

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И
ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ (РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)**

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
Всероссийский государственный центр качества и
стандартизации лекарственных средств для животных и кормов
ФГБУ «ВГНКИ»

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ВГНКИ»

«10» марта 2013 г.

А.Н. Панин



ОТЧЕТ

о результатах межлабораторных сравнительных испытаний по определению антибиотиков
тетрациклиновой группы в сухом молоке

МОСКВА 2013

Результаты сравнительных испытаний, по определению антибиотиков тетрациклиновой группы в сухом молоке.

Шесть образцов сухого молока для исследования на остаточные количества антибиотиков тетрациклиновой группы были разосланы в 31 лабораторию. Одна лаборатория результатов не представила.

Подготовка образцов

Сухое молоко, содержащее остаточные количества тетрациклина и окситетрациклина было расфасовано в ампулы по 11 г в каждой. Эти образцы были проанализированы на гомогенность в лаборатории ВГНКИ аттестованным арбитражным ВЭЖХ-МС/МС методом [1].

Таблица №1.

Результаты проведенного в ВГНКИ анализа образцов арбитражным ВЭЖХ-МС/МС методом [1]

№ образца	1	2**	3	4	5**	6
Концентрация тетрациклина, мкг/кг	25,0	<0,1*	14,9	19,6	<0,1	9,0
СКВО для тетрациклина, мкг/кг	3,4	–	2,0	2,6	–	3,1
Концентрация окситетрациклина, мкг/кг	15,0	<0,1	9,0	<0,1	<0,1	<0,1
СКВО для окситетрациклина, мкг/кг	2,1	–	3,0	-	–	-
Суммарная концентрация, мкг/кг	40,0	<0,1	23,9	19,6	<0,1	9,0
Суммарное СКВО, мкг/кг	4	–	3,6	2,6	–	3,1

СКВО - среднеквадратическое отклонение погрешности результатов испытаний, регламентированное в арбитражном методе.

* - предел обнаружения арбитражного метода

** - контрольные образцы, не содержащие антибиотиков тетрациклиновой группы

Результаты сравнительных испытаний

Лаборатории № 2, 3, 4, 11, 19, 21, 22 использовали подтверждающий метод ВЭЖХ-МС\МС и представили данные по отдельным антибиотикам тетрациклиновой группы.

Лаборатории №№ 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 использовали скрининговый метод ИФА и представили результаты суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы, что согласуется с методологией используемого метода, не позволяющего идентифицировать конкретные антибиотики.

Результаты ИФА и ВЭЖХ-МС\МС обрабатывались отдельно. Для каждого участника по каждому образцу и каждому антибиотику (если его конкретный вид был определен) согласно [2] был вычислен Z-индекс по формуле:

$$Z = (X-m)/\sigma,$$

где X – средняя концентрация антибиотика (средняя суммарная концентрация антибиотиков в случае ИФА), определенная лабораторией; m – значение концентрации, определенное аттестованным арбитражным методом; σ – среднее квадратическое отклонение погрешности результатов испытаний, регламентированное в арбитражном методе [1]. Результат считается удовлетворительным, если $|Z| \leq 3$.

Для оценки качества работы лаборатории в целом, согласно методологии, приведенной в РМГ 58-2003 [2], вычислялась сумма квадратов Z-индексов.

1. Результаты сравнительных испытаний подтверждающим (арбитражным) методом ВЭЖХ МС\МС

Лаборатории 2, 3, 4, 11, 19, 21, 22 использовали подтверждающий метод ВЭЖХ-МС\МС и представили данные по отдельным антибиотикам тетрациклиновой группы. Сводные результаты определения представлены в табл. 2.

Таблица №2

Лаборатории, правильно ($|Z| \leq 3$) определившие концентрации антибиотиков тетрациклиновой группы в образцах подтверждающим методом ВЭЖХ МС\МС. Общее количество участвовавших лабораторий - 7

№ образца	Кол-во лабораторий, правильно определивших концентрацию тетрациклина	№ лабораторий	Кол-во лабораторий, правильно определивших концентрацию Окситетрациклина	№ Лабораторий
1	7	2,3,4,11,19,21,22	6	2,3,4,19,21,22
2 (бланк)	7	2,3,4,11,19,21,22	7	2,3,4,11,19,21,22
3	0	-	7	2,3,4,11,19,21,22
4	0	-	7	2,3,4,11,19,21,22
5 (бланк)	7	2,3,4,11,19,21,22	7	2,3,4,11,19,21,22
6	7	2,3,4,11,19,21,22	7	2,3,4,11,19,21,22

Ни одна из этих лабораторий не представила ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Результаты определения участниками антибиотиков в образцах подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС представлены в сводных таблицах и на гистограммах.

Результаты определения тетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС в образце №1 представлены в таблице 3.1 и на гистограмме 3.1.

Результаты определения окситетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС в образце №1 представлены в таблице 3.2 и на гистограмме 3.2.

Результаты определения тетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС в образце №3 представлены в таблице 4.1 и на гистограмме 4.1.

Результаты определения окситетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС в образце №3 представлены в таблице 4.2 и на гистограмме 4.2.

Результаты определения тетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС в образце №4 представлены в таблице 5.1 и на гистограмме 5.1.

Результаты для образца №6 по определению тетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС представлены в таблице 6.1 и на диаграмме 6.1.

Таблица № 3.1
 Образец № 1. Сводные результаты участников, использовавших подтверждающий метод ВЭЖХ-МС/МС
 Определение тетрациклина

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
2	27.1	0.62
3	21.3	-1.09
4	22	-0.88
11	21.75	-0.96
19	21.1	-1.15
21	26	0.29
22	22.6	-0.71

Гистограмма №3.1.
 Образец № 1. Распределение результатов определения тетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС

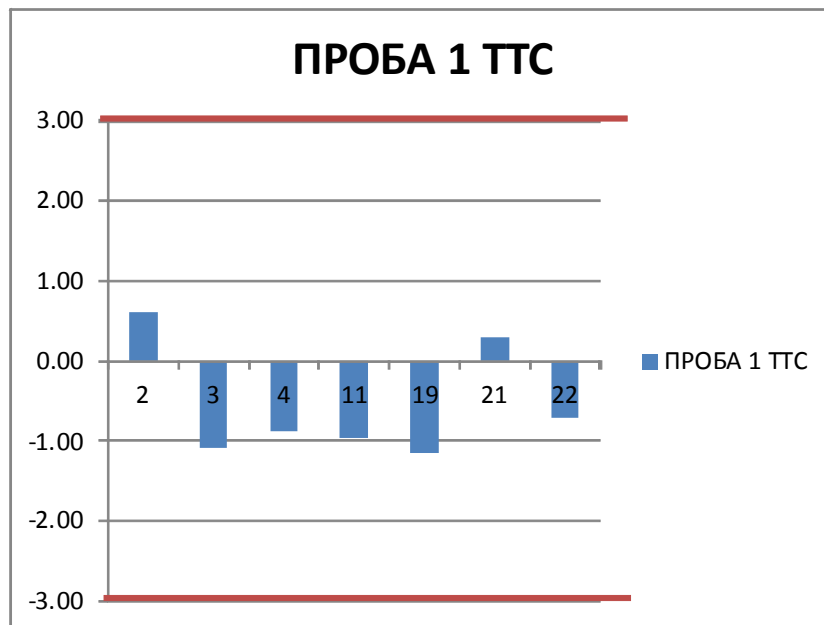


Таблица № 3.2
 Образец № 1. Сводные результаты участников, использовавших подтверждающий метод ВЭЖХ-МС/МС.
 Определение окситетрациклина

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
2	16.4	0.67
3	12.45	-1.21
4	13	-0.95
11	9.84	-2.46
19	13.6	-0.67
21	13	-0.95
22	11.7	-1.57

Гистограмма № 3.2
 Образец № 1. Распределение результатов определения окситетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС

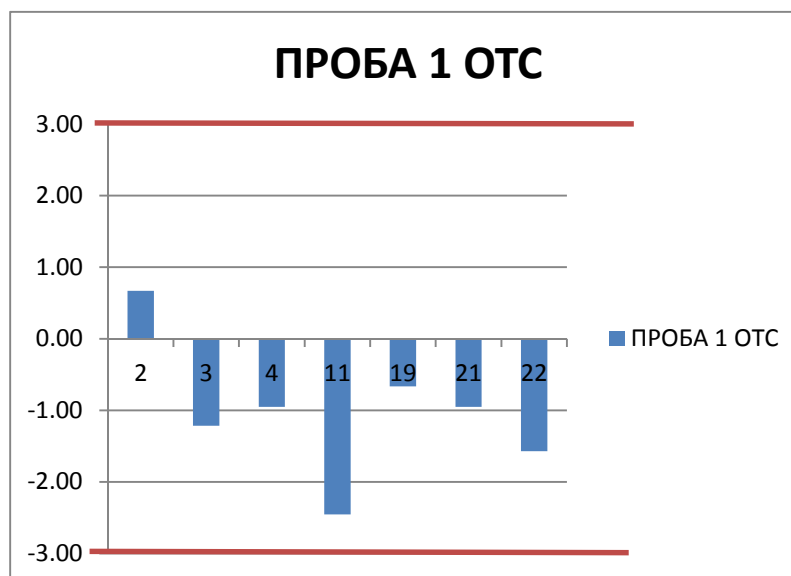


Таблица № 4.1.
 Образец № 3. Сводные результаты участников, использовавших подтверждающий метод ВЭЖХ-МС/МС
 Определение тетрациклина.

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
2	10.4	-2.25
3	6.94	-3.98
4	9	-2.95
11	9.88	-2.51
19	7.2	-3.85
21	9	-2.95
22	9.8	-2.55

Гистограмма № 4.1
 Образец № 3. Распределение результатов определения тетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС

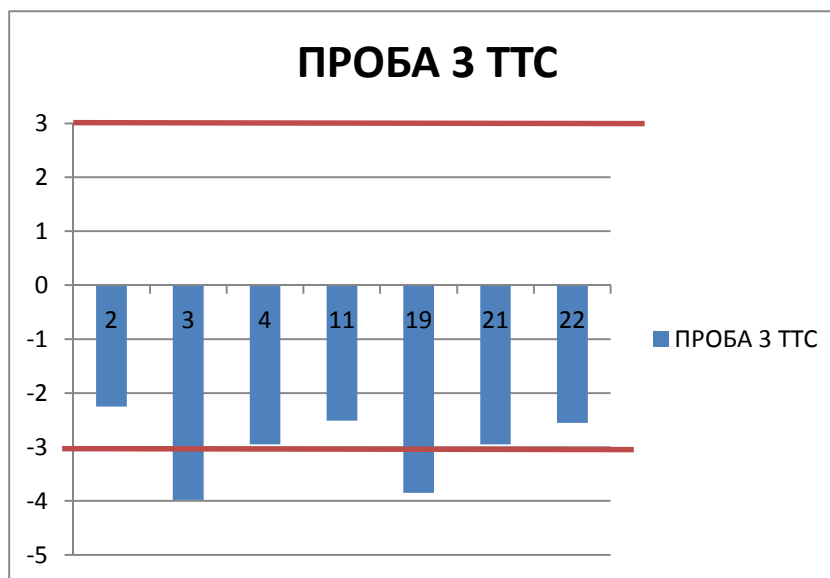


Таблица № 4.2
 Образец № 3. Сводные результаты участников, использовавших подтверждающий метод ВЭЖХ-МС/МС
 Определение окситетрациклина.

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
2	6.5	-0.83
3	4.63	-1.46
4	6	-1.00
11	7.13	-0.62
19	6.6	-0.80
21	5.7	-1.10
22	5.1	-1.30

Гистограмма № 4.2
 Образец № 3. Распределение результатов определения окситетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС.

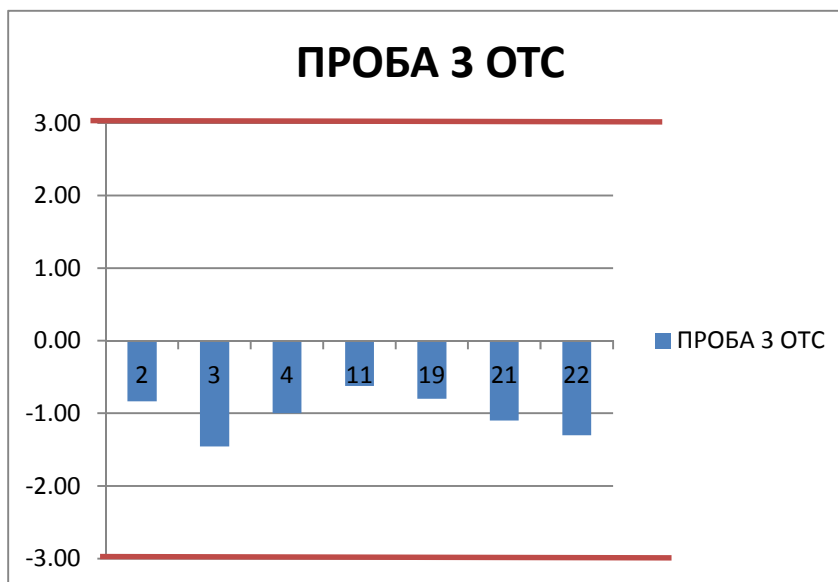


Таблица № 5.1
 Образец № 4. Сводные результаты участников, использовавших подтверждающий метод ВЭЖХ-МС/МС
 Определение тетрациклина

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
2	12	-2.92
3	10.03	-3.68
4	12	-2.92
11	13.25	-2.44
19	11.6	-3.08
21	12	-2.92
22	10.9	-3.35

Гистограмма № 5.1
 Образец № 4. Распределение результатов определения тетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС

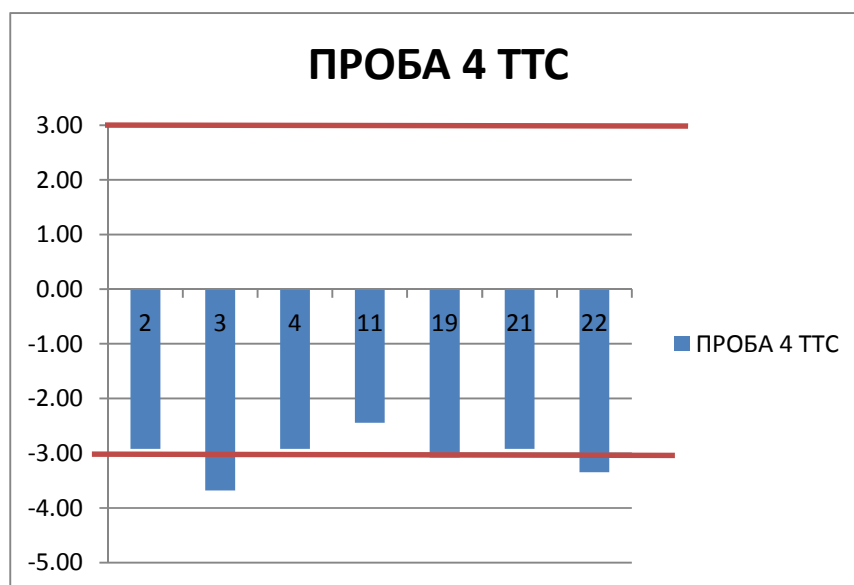


Таблица № 6.1
 Образец № 6. Сводные результаты участников, использовавших подтверждающий метод ВЭЖХ-МС/МС
 Определение тетрациклина

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
2	5.3	-1.19
3	8.4	-0.19
4	8	-0.32
11	7.75	-0.40
19	7.5	-0.48
21	9	0.00
22	7.4	-0.52

Гистограмма № 6.1
 Образец № 6. Распределение результатов определения тетрациклина подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС

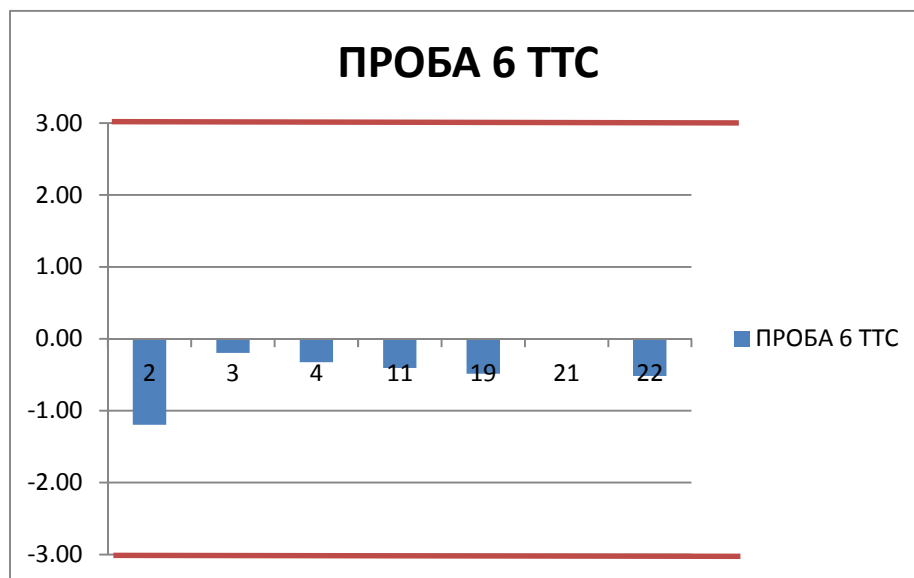


Таблица № 7

Рейтинг участников по результатам межлабораторных сравнительных испытаний подтверждающим методом ВЭЖХ-МС/МС

п\п	№	№ участ-ника	Кол-во выявленных участником антибио-тиков (в образцах № 1,3,4,6)	Кол-во антибиотиков с правильно определенной концентрацией $ Z \leq 3$	Z^2	N**	Допустимо е значение $Z^2 (h_2)$
	1	2	6	6	16.55	6	22.5
	2	21	6	6	19.45	6	22.5
	3	11	6	6	19.77	6	22.5
	4	4	6	6	20.04	6	22.5
	5	22	6	5	22.62	6	22.5
	6	19	6	4	26.92	6	22.5
	7	3	6	4	34.21	6	22.5

2. Результаты сравнительных испытаний скрининговым методом иммуноферментного анализа

Лаборатории № 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 представили количественные результаты суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы, что согласуется с методологией используемого метода (ИФА), не позволяющего идентифицировать конкретные антибиотики.

Для каждого участника по каждому образцу согласно [2] был вычислен Z-индекс по формуле:

$$Z = (X-m)/\sigma,$$

где X – средняя суммарная концентрация антибиотиков, определенная лабораторией;

m – значение концентрации, определенное аттестованным арбитражным методом;

σ – среднеквадратическое отклонение погрешности результатов испытаний, регламентированное в арбитражном методе [1]. Результат считается удовлетворительным, если $|Z| \leq 3$.

Положительные результаты ($|Z| \leq 3$), полученные для концентраций ниже предела обнаружения тест-системы, считали неудовлетворительными.

Таблица № 8

Лаборатории, правильно определившие концентрацию отдельных антибиотиков тетрациклиновой группы в образцах скрининговым методом ИФА ($|Z| \leq 3$).

Общее количество участвовавших лабораторий – 30.

№ образца	Кол-во лабораторий, правильно определивших концентрацию антибиотиков тетрациклиновой группы	Номера лабораторий
1	24	1,5,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17,18,20,21,23,24,25,26,27,28,29,30
2(бланк)	21	1,5,6,8,9,10,12,13,14,15,16,17,18,20,21,24,25,26,27,28,29
3	21	1,5,7,8,9,10,12,13,16,17,18,20,21,23,24,25,26,27,28,29,30
4	20	1,7,8,10,12,13,15,16,17,18,20,21,23,24,25,26,27,28,29,30
5(бланк)	17	1,5,6,8,9,10,12,14,15,16,20,21,24,25,26,27
6	16	1,7,10,12,13,16,17,18,21,23,25,26,27,28,29,30

Таблица № 9.

Лаборатории, представившие ложноположительные результаты при определении антибиотиков методом ИФА. Общее количество участвовавших лабораторий –30.

№ образца	Количество лабораторий	№№ лабораторий
2	3	7, 23, 30
5	7	7,13,17,18,23,29

Таблица № 10.

Лаборатории, представившие ложноотрицательные результаты при определении суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы методом ИФА.

Общее количество участвовавших лабораторий - 30.

№ образца	Количество лабораторий	№ лаборатории
1	0	-
3	3	6,14,15
4	4	5,6,9,14
6	8	5,6,8,9,14,15,20,24

Сводные результаты участников представлены в таблицах № 11, 12, 13, 14 и на гистограммах № 11, 12, 13, 14.

Образец № 1. Сводные результаты участников, использовавших скрининговый метод ИФА.

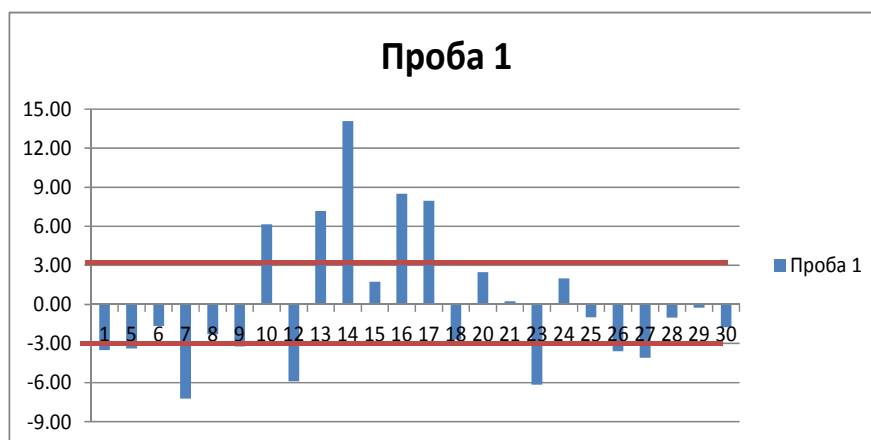
Таблица № 11
 Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
1	26	-3.50
5	26.5	-3.38
6	33.4	-1.65
7	11.09	-7.23
8	30.8	-2.30
9	27.1	-3.23
10	64.6	6.15
12	16.4	-5.90
13	68.74	7.19
14	96.35	14.09
15	47	1.75
16	74	8.50
17	71.8	7.95
18	29.19	-2.70
20	49.94	2.49
21	41	0.25
23	15.4	-6.15
24	48	2.00
25	36.02	-0.99
26	25.62	-3.60
27	23.6	-4.10
28	36	-1.00
29	39.04	-0.24
30	33	-1.75

Гистограмма №11.

Распределение результатов участников, использовавших метод ИФА.

Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в образце №1



Образец № 3. Сводные результаты участников, использовавших скрининговый метод ИФА. Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы

Таблица № 12.

Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
1	18.8	-1.42
5	22	-0.53
7	8.93	-4.16
8	25.1	0.33
9	18.5	-1.50
10	37.5	3.78
12	9.8	-3.92
13	75.25	14.26
16	34	2.81
17	73	13.64
18	15.24	-2.41
20	28.75	1.35
21	15	-2.47
23	7.9	-4.44
24	30	1.69
25	31.24	2.04
26	16.7	-2.00
27	11.8	-3.36
28	15	-2.47
29	18.79	-1.42
30	15	-2.47

Гистограмма № 12.

Распределение результатов участников, использовавших метод ИФА.

Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в образце №3

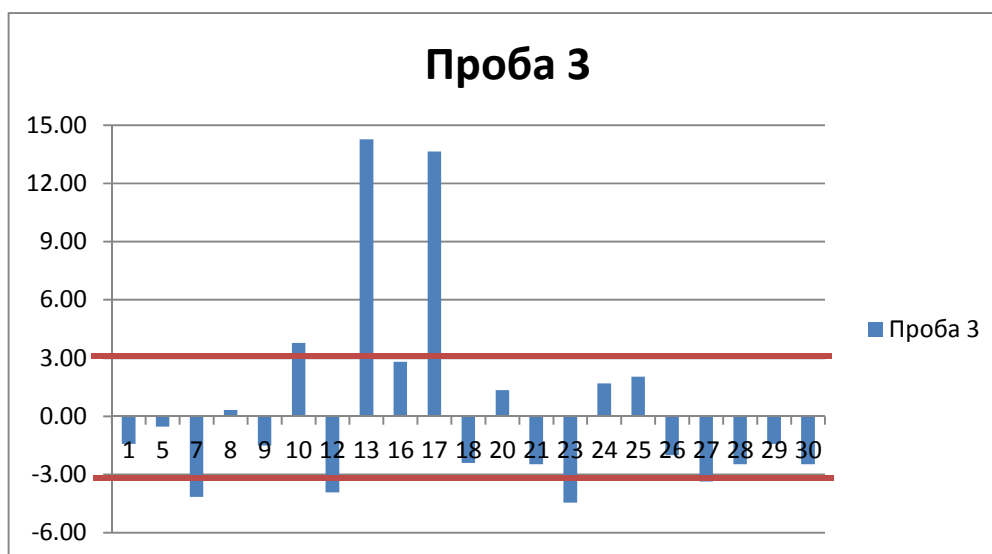


Таблица № 13.

Образец № 4. Сводные результаты участников, использовавших скрининговый метод ИФА. Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы.

Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
1	21.6	0.77
7	3.42	-6.22
8	22.8	1.23
10	23.7	1.58
12	10.7	-3.42
13	60.2	15.62
15	16	-1.38
16	59	15.15
17	59.9	15.50
18	19.99	0.15
20	30.06	4.02
21	11.4	-3.15
23	7.9	-4.50
24	22	0.92
25	27.71	3.12
26	17.22	-0.92
27	10.3	-3.58
28	16	-1.38
29	22.46	1.10
30	22	0.92

Гистограмма №13

Распределение результатов участников, использовавших метод ИФА. Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в образце №4

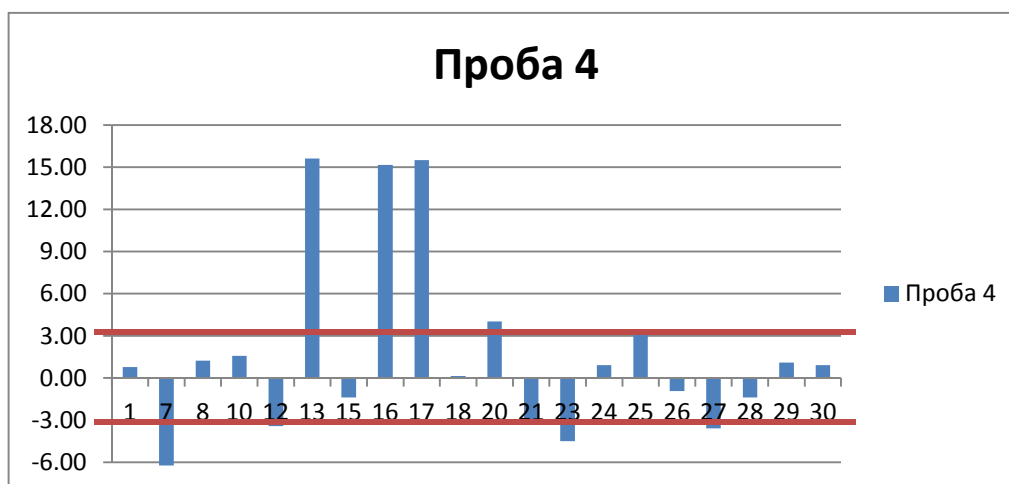


Таблица № 14

Образец № 6. Сводные результаты участников, использовавших скрининговый метод ИФА. Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы.

№ лаборатории	Сред. концентрация, мкг/кг	Z-индекс
1	19.6	3.42
7	3.99	-1.62
10	33	7.74
12	8.3	-0.23
13	45.18	11.67
16	50	13.23
17	50.7	13.45
18	13.28	1.38
21	10.1	0.35
23	8.8	-0.06
25	23.38	4.64
26	7.14	-0.60
27	8.6	-0.13
28	15	1.94
29	19.21	3.29
30	10	0.32

Гистограмма №14.

Распределение результатов участников, использовавших метод ИФА.

Определение суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в образце №6



Таблица №15.
Сводная таблица результатов участников межлабораторных
сравнительных испытаний.
Скрининговый метод ИФА.

№ п/п	№ участника	Количество определенных антибиотиков	Количество правильно определенных антибиотиков ($ Z \leq 3$)	Ложноотрицательные результаты	Ложноположительные результаты	Z^2	N**	Допустимое Значение Z^2
1	28	4	4	0	0	12.78	4	18.5
2	18	4	4	0	1	15.02	4	18.5
3	30	4	4	0	2	10.13	4	18.5
4	21	4	3	0	0	16.25	4	18.5
5	26	4	3	0	0	18.12	4	18.5
6	29	4	3	0	1	14.13	4	18.5
7	8	3	3	1	0	6.92	4	18.5
8	24	3	3	1	0	7.72	4	18.5
9	1	4	2	0	0	26.54	4	18.5
10	25	4	2	0	0	36.39	4	18.5
11	20	3	2	1	0	24.18	4	18.5
12	27	4	1	0	0	40.92	4	18.5
13	12	4	1	0	0	61.92	4	18.5
14	10	4	1	0	0	114.52	4	18.5
15	16	4	1	0	0	484.68	4	18.5
16	15	2	2	2	0	4.98	4	18.5
17	23	4	1	0	2	77.83	4	18.5
18	7	4	1	0	2	110.87	4	18.5
19	6	1	1	3	0	2.72	4	18.5
20	5	2	1	2	0	11.67	4	18.5
21	9	2	1	2	0	12.65	4	18.5
22	13	4	0	0	1	635.13	4	18.5
23	17	4	0	0	1	670.42	4	18.5
24	14	1	0	3	0	198.46	4	18.5

** - N- число Z-индексов

Заключение по результатам определения содержания антибиотиков тетрациклиновой группы в сухом молоке участниками межлабораторных сравнительных испытаний

Проверка качества работы лабораторий в целом проводилась согласно методологии, приведенной в РМГ 58-2003 «Оценка качества работы испытательной лаборатории пищевых продуктов и продовольственного сырья» [2].

При этом было установлено, суммы квадратов Z-индексов для всех участников превышают соответствующие значения h_2 . Оценка участников проводилась на основании рейтинга. При составлении рейтинга учитывалась совокупность показателей: количество правильно определенных антибиотиков (результат считался удовлетворительным, если значение Z-индекса было $|Z| \leq 3$ [2]), количество ложноотрицательных результатов, количество ложноположительных результатов.

Лаборатории № 2, 3, 4, 11, 19, 21, 22 использовали подтверждающий метод ВЭЖХ-МС/МС и представили данные по отдельным антибиотикам тетрациклиновой группы. В таблице № 7 лаборатории расположены в соответствии с рейтингом полученных результатов.

Лучший результат показал участник № 2, он сумел правильно ($|Z| \leq 3$) определить концентрации антибиотиков, не имел ложноотрицательных результатов и ложноположительных результатов.

Участники № 21, 11, 4 также выступили успешно.

Участник № 22 сумел правильно ($|Z| \leq 3$) определить концентрации 5 антибиотиков из 6 и в одном случае получил немного заниженный по концентрации результат.

Участники № 19 и 3 сумели правильно ($|Z| \leq 3$) определить концентрации 4 антибиотиков из 6.

Следует отметить, что никто из этой группы участников не получил ни ложноотрицательных результатов, ни ложноположительных результатов.

Участники № 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 использовали скрининговый метод ИФА и представили результаты суммарного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы, что согласуется с методологией используемого метода, не позволяющего идентифицировать конкретные антибиотики.

В таблице № 15 лаборатории расположены в соответствии с рейтингом полученных результатов. Лучший результат показал участник № 28. Он сумел выявить антибиотики в 4 образцах, правильно количественно ($|Z| \leq 3$) определить концентрации 2 антибиотиков из выявленных, не имел ложноотрицательных результатов.

Участники № 18 и 30 в целом выступили успешно, однако получили ложноположительные результаты.

Значительное количество участников показало ложноотрицательные результаты при испытаниях образца №6.

Метод иммуноферментного анализа может применяться только как скрининговый метод для обнаружения суммарных концентраций антибиотиков и требует обязательного подтверждения полученных результатов арбитражным методом ВЭЖХ-МС/МС.

Литература

1. ГОСТ Р 53601 – 2009 "Метод определения остаточного содержания антибиотиков тетрациклиновой группы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором"
2. РМГ 58-2003. «Оценка качества работы испытательной лаборатории пищевых продуктов и продовольственного сырья. Методика внешнего контроля точности результатов испытаний».
3. **Протокол FAPAS.** www.fapas.com/fapas-protocol.cfm
4. Analyst. 2001. 126: 1414 – 1417.
5. Pure Appl. Chem. 2006. 18 (1): 145-196.