистина в градуировочных растворах С2-С3 и С3-С4) градуировочных графиков, построенных при проведении эксперимента, удовлетворяли следующему условию:

– абсолютное значение аналитической чувствительности, рассчитанное относительно натурального логарифма массовой концентрации аналита в градуировочных растворах – не менее 0,16;

– отношение максимального к минимальному значению коэффициента аналитической чувствительности  $(B3/B0-B4/B0)/(\ln C3-\ln C4)$  или  $B4/B0-B5/B0)/(\ln C4-\ln C5)$ , выраженного относительно натурального логарифма массовой концентрации колистина в градуировочных растворах – не более 2.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие технические нормативные правовые акты в области технического нормирования и стандартизации (далее – ТНПА):

СТБ 1036-97	Продукты пищевые и продовольственное сырье. Методы отбора проб для определения показателей безопасности;
СТБ 2530-2018	Молоко и продукты переработки молока. Термины и определения;
СТБ ISO 5725-2-2022	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод измерения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений;
СТБ ISO 5725-4-2022	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 4. Основные методы определения правильности стандартного метода измерений;

СТБ ИСО 5725-6-2002	Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике;
СТБ ISO 21748-2019	Статистические методы. Руководство по использованию оценок повторяемости, воспроизводимости и правильности при оценке неопределенности измерений
ГОСТ 12.1.004–91	Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования;
ГОСТ 12.2.003–91	Система стандартов безопасности труда. Оборудование производственное. Общие требования безопасности;
ГОСТ OIML R 76-1-2011	Весы лабораторные. Общие технические требования;
ГОСТ 1770–74	Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия;
ГОСТ 6709–72	Вода дистиллированная. Технические условия;
ГОСТ 7269-2015	Мясо. Методы отбора образцов и органолептические методы определения свежести;
ГОСТ 12026-76	Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия;
ГОСТ 13496.0-2016	Комбикорма, комбикормовое сырье, методы отбора проб;
ГОСТ 25336-82	Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры;
ГОСТ 28498-90	Термометры жидкостные стеклянные. Общие технические требования. Методы испытаний;
ГОСТ 30364.0-97	Продукты яичные. Методы отбора проб и органолептического анализа;
ГОСТ 31339-2006	Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб;
ГОСТ 31467-2012	Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы отбора проб и подготовка их к испытаниям;
ГОСТ 32219-2013	Молоко и молочная продукция. Правила приемки, методы отбора и подготовка проб к анализу.
ГОСТ 34100.1-2017	Неопределенность измерения. Часть 1. Введение в руководство по выражению неопределенности измерения

Примечание – При пользовании настоящей методикой целесообразно проверить действие ссылочных ТНПА на официальном сайте Национального фонда ТНПА в глобальной компьютерной сети Интернет.

Если ссылочные ТНПА заменены (изменены), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться действующими взамен ТНПА. Если ссылочные ТНПА отменены без замены, то положение, в котором дана ссылка на них, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

### **3 Средства измерений, программное обеспечение, вспомогательные устройства, материалы, реактивы**

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, программное обеспечение, вспомогательные устройства, материалы и реактивы.

### 3.1 Средства измерений

Таблица 3 – Применяемые средства измерений

Тип средства измерений; модификация средства измерений	Метрологические и технические характеристики
Фотометры универсальные Ф300; Фотометр универсальный Ф300ТП	<ul style="list-style-type: none"> <li>- диапазон измерения оптической плотности: от 0,0 до 1,5 Б на длинах волн от 340 до 400 нм; от 0 до 2,5 Б на длинах волн от 401 до 700 нм;</li> <li>- пределы допускаемой абсолютной погрешности при измерении оптической плотности для диапазона от 0 до 0,400 Б: <math>\pm 0,020</math> Б;</li> <li>- пределы допускаемой относительной погрешности при измерении оптической плотности для диапазона от 0,401 до 2,500 Б: <math>\pm 5,0</math> %;</li> <li>- пределы допускаемого среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности при измерении оптической плотности для диапазона от 0 до 0,400 Б: <math>\pm 0,006</math> Б;</li> <li>- пределы допускаемого среднего квадратического отклонения случайной составляющей погрешности при измерении оптической плотности для диапазона от 0,401 до 2,500 Б: <math>\pm 1,5</math> %;</li> <li>- номинальная цена единицы младшего разряда результата измерений составляет 0,001 Б.</li> </ul>
Весы лабораторные электронные PS; Весы лабораторные электронные PS 360/C/2/N	<ul style="list-style-type: none"> <li>- класс точности весов по ГОСТ OIML R 76-1-2011: высокий;</li> <li>- максимальная нагрузка: 360 г;</li> <li>- минимальная нагрузка: 0,02 г;</li> <li>- действительная цена деления: 1 мг;</li> <li>- пределы допускаемой погрешности весов, в интервалах взвешивания от 0,02 г до 50 г включ., св. 50 г до 200 г включ., св. 200 г до 360 г включ.: <math>\pm 5,0</math> мг; <math>\pm 10,0</math> мг; <math>\pm 15,0</math> мг.</li> </ul>
Термометры стеклянные лабораторные ТЛ-2; Термометр стеклянный лабораторный ТЛ-2 №1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- диапазон измеряемых температур: от минус 30 °С до 70 °С;</li> <li>- цена деления: 1,0 °С;</li> <li>- пределы допускаемой абсолютной погрешности: <math>\pm 1,0</math> °С.</li> </ul>
Приборы измерительные ПИ-002; Прибор измерительный ПИ-002/1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- диапазон измерений температуры: от 5 °С до 40 °С;</li> <li>- диапазон измерений относительной влажности: от 5 % до 98 %;</li> <li>- пределы допускаемой абсолютной погрешности измерения температуры: <math>\pm 0,5</math> °С;</li> <li>- пределы допускаемой абсолютной погрешности измерения относительной влажности: <math>\pm 3</math> %.</li> </ul>
Дозаторы механические Acura manual; Дозаторы механические Acura manual 825, Acura manual 835, Acura manual 855	см. приложение А

Допускается применение других средств измерений с метрологическими и техническими характеристиками не хуже ниже указанных:

а) фотометр для микропланшетов, обеспечивающий измерение на длине волны 450 нм с пределами погрешности измерения оптической плотности  $\pm 0,02$  Б в диапазоне измерений от 0 до 0,4 Б и пределами относительной погрешности измерения оптической плотности  $\pm 5$  % в диапазоне измерений свыше 0,4 Б;

б) весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1 высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания не менее 200 г, пределами допускаемой погрешности  $\pm 0,01$  г;

в) средство измерений для измерения температуры и влажности воздуха:

- с диапазоном измерений температуры, включающим диапазон от 15 °С до 25 °С,

и пределами относительной погрешности измерений температуры  $\pm 1$  °С;

- с диапазоном измерений относительной влажности, включающим диапазон от 15 % до 80 %, и пределами относительной погрешности измерений относительной влажности  $\pm 3$  %;

г) термометр лабораторный частичного погружения с ценой деления 1 °С с диапазоном измерений, включающим в себя диапазон значений от минус 18 °С до 25 °С.

д) дозаторы пипеточные:

- с диапазоном объемов дозирования от 10 мм<sup>3</sup> до 100 мм<sup>3</sup> и пределами относительного отклонения фактического объема дозы от номинального  $\pm 2,5$  %;

- с диапазоном объемов дозирования от 100 до 1000 мм<sup>3</sup> и пределами относительного отклонения фактического объема дозы от номинального  $\pm 1,5$  %;

- с диапазоном объемов дозирования от 1000 до 10 000 мм<sup>3</sup> и пределами относительного отклонения фактического объема дозы от номинального  $\pm 2,0$  %;

- многоканальные с диапазоном объемов дозирования от 40 до 350 мм<sup>3</sup> и пределами относительного отклонения фактического объема дозы от номинального  $\pm 2,0$  % (при отсутствии автоматического устройства для промывания микропланшетов);

Для проведения работ согласно методике измерений используют средства измерений, допущенные к применению в Республике Беларусь и прошедшие метрологическую оценку в установленном порядке.

### **3.2 Вспомогательные устройства, программное обеспечение**

Шаблон, совместимый с Microsoft Excel, для проведения обработки результатов измерений разработан в Институте биоорганической химии НАН Беларуси, далее – программное обеспечение.

Центрифуга лабораторная, обеспечивающая относительное центробежное ускорение 4000 g (пробирки вместимостью 10-15 см<sup>3</sup>).

Холодильник бытовой, позволяющий поддерживать температуру в холодильной камере от 2 °С до 8 °С и не более 18 °С в морозильной камере.

Штатив для пробирок.

Пробирки полипропиленовые с пробками (или завинчивающимися колпачками) для центрифугирования вместимостью от 10 до 15 см<sup>3</sup>.

Пробирки микроцентрифужные с крышкой (типа Эппендорф) из полипропилена вместимостью 2 см<sup>3</sup> или пробирки полипропиленовые с пробками вместимостью 5 см<sup>3</sup>.

Колба мерная вместимостью 100,0 см<sup>3</sup> типа 1-100-1 по ГОСТ 1770.

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

Стаканы Н-1-50, Н-1-100 или Н-1-150, Н-1-500 по ГОСТ 25336.

Палочки стеклянные оплавленные.

Цилиндры мерные вместимостью 25; 50; 500 см<sup>3</sup> типа 3-25-1, 3-50-2, 3-500-2 по ГОСТ 1770.

Чашки Петри стеклянные многоразовые диаметром 10 см, высотой 1,5 см или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки.

Лабораторный ротатор, обеспечивающий скорость вращения не менее 25 об/мин.

Гомогенизатор лабораторный или бытовой блендер.

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

- инкубатор для микропланшетов, обеспечивающий поддержание температур от 20 °С до 25 °С с пределами допускаемых отклонений температур  $\pm 1$  °С;

- лабораторный вортекс, обеспечивающий частоту вращения не менее 1800 об/мин;

- устройство для промывания микропланшетов автоматически с возможностью дозирования вносимого с каждую лунку моющего раствора в объеме 0,200 см<sup>3</sup>.

Допускается использовать другие средства измерений, вспомогательные устройства и материалы с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных.

### **3.3 Материалы, реактивы**

Пленка «парафильм» или скотч.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Гексан х.ч. по [7].

Колистин, чистота не менее 98,0 % или спайк-препарат колистина, поставляемый по запросу, в составе тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин».

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деионизованная.

Моющее средство (детергент), не содержащее ферментных или ингибирующих добавок. Рекомендуется использовать лабораторный детергент.

Тест-система «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин» в составе, указанном в приложении Б.

Допускается использовать другие реактивы по качеству не хуже указанных, а также тест-системы, имеющие комплектацию и характеристики, аналогичные указанным. Замена отдельных реагентов на реагенты из других тест-систем или других партий не допускается.

### **4 Метод измерений**

Измерение массовой доли колистина выполняют методом конкурентного колориметрического иммуноферментного анализа (ИФА). Принцип метода основан на измерении оптической плотности растворов проб или градуировочных растворов в ходе проведения ИФА.

В ходе ИФА в лунки микропланшета добавляют градуировочные растворы или растворы проб. Затем в лунки вносят конъюгат, представляющий собой колистин, конъюгированный с пероксидазой из корней хрена. Присутствующий в растворе пробы колистин и колистин, конъюгированный с ферментом, конкурируют за центры связывания антител (конкурентный ИФА). После 50-минутной инкубации несвязавшиеся реагенты удаляют промыванием микропланшета. Затем в лунки добавляют хромоген-субстратную смесь, которая под действием фермента в составе связанного с антителами конъюгата превращается в окрашенный продукт, количество которого обратно пропорционально содержанию колистина в анализируемом образце или градуировочном растворе. Реакцию окрашивания останавливают внесением стоп-реагента (серной кислоты). Оптическую плотность растворов в лунках измеряют с применением микропланшетного спектрофотометра при длине волны 450 нм.

Измеренная оптическая плотность находится в обратной зависимости от массовой концентрации колистина в градуировочных растворах и растворах проб. Массовую долю колистина в образце определяют по градуировочной зависимости, построенной с использованием шести градуировочных растворов.

### **5 Требования безопасности**

При выполнении измерений по настоящей методике соблюдают следующие требования:

- электробезопасности по ГОСТ 12.2.003;
- пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004;
- техники безопасности при работе в химической лаборатории в соответствии с инструкциями, утвержденными в установленном порядке;
- техники безопасности, изложенные в эксплуатационной документации средств измерений и оборудования, применяемые при проведении измерений.

## **6 Требования к квалификации операторов**

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

## **7 Условия измерений**

**7.1** При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С;
- относительная влажность воздуха не более 80 % при температуре 25 °С.

## **7.2 Условия инкубации микропланшетов в помещении**

При отсутствии инкубатора микропланшеты могут инкубироваться в помещении при выполнении следующих условий:

- температура окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С;
- не допускается попадание прямых солнечных лучей на планшет;
- планшет не должен подвергаться воздействию сильных естественных или искусственных потоков воздуха, вызванных, например, принудительной вентиляцией;
- с целью устранения воздействия холодной поверхности стола, на которой находится планшет, рекомендуется помещать под планшет теплоизоляционный материал, например, сложенное в несколько слоев бумажное полотенце;
- при относительной влажности воздуха менее 40 % и наличии воздушных потоков с целью устранения возможного испарения содержимого лунок рекомендуется закрывать лунки пленкой «парафильм» или заклеивать скотчем;
- в особых случаях, которые оговорены по тексту методики, требуется помещать планшет в защищенное от света место, например, в ящик стола.

## **8 Условия хранения тест-системы**

Хранение тест-системы осуществляется в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в оригинальной упаковке. Замораживание тест-системы с целью увеличения срока ее хранения не допускается.

Хранение неиспользованных стрипов (лунок) осуществляется в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в герметично закрытом оригинальном пакете.

Необходимо исключить прямое попадание света на раствор субстрата и хромоген-субстратный раствор.

Дополнительные рекомендации по хранению тест-системы приведены в инструкции изготовителя.

## **9 Подготовка к выполнению измерений**

### **9.1 Отбор образцов**

Отбор образцов для анализа проводят по СТБ 1036, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 30364.0, ГОСТ 32219, ГОСТ 31339, ГОСТ 7269, ГОСТ 31467 или другим ТНПА на конкретные виды продукции. При необходимости отобранные образцы хранят в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 сут или в замороженном виде при температуре не более минус 20 °С не более 14 сут. Перед проведением подготовки проб в соответствии с 9.4 замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от 2 °С до 8 °С. Жидкие образцы тщательно перемешивают, плотные образцы измельчают с помощью

гомогенизатора или блендера. Перед измерением образцы должны быть доведены до температуры от 20 °С до 25 °С.

## **9.2 Подготовка лабораторной посуды**

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

Запрещается:

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

## **9.3 Приготовление растворов**

**9.3.1 Приготовление рабочего раствора для экстракции колистина из молочных и составных молочных продуктов плотной консистенции, мороженого на молочной основе, концентрированного и сгущенного молока, яиц и яичепродуктов, животных жиров и пищевой продукции их содержащей, пчелиного меда**

Рабочий раствор А готовят, смешивая один объем раствора А (4-кратный концентрат) и три объема дистиллированной или деионизованной воды. Требуемый объем раствора А для экстракции колистина из N образцов вычисляют по формуле

$$V = 8 \cdot N + 2, \quad (1)$$

где V – объем рабочего раствора А, см<sup>3</sup>;

N – количество образцов (для каждого образца используют две параллельные пробы).

Получают рабочий раствор А, который хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего оставшегося срока хранения тест-системы.

**9.3.2 Приготовление рабочего раствора для экстракции колистина из мяса, печени, почек продуктивных животных, аквакультур животного происхождения и пищевой продукции их содержащей, комбикормов и кормовых добавок**

Раствор А<sub>1</sub> разводят в 10 раз рабочим раствором А, приготовленным согласно 9.3.1. В стеклянном или пластиковом стакане вместимостью 50–150 см<sup>3</sup> смешивают один объем раствора А<sub>1</sub> (см<sup>3</sup>) и девять объемов рабочего раствора А (см<sup>3</sup>). Требуемый объем раствора для экстракции колистина вычисляют по формуле (1).

Приготовленный раствор хранят в течение не более 1 ч при температуре окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С.

## **9.4 Восстановление сухих пищевых продуктов**

### **9.4.1 Восстановление сухих молока, сливок, молочной сыворотки**

Для подготовки проб используют образец, отобранный в соответствии с 9.1. Образец доводят до температуры от 20 °С до 25 °С.

В стакан вместимостью 100 см<sup>3</sup> или 150 см<sup>3</sup> помещают навеску образца сухого молока, взвешенную с точностью до 0,1 г. Масса навески в зависимости от содержания жира составляет:

- 9,0 г сухого обезжиренного молока;
- 12,0 г сухого молока с содержанием жира 20 %;
- 12,5 г сухого молока с содержанием жира 25 %;
- 16,0 г сухих сливок;
- 12,5 г кисломолочных сухих продуктов;
- 10,0 г сухого молока с содержанием жира, отличным от перечисленного выше.

Затем в стакан с навеской порциями по 5-10 см<sup>3</sup> приливают теплую (40±2) °С дистиллированную или деионизованную воду, перемешивая содержимое стеклянной палочкой до полного растворения образца. После растворения сухого продукта раствор из стакана количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и оставляют на 10-15 мин для набухания белков.

Примечание – Для восстановления сухих молочных детских и других сухих молочных продуктов используют массу образца, указанную в ТНПА на каждый вид продукта.

#### **9.4.2 Восстановление сухих яичных продуктов**

Взвешивают (20±0,1) г сухого яичного продукта и помещают в стеклянный или пластиковый стакан вместимостью 100 или 150 см<sup>3</sup>, последовательно добавляют по 10 см<sup>3</sup> дистиллированной или деионизованной воды температурой (20±2) °С и перемешивают стеклянной палочкой до полного исчезновения комков, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и доводят до метки дистиллированной или деионизованной водой, тщательно перемешивают, оставляют на 15 мин для набухания белков.

#### **9.5 Экстракция колистина из пищевых продуктов и комбикормов**

##### **9.5.1 Экстракция колистина из мяса, почек, печени продуктивных животных, объектов аквакультуры животного происхождения и пищевой продукции их содержащей**

Взвешивают в две полипропиленовые пробирки для центрифугирования вместимостью 10 или 15 см<sup>3</sup> по (1,00±0,01) г измельченного образца и добавляют в каждую по 4,000 см<sup>3</sup> раствора, приготовленного согласно 9.3.2 и по 1,000 см<sup>3</sup> гексана. Смесь энергично встряхивают вручную до однородного состояния (примерно 30 с) перемешивают в течение 10 мин на ротаторе со скоростью 25 об/мин.

Пробы центрифугируют 10 мин при 4000g и температуре от 20 °С до 25 °С.

Примечание: после центрифугирования осадки в пробирке будут расположены на дне и сверху, на границе между водным раствором и гексаном. Аликвоту водного экстракта отбирают, протыкая наконечником дозатора слой гексана и осадка на границе гексана и водного экстракта, после чего медленно выдавливают воздух из наконечника в водный раствор до первого упора, не допуская взмучивания осадков, и отбирают 0,025 см<sup>3</sup> экстракта.

0,025 см<sup>3</sup> водного экстракта (раствор между осадком внизу пробирки и осадком, расположенным сверху, между гексаном и водным раствором) разводят 0,475 см<sup>3</sup> раствора **В** для разведения экстрактов и перемешивают. Для анализа отбирают 0,050 см<sup>3</sup>.

Фактор разведения – **100**.

##### **9.5.2 Экстракция колистина из комбикормов и кормовых добавок**

Экстракцию и отбор водного экстракта проводят согласно 9.5.1.

0,025 см<sup>3</sup> водного супернатанта (раствор между осадком внизу пробирки и осадком, расположенным сверху, между гексаном и водным раствором) разводят 0,975 см<sup>3</sup> раствора **В** для разведения экстрактов и перемешивают. Для анализа отбирают 0,050 см<sup>3</sup>.

Фактор разведения – **200**.

##### **9.5.3 Экстракция колистина из молока, жидких и восстановленных сухих молочных и составных молочных продуктов, жидких побочных продуктов переработки молока, продукции детского питания на молочной основе и молочных смесей**

Взвешивают по (4,00±0,01) г жидкого или восстановленного продукта в две полипропиленовые пробирки для центрифугирования и в каждую добавляют по 0,250 см<sup>3</sup> раствора **Б** и по 1,000 см<sup>3</sup> гексана. Смесь несколько раз энергично встряхивают вручную до однородного состояния раствора и перемешивают в течение 10 мин на ротаторе, 25 об/мин.

Пробы центрифугируют 10 мин при 4000g и температуре от 20 °С до 25 °С.

0,025 см<sup>3</sup> водного супернатанта (раствор между осадком внизу пробирки и осадком, расположенным сверху, между гексаном и водным раствором) разводят 0,475 см<sup>3</sup> раствора **В** для разведения экстрактов и перемешивают. Для анализа отбирают 0,050 см<sup>3</sup>.

Фактор разведения – **21,25**.

#### **9.5.4 Экстракция колистина из молочных и составных молочных продуктов плотной консистенции, мороженого на молочной основе, концентрированного и сгущенного молока, яиц и яйцепродуктов, животных жиров и пищевой продукции их содержащей, пчелиного меда**

Взвешивают по (1,00±0,01) г измельченного образца в две полипропиленовые пробирки для центрифугирования и добавляют по 4,000 см<sup>3</sup> раствора **А**, приготовленного согласно 9.3.1, и по 1,000 см<sup>3</sup> гексана (пробы образцов шпика, сала, топленого жира, сливочного масла и иной жиросодержащей продукции животного происхождения после внесения рабочего раствора **А**, подогревают на водяной бане при температуре от 60 до 70 °С в течение 1-2 мин). Смесь энергично встряхивают вручную до однородного состояния (примерно 30 с) и перемешивают в течение 10 мин на ротаторе, 25 об/мин.

Пробы центрифугируют 10 мин при 4000g и температуре от 20 °С до 25 °С.

0,025 см<sup>3</sup> водного супернатанта (раствор между осадком внизу пробирки и осадком, расположенным сверху, между гексаном и водным раствором) разводят 0,475 см<sup>3</sup> раствора **В** для разведения экстрактов и перемешивают. Для анализа отбирают 0,050 см<sup>3</sup>.

Фактор разведения – **100**, (для животных жиров и пищевой продукции, их содержащей, фактор разведения – **85**).

Не позднее 20 мин после центрифугирования полученные экстракты колистина необходимо развести раствором **В**. Разведенные экстракты следует использовать для проведения ИФА не позднее 1 ч после их приготовления (хранить при температуре от 20 °С до 25 °С).

### **9.6 Подготовка тест-системы**

#### **9.6.1 Предварительная подготовка и порядок применения тест-систем**

Тест-систему извлекают из холодильника и, не открывая упаковку микропланшета, доводят до температуры окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С в течение 30–60 мин.

Перед использованием реагенты необходимо аккуратно перемешать круговыми движениями флаконов по поверхности стола.

Особенное внимание следует обратить на 10-кратный концентрат моющего буфера (КМБ), в котором при температуре 4 °С может выпасть осадок. Перед применением КМБ, предварительно нагретый до температуры от 20 °С до 25 °С, необходимо аккуратно перемешать до растворения осадка.

Замена отдельных реагентов на реагенты из других тест-систем или других партий данной тест-системы не допускается.

Не допускается использование реагентов, имеющих следующие признаки распада:

- голубая окраска раствора хромогена до внесения его в лунки;
- оптическая плотность в лунках микропланшета с добавленным нулевым градуировочным раствором (концентрация колистина 0 нг/см<sup>3</sup>) после остановки ферментативной реакции внесением стоп-реагента менее 1,3 Б.

Отбор супернатантов для разведения, внесение градуировочных растворов и растворов проб в каждую лунку выполняют отдельными чистыми наконечниками. Внесение раствора конъюгата, хромоген-субстратного раствора и стоп-реагента может быть выполнено многоканальным дозатором.

#### **9.6.2 Подготовка микропланшета**

Микропланшет со стрипами, предварительно подготовленными в соответствии с 9.6.1, вынимают из упаковки. В рамку микропланшета помещают необходимое количество стрипов, рассчитанное исходя из требуемого для проведения измерений количества лунок.

Количество лунок микропланшета, необходимых для проведения анализа,  $N_w$ , вычисляют по формуле

$$N_w = 12 + 2 \cdot N_{SMP}, \quad (2)$$

где 12 – количество лунок для градуировочных растворов;

$N_{SMP}$  – количество исследуемых образцов.

Оставшиеся стрипы сразу же помещают в упаковку, герметично заклеивают клейкой лентой и хранят в соответствии с разделом 8.

Размечают положение лунок, предназначенных для градуировочных растворов и растворов проб, согласно рисунку 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	C-0	C-0	П-3	П-3	П-11	П-11						
<b>B</b>	C-1	C-1	П-4	П-4	П-12	П-12						
<b>C</b>	C-2	C-2	П-5	П-5	П-13	П-13						
<b>D</b>	C-3	C-3	П-6	П-6	П-14	П-14						
<b>E</b>	C-4	C-4	П-7	П-7	П-15	П-15						
<b>F</b>	C-5	C-5	П-8	П-8	П-16	П-16						
<b>G</b>	П-1	П-1	П-9	П-9	П-17	П-17						
<b>H</b>	П-2	П-2	П-10	П-10	П-18	П-18						

C-0 – нулевой градуировочный раствор.

C -1,... C-5 – градуировочные растворы. П-1, П-2,... П-18 – исследуемые пробы.

1;2...12 – номера стрипов в планшете. А, В,... Н – обозначения лунок в стрипах.

**Рисунок 1 – Схема расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб**

Не рекомендуется одновременно использовать более шести стрипов (время раскапывания градуировочных растворов и измеряемых проб от первой до последней лунки в используемых стрипах не должно превышать 5 мин). При необходимости измерить большее количество проб анализ выполняют в несколько этапов.

### 9.6.3 Приготовление моющего буфера

В стакан вместимостью 500 см<sup>3</sup> вносят дозатором аликвоту КМБ, подготовленного в соответствии с 9.6.1, и добавляют мерным цилиндром в девять раз больший объем дистиллированной воды, после чего содержимое стакана перемешивают. Требуемый для проведения ИФА объем КМБ  $V_m$ , см<sup>3</sup>, определяют, исходя из планируемого к использованию количества стрипов, и вычисляют по формуле

$$V_m = 0,5 \cdot N_{STR} + 1,0, \quad (3)$$

где  $N_{STR}$  – количество используемых в ИФА стрипов.

Полученный раствор хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в течение месяца.

### 9.6.4 Приготовление раствора конъюгата

Раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием и защищают от света. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Требуемый для приготовления объем раствора конъюгата определяют, исходя из планируемого к использованию количества лунок ( $N_{SMP}$ ), и вычисляют по формуле

$$V_w = 0,050 \cdot N_{SMP} + V_{kl}, \quad (4)$$

где  $V_w$  – приготавливаемый объем раствора конъюгата, см<sup>3</sup>;

$N_{SMP}$  – количество лунок микропланшета, вычисленное по формуле (2);

$V_{к1}$  – дополнительный объем раствора конъюгата, приготавливаемый в запас (0,5 см<sup>3</sup>).

Концентрат конъюгата разводят в 50 раз следующим образом. Дозатором отбирают аликвоту раствора для разведения конъюгата, равную 98 % объема, вычисленного по формуле (4), и вносят в полипропиленовую пробирку вместимостью 5 см<sup>3</sup>, затем добавляют аликвоту концентрата конъюгата, равную 1/50 вычисленного по формуле (4) объема, и тщательно перемешивают, избегая образования пены. 50-кратный концентрат конъюгата сразу же убирают для хранения в холодильную камеру холодильника.

## **10 Порядок выполнения измерений**

**10.1** Для проведения измерений используют пробы, подготовленные в соответствии с 9.5. Компоненты тест-систем готовят в соответствии с 9.6.

**10.2** В лунки микропланшета, размеченного согласно 9.6.2, вносят отобранные дозатором

– в лунки А1 – F2 – по две аликвоты объемом 0,050 см<sup>3</sup> каждого градуировочного раствора;

– в лунки А3 – Н6 – аликвоты объемом 0,050 см<sup>3</sup> двух идентичных проб одного образца, приготовленных по 9.5.

Каждую аликвоту вносят в отдельную лунку отдельным чистым наконечником, градуировочные растворы вносят в лунки в порядке возрастания их концентраций.

**10.3** В каждую лунку микропланшета вносят отобранный дозатором раствор конъюгата, приготовленный по 9.6.4, объемом 0,050 см<sup>3</sup>.

**10.4** Закрывают планшет пленкой «парафильм» или заклеивают скотчем. Перемешивают содержимое лунок планшета на вортексе или вручную медленными круговыми движениями планшета по поверхности стола в течение 10 с.

**10.5** Микропланшет инкубируют при температуре от 20 °С до 25 °С в защищенном от света месте в течение 50 мин.

**10.6** По окончании инкубации жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета.

**10.7** Микропланшет промывают три раза, добавляя при этом каждый раз многоканальным дозатором в лунки планшета по 0,200 см<sup>3</sup> рабочего раствора моющего буфера, приготовленного по 9.6.3, и затем выливают его резким переворачиванием микропланшета. После последнего промывания микропланшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

Примечание – В процессе работы следует избегать увеличения длительности перерывов между отдельными этапами работы и высыхания лунок. Точность результатов измерений зависит от равномерного промывания лунок, поэтому следует тщательно соблюдать процесс промывания. Рекомендуется проводить процедуру промывания микропланшета с помощью устройства для промывания микропланшетов, задавая следующие параметры программы: количество циклов промывания – 3, объем рабочего моющего буфера, вносимого в одну лунку, – 0,200 см<sup>3</sup>.

**10.8** В каждую лунку вносят дозатором по 0,100 см<sup>3</sup> раствора хромоген-субстратного раствора и двумя-тремя аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивают его содержимое.

**10.9** Микропланшет инкубируют в течение 15 мин при температуре окружающего воздуха от 20 °С до 25 °С в защищенном от света месте:

Отсчет времени инкубации начинают немедленно после окончания внесения раствора субстрата.

**10.10** Сразу же после окончания инкубации в каждую лунку планшета дозатором вносят по 0,100 см<sup>3</sup> раствора стоп-реагента и аккуратными круговыми движениями перемешивают его содержимое.

**10.11** Оптическую плотность растворов в лунках микропланшета измеряют на фотометре для микропланшетов при длине волны 450 нм в течение не более 15 мин после добавления стоп-реагента. Измерения производят в соответствии с эксплуатационной документацией на фотометр.

**10.12** Регистрацию промежуточных измерений проводят в журнале по форме, установленной системой менеджмента лаборатории.

## **11 Обработка результатов измерений**

Обработку результатов измерений производят с помощью прилагаемого программного обеспечения, совместимого с Microsoft Excel.

На основании измеренных значений оптической плотности в градуировочных растворах, внесенных оператором в таблицу раздела 1 прилагаемого программного обеспечения, производится построение градуировочного графика зависимости  $B_i/B_0 \cdot 100\%$  (ось ординат) от натурального логарифма концентрации  $C_i$  (ось абсцисс), где:

$B_i$  – среднее значение оптической плотности для  $i$ -го градуировочного раствора, Б;

$B_0$  – среднее значение оптической плотности для градуировочного раствора  $C_0$ , несодержащего колистин, Б;

$C_i$  – массовая концентрация колистина в градуировочном растворе,  $\text{нг/см}^3$ .

По градуировочному графику автоматически рассчитывается массовая доля колистина в измеряемых пробах в  $\text{мкг/кг}$  после внесения оператором значений оптической плотности и фактора разведения в соответствующие графы таблицы прилагаемого программного обеспечения.

За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух измерений параллельных проб одного образца при выполнении условия повторяемости (раздел 13), которое вычисляют по формуле

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (5)$$

где  $X_1, X_2$  – результаты измерений массовой доли колистина в двух идентичных пробах одного образца,  $\text{мкг/кг}$ ;

$\bar{X}$  – среднее арифметическое значение массовой доли колистина для двух идентичных проб одного образца,  $\text{мкг/кг}$ .

Окончательный результат измерений округляют до трех значащих цифр.

Если окончательный результат измерений  $\bar{X}$  оказывается меньше значения нижней границы диапазона измерений, приведенного в разделе 1, то окончательный результат измерений представляют в форме односторонней оценки массовой доли колистина в образце согласно п. 13.2.

Если окончательный результат измерений  $\bar{X}$  оказывается больше значения верхней границы диапазона измерений, приведенного в разделе 1, то окончательный результат измерений представляют в форме односторонней оценки массовой доли колистина в образце согласно 13.3.

Регистрацию обработки результатов промежуточных измерений проводят по форме, предусмотренной системой менеджмента лаборатории.

Расширенную неопределенность результатов измерений вычисляют по 13.1.

## **12 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости**

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

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

$$|X_1 - X_2| \leq r_{abs}, \quad (6)$$

то оба результата считают приемлемыми и в качестве результата измерений указывают среднее арифметическое  $\bar{X}$ , рассчитанное по формуле (5).

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

$$r_{abs} = 0,01 \cdot r \cdot \bar{X}, \quad (7)$$

где  $r$  – относительное значение предела повторяемости, приведенное в таблице 4, %. При невыполнении условия (6) проводят повторные измерения согласно разделу 10.

### **13 Форма представления результатов измерений**

#### **13.1 Форма представления результатов измерений с использованием расширенной неопределенности**

Результат измерений, выдаваемый лабораторией, может быть представлен в виде

$$(\bar{X} \pm U(X)) \text{ мкг/кг } (P = 0,95, k = 2),$$

где  $\bar{X}$  – результат измерений массовой доли колистина, мкг/кг, формула (5);  
 $U(X)$  – расширенная неопределенность результата измерений, мкг/кг.

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

$$U(X) = 0,01 \cdot U \cdot \bar{X}, \quad (8)$$

где  $U$  – относительная расширенная неопределенность результата измерений, выполняемых в соответствии с методикой (таблица 2), %.

#### **13.2 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки с использованием нижней границы диапазона измерений**

Если окончательный результат измерений  $\bar{X}$  оказывается меньше значения нижней границы диапазона измерений, приведенного в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой доли колистина в образце

$$\text{менее } X_{LL} \text{ мкг/кг,}$$

где  $X_{LL}$  – значение нижней границы диапазона измерений, мкг/кг, приведенное в разделе 1.

#### **13.3 Форма представления результатов измерений в виде односторонней оценки с использованием значения верхней границы диапазона измерений**

Если окончательный результат измерений  $\bar{X}$  оказывается больше значения верхней границы диапазона измерений, приведенного в разделе 1, то дается односторонняя оценка массовой доли колистина в образце

более  $X_{HL}$  мкг/кг,

где  $X_{HL}$  – значение верхней границы диапазона измерений, мкг/кг, приведенное в разделе 1.

## 14 Контроль точности результатов измерений

### 14.1 Периодичность проведения контроля точности результатов измерений

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

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

### 14.2 Контроль результатов, полученных в условиях повторяемости

Контроль результатов, полученных в условиях повторяемости, при измерении массовой доли колистина в двух идентичных пробах одного образца проводят в соответствии с разделом 12.

### 14.3 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях промежуточной прецизионности

Проверку приемлемости результатов измерений массовой доли колистина в идентичных пробах одного образца, полученных в условиях промежуточной прецизионности с изменяющимися факторами оператор-время, проводят в соответствии с требованиями СТБ ИСО 5725-6 следующим образом.

Лаборатория получает два результата измерений  $\bar{X}_1$ ,  $\bar{X}_2$  согласно разделу 10, варьируя факторы промежуточной прецизионности (оператор, время) и обеспечивая контроль повторяемости согласно разделу 12. За результат измерений принимают среднее арифметическое двух результатов  $\bar{X}_1$ ,  $\bar{X}_2$

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}, \quad (9)$$

при их соответствии критерию приемлемости.

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_{абс}, \quad (10)$$

где  $CD_{абс}$  – абсолютное значение критической разности, мкг/кг, рассчитываемое по формуле

$$CD_{абс} = 0,01 \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (11)$$

где  $CD$  – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 4, %.

#### 14.4 Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

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

Каждая из двух лабораторий проводит измерения согласно разделу 10 и получает результаты измерений  $\bar{X}_1$  или  $\bar{X}_2$ , рассчитанные по результатам измерений двух параллельных проб одного образца, обеспечивая контроль повторяемости согласно разделу 12.

Вычисляют среднее арифметическое  $\bar{\bar{X}}$ , мкг/кг, результатов измерений  $\bar{X}_1$  и  $\bar{X}_2$ , выполненных двумя лабораториями, по формуле

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\bar{X}_1 + \bar{X}_2}{2}. \quad (12)$$

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

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq CD_R, \quad (13)$$

то оба окончательных результата, полученные двумя лабораториями, считаются приемлемыми, и общее среднее значение  $\bar{\bar{X}}$ , вычисленное по формуле (12), может быть использовано в качестве заявляемого результата.

Абсолютное значение критической разности  $CD_R$ , мкг/кг, вычисляют по формуле

$$CD_R = 0,01 \cdot k \cdot CD \cdot \bar{\bar{X}}, \quad (14)$$

где  $k$  – коэффициент, равный 1,6;

$CD$  – относительное значение критической разности, приведенное в таблице 4, %;

$\bar{\bar{X}}$  – среднее арифметическое значение результатов измерений, выполненных в двух лабораториях, мкг/кг.

При превышении значения критической разности для разрешения различий между результатами, полученными двумя лабораториями, используют процедуры, указанные в разделе 5 СТБ ИСО 5725-6.

**Таблица 4 – Относительные значения предела повторяемости, критической разности и норматива контроля правильности**

Матрицы	Предел повторяемости г, %	Критическая разность CD, %	Норматив контроля правильности К <sub>отн.</sub> , %
Мясо, печень, почки продуктивных животных, объекты аквакультуры животного происхождения и пищевая продукция, их содержащая,	24	23	16
Молоко, жидкие и восстановленные сухие молочные и составные молочные продукты, побочные продукты переработки молока, молочная продукция для питания детей раннего возраста и молочные смеси	19	23	16
Молочные и составные молочные продукты плотной консистенции, мороженое на молочной основе, концентрированное и сгущенное молоко, яйца и яйцепродукты, пчелиный мед	21	23	17
Животные жиры и пищевая продукция их содержащая	22	23	16
Комбикорма и кормовые добавки	21	30	21

## 14.5 Контроль правильности

### 14.5.1 Образцы для контроля правильности

Контроль правильности определения массовой доли колистина производится путем определения массовой доли колистина в образцах для контроля (ОК) с заранее известным значением массовой доли антибиотика (рабочая проба с добавкой).

Контроль правильности проводится с использованием добавок колистина. Спайк-раствор колистина готовят из препарата колистина (массовая доля антибиотика должна быть не менее 98,0 %) или используют спайк-препарат, поставляемый в составе тест-системы по запросу. Неопределенность приписанного значения массовой доли колистина в ОК не должна превышать одной трети от значения неопределенности результата измерений.

### 14.5.2 Образцы для контроля, представляющие собой рабочие пробы с добавкой

Данные пробы для контроля представляют собой навеску образца, массовая доля колистина в котором менее предела измерения настоящей методики, в который внесена добавка раствора колистина. Добавку вносят непосредственно в пробирки с (аликвотами) пробами. Значение массовой доли колистина в пробе с добавкой  $X_{add}$ , мкг/кг, вычисляют по формуле

$$X_{add} = \frac{C_{ST} \cdot V_{ST}}{m}, \quad (15)$$

где  $C_{ST}$  – массовая концентрация колистина в добавляемом растворе, мкг/см<sup>3</sup>;  
 $V_{ST}$  – объем добавляемого раствора колистина, см<sup>3</sup>;  
 $m$  – масса навески пробы, кг.

Величина массовой доли колистина в пробе с добавкой должна находиться в пределах от 10 % до 50 % верхней границы диапазона измерений методики.

Для внесения добавки используют готовый спайк-раствор колистина, поставляемый в составе тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин» или раствор, приготовленный из коммерческого препарата с чистотой колистина не менее 98 %, при условии, что относительная стандартная неопределенность добавленной массовой доли не превышает 4 %.

### 14.5.3 Проведение контрольной процедуры

Получают результаты измерений ОК в соответствии с требованиями раздела 10.

За результат контрольного измерения принимают результат измерения массовой доли колистина  $\bar{X}_K$  в ОК, мкг/кг, рассчитанный по формуле (5), при выполнении условия повторяемости по разделу 12.

Критерием приемлемости является условие

$$|\bar{X}_K - X_{add}| \leq 0,01 \cdot K_{отн.} \cdot X_{add}, \quad (16)$$

где  $X_{add}$  – значение массовой доли добавленного колистина в ОК, мкг/кг;  
 $K_{отн.}$  – относительный норматив контроля правильности, %, приведенный в таблице 4.

При невыполнении данного условия контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (16) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, принимают меры по их устранению и затем проводят контрольную процедуру.

## 14.6 Контроль стабильности результатов измерений с применением контрольных карт Шухарта

С помощью КК Шухарта контролируют следующие показатели точности:

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

Подготовка и оформление исходных данных, расчеты параметров КК, ведение, управление и интерпретация КК должны осуществляться в соответствии с требованиями [9] и СТБ ИСО 5725-6, раздел 6.

Для проверки стабильности соответствия результатов измерений показателям повторяемости, установленным настоящей методикой, применяются КК с заданными стандартными значениями. В этом случае для построения КК используют показатели повторяемости в соответствии с таблицей 1.

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

Для построения и ведения Recovery-карт в качестве ОК могут использоваться рабочие образцы.

Для построения и ведения Recovery-карт используются ОК, представляющие собой рабочие пробы с добавками спайк-препарата колистина. Предварительно установленная массовая доля колистина в данных пробах без добавки должна быть менее предела измерения настоящей методики. Рекомендуется вносить добавку колистина в образцы для контроля на уровне массовых долей в рабочих пробах в пределах от 10 % до 60 % верхней границы диапазона измерений методики.

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

Рассчитывают значения центральной линии,  $d_2 \cdot \sigma_r$ , %, предупреждающих границ  $UCL_1$ , %, и границ регулирования  $UCL_2$ , %, по следующим формулам

$$d_2 \cdot \sigma_r = 1,128 \cdot \sigma_r, \quad (17)$$

$$UCL_1 = D_2^1 \cdot \sigma_r = 2,834 \cdot \sigma_r, \quad (18)$$

$$UCL_2 = D_2^2 \cdot \sigma_r = 3,686 \cdot \sigma_r, \quad (19)$$

где  $\sigma_r$  – относительное стандартное отклонение повторяемости, %, приведенное в таблице 1.

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

Ведение КК предусматривает набор данных  $X_1$ ,  $X_2$  при выполнении испытаний ОК в условиях повторяемости в полном соответствии с методикой, расчета фактических относительных значений размаха  $W$ , %, оформлении листа данных КК и нанесения данных на КК.

Относительное значение размаха  $W$ , %, вычисляют по следующей формуле

$$W = \frac{200 \cdot |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2}, \quad (20)$$

где  $X_1$ ,  $X_2$  – значения результатов измерений, полученных в условиях повторяемости, мкг/кг.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [9].

Оценку стандартного отклонения повторяемости  $S_r$  за контролируемый период вычисляют по формуле

$$S_r = \frac{\sum_{i=1}^N W_i / N}{d_2}, \quad (21)$$

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

$d_2$  – коэффициент,  $d_2 = 1,128$ .

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

Рассчитывают значение центральной линии  $\overline{Rec}$ , %, по формуле

$$\overline{Rec} = \frac{\sum_{i=1}^N Rec_i}{N}, \quad (22)$$

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

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

$$Rec_i = \frac{X_i}{X_{add}} \cdot 100, \quad (23)$$

где  $X_i$  – массовая доля колистина в пробе с добавкой, полученная при  $i$ -ом измерении, мкг/кг;

$X_{ad}$  – рассчитанное по формуле (15) значение массовой доли колистина в пробе с добавкой, мкг/кг.

Рассчитывают значение верхней предупреждающей границы  $UCL_1$ , %, и нижней предупреждающей границы  $LCL_2$ , %

$$UCL_1 = \overline{Rec} + 2 \cdot S_{REC}, \quad LCL_1 = \overline{Rec} - 2 \cdot S_{REC}, \quad (24)$$

Рассчитывают значение верхней границы регулирования  $UCL_1$ , %, и нижней границы регулирования  $LCL_2$ , %

$$UCL_2 = \overline{Rec} + 3 \cdot S_{REC}, \quad LCL_2 = \overline{Rec} - 3 \cdot S_{REC}, \quad (25)$$

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

$$S_{REC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\overline{Rec} - Rec_i)^2}{N - 1}}. \quad (26)$$

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

Ведение КК предусматривает набор данных единичных измерений  $X_i$  при выполнении испытаний ОК в соответствии с методикой, расчета фактических значений коэффициента извлечения  $Re c_i$  по формуле (23), оформлении листа данных КК и нанесения данных на КК.

Интерпретация данных КК осуществляется в соответствии с [9].

**Приложение А**  
**(Справочное)**  
**Метрологические характеристики средств измерений**

**Таблица А.1 – Метрологические характеристики дозаторов**

Диапазон показаний объемов дозирования, мм <sup>3</sup>	Диапазон измерения объемов дозирования, мм <sup>3</sup>	Номинальный объем дозы, мм <sup>3</sup>	Пределы допускаемого относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального, %	Предел допускаемого относительного среднего квадратического отклонения фактического объема дозы при доверительной вероятности P=0,95, %	Дискретность установки объема дозы, мм <sup>3</sup>
<b>Акура manual 825</b>					
от 10,0 до 100,0	10,0	±2,5	3,0	0,1	
	50,0	±2,0	2,5		
	100,0	±1,5	2,0		
от 100 до 1000	100	±1,5	2,0	1	
	500	±1,0	1,0		
	1000	±1,0	1,0		
<b>Акура manual 835</b>					
от 1000 до 10000	1000	±2,0	1,0	10	
	5000	±1,1	1,0		
	10000	±1,0	1,0		
<b>Акура manual 855</b>					
от 40,0 до 350,0	40,0	±2,0	3,0	0,4	
	175,0	±1,5	2,0		
	350,0	±1,5	2,0		

## Приложение Б

### (Справочное)

#### Состав тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин»

Таблица Б.1 – Состав тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин»

Компонент тест-системы	Количество в комплекте, шт.
1 Иммуносорбент (микропланшет)	1
2 Конъюгат, 50-кратный концентрат	1
3 Раствор для разведения конъюгата	1
4 Градуировочные растворы колистина	6
5 Раствор А, 4-кратный концентрат	1
6 Раствор А <sub>1</sub>	1
7 Раствор Б	1
8 Раствор В для разведения экстрактов	1
9 Моющий буфер, 10-кратный концентрат	1
10 Хромоген-субстратный раствор	1
11 Стоп-реагент	1
<b>Примечания</b>	
1 По усмотрению изготовителя в состав тест-системы могут быть включены два отдельных вспомогательных компонента для получения хромоген-субстратной смеси: – хромоген (раствор ТМБ; 3,3',5,5'-тетраметилбензидин), прозрачная бесцветная жидкость; – субстратный буферный раствор, прозрачная бесцветная жидкость.	
2 По усмотрению изготовителя конъюгат может поставляться в виде готового для употребления компонента (прозрачная бесцветная или окрашенная жидкость) при этом тест-система не комплектуется раствором для разведения конъюгата.	
3 По усмотрению изготовителя может поставляться спайк-препарат колистина для оценки извлечения внесенной добавки (тест на открытие) в виде лиофилизата (лиофилизированный препарат без признаков слипания и склеивания) или раствора (прозрачная бесцветная или с незначительным желтым оттенком жидкость).	

## Библиография

- [1] Правила разработки и применения методик (методов) измерений, утвержденные постановлением Госстандарта от 23 апреля 2021 г. № 44
- [2] Методические рекомендации по оформлению методик (методов) измерений, утвержденные постановлением Госстандарта от 01.06.2021 № 61
- [3] Положение о допуске единиц величин к применению в Республике Беларусь, утвержденное Постановлением Совета министров Республики Беларусь
- [4] VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data, V.J. Barwick, and S.I.R. Ellison, LGC/VAM/1998/088  
(Проект VAM 3.2.1 Развитие и гармонизация принципов неопределенности измерений. Часть (d): Протокол для оценки неопределенности по данным валидации)
- [5] Отчет об экспериментальных исследованиях метрологических характеристик методики измерений «Массовая доля колистина в продовольственном сырье и пищевой продукции животного происхождения, комбикормах и кормовых добавках. Методика измерений методом ИФА с использованием тест-системы ПРОДОСКРИН ИФА-Колистин»
- [6] Eurachem Guide «The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Second edition, 2014  
(Руководство Еврахим «Пригодность для использования аналитических методов. Руководство для лабораторий по валидации методов и сопутствующим вопросам», второе издание, 2014)
- [7] ТУ 2631-00305807999-98 н-Гексан химически чистый
- [8] ТУ ВУ 100185129.198-2023 Тест-система для определения колистина методом иммуноферментного анализа «ПРОДОСКРИН® ИФА-Колистин»
- [9] ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта

