**Процедура 2 раздела 12 Руководства ICAR — Руководство по применению сертифицированного ОИЦ EC стандартного образца для подсчета соматических клеток в молоке**

Раздел 12. Процедура 2. Применение стандартного образца для ПСК в молоке.

Версия 1.0, июнь 2021 г.

Ссылка: C:\Users\Cesare\Documents\Section 12 \12 Procedure 2 Application of Reference Material for SCC v21.1.docx

СОДЕРЖАНИЕ

1 Вводная информация 3

2 Описание сертифицированного ОИЦ EC стандартного образца 3

3 Применение сертифицированного ОИЦ EC стандартного образца 3

4 Проверка работоспособности метода 3

5 Проверка/корректировка параметров калибровки стандартными методами. 4

5.1 Проверка надлежащего функционирования стандартного метода 5

5.2 Подготовка набора проб для проверки/корректировки параметров калибровки 5

5.3 Проверка/корректировка параметров калибровки 5

6 Присвоение эталонных значений вторичному стандартному образцу (ВСО) 8

7 Использование в проверке квалификации 9

8 Переход с параметрами калибровки стандартных методов 9

9 Библиография 10

10 Благодарности 11

Сводка изменений

| **Дата изменения** | **Характер изменения** |
| --- | --- |
| Март 2021 г. | Проект представлен Подкомитетом по анализу молока на утверждение. |

1 Вводная информация

Подсчет соматических клеток в молоке (ПСК) является широко используемым показателем для мониторинга здоровья вымени нескольких видов млекопитающих; эта процедура актуальна в рамках соблюдения правил гигиены пищевых продуктов, тестирования оплаты молока, управления хозяйством и программ племенной работы [3]. В феврале 2020 года Объединенный исследовательский центр Европейской комиссии (ОИЦ EC) представил новый сертифицированный стандартный образец (CRM ERM®-BD001) для подсчета соматических клеток в молоке. Этот проект является значимым результатов тесного сотрудничества между Международной молочной федерацией (IDF), Международным комитетом по учету животных (ICAR) и ОИЦ EC в разработке решений и инструментов для продвижения полной эквивалентности при подсчете соматических клеток в молоке.

2 Описание сертифицированного ОИЦ EC стандартного образца

Наборы CRM ERM®-BD001 предоставляются ОИЦ ОК и его авторизованными дистрибьюторами и поставляются в пакетиках, см https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/ERM-BD001. Каждый пакетик содержит два флакона с 14 г коровьего молока, высушенного распылением в атмосфере инертного газа (аргона), ERM®-BD001a с низким ПСК и ERM®-BD001b с высоким ПСК. Если следовать прилагаемым к инструкции протоколам по восстановлению в дважды перегнанной или ультрачистой воде/воде 1 типа качества при температуре 40°C, полученные образцы будут содержать около 60 000 и 1 200 000 клеток/мл соответственно. Заявленные сертифицированные эталонные значения для полученных двух жидких проб основаны на прямом подсчете под микроскопом в соответствии с ISO 13366-1|IDF 148-1 [6] или главой 10 Стандартных методов исследования молочных продуктов [1] и подсчете флюорооптоэлектронным методом в соответствии с ISO 13366-2|IDF 148-2 [7] или главой 11.032 Стандартных методов исследования молочных продуктов [1]. В описании характеристик для первой партии приняли участие в общей сложности тридцать две лаборатории по всему миру. Заявленные сертифицированные эталонные значения следует рассматривать как надежные оценки истинных значений ПСК для этих материалов.

После восстановления образцы можно использовать как таковые, при этом два восстановленных образца также можно смешивать в различных соотношениях, чтобы получить образцы со значениями, лежащими между значениями ПСК, указанными для двух восстановленных образцов. Дополнительную информацию о материалах и их характеристиках можно найти в отчете о сертификации [2], доступном на указанном выше веб-сайте.

3 Применение сертифицированного ОИЦ EC стандартного образца

CRM ERM®-BD001 можно использовать для различных целей, как указано в следующих параграфах.

4 Проверка работоспособности метода

Материалы CRM ERM®-BD001 и их сертифицированные эталонные значения с заявленной информацией об уровне неопределенности могут использоваться для проверки правильности работы метода пользователями как эталонного, так и стандартного метода. При проверке эффективности эталонного метода должны использоваться заявленные сертифицированные эталонные значения и соответствующая информация об уровне неопределенности, основанная на принятых наборах данных эталонного метода. Эти заявленные значения основаны исключительно на принятых результатах измерений, соответствующих стандарту ISO 13366-1|IDF 148-1 [6]. При проверке эффективности стандартного метода рекомендуется работать со значениями, основанными на объединенном 50/50 пуле данных, полученном на основе наборов данных эталонного метода и произвольно выбранных наборов данных стандартного метода. Эти присвоенные значения имеют меньший уровень неопределенности.

Перед проверкой эффективности метода с материалами CRM ERM®-BD001 следует убедиться в надлежащей работоспособности метода. Для эталонного метода это означает выполнение требований в отношении правильных размеров поля микроскопа и воспроизводимости. Для общепринятого стандартного метода с флуорооптоэлектронным подсчетом это означает выполнение требований в отношении холостых проверок, эффекта переноса, эффекта линейности, других специфичных для метода критических аспектов и повторяемости. Руководство см. в ISO 13366-2|IDF 148-2 [7].

Для проверки работоспособности метода может быть применена процедура согласно отчету о сертификации [2]:

a. Провести измерения каждой пробы как минимум в двух повторностях и рассчитать среднее измеренное значение *y̅* *i*.

b. Рассчитать для каждой пробы абсолютную разницу ∆ *i.meas* между *y̅i* и сертифицированным значением x*i,CRM*:

∆*i.meas* = |*y̅i* - x*i,CRM*| (1)

c. Объединить уровень неопределенности измерения, ui,meas для *y̅* *i* с уровнем неопределенности сертифицированного значения ui,CRM согласно сертификату:

(2)

d. Рассчитать расширенный уровень неопределенности Ui,∆ на основе совокупной неопределенности ui,∆ с использованием применимого коэффициента охвата, соответствующего доверительному уровню приблизительно 95 %:

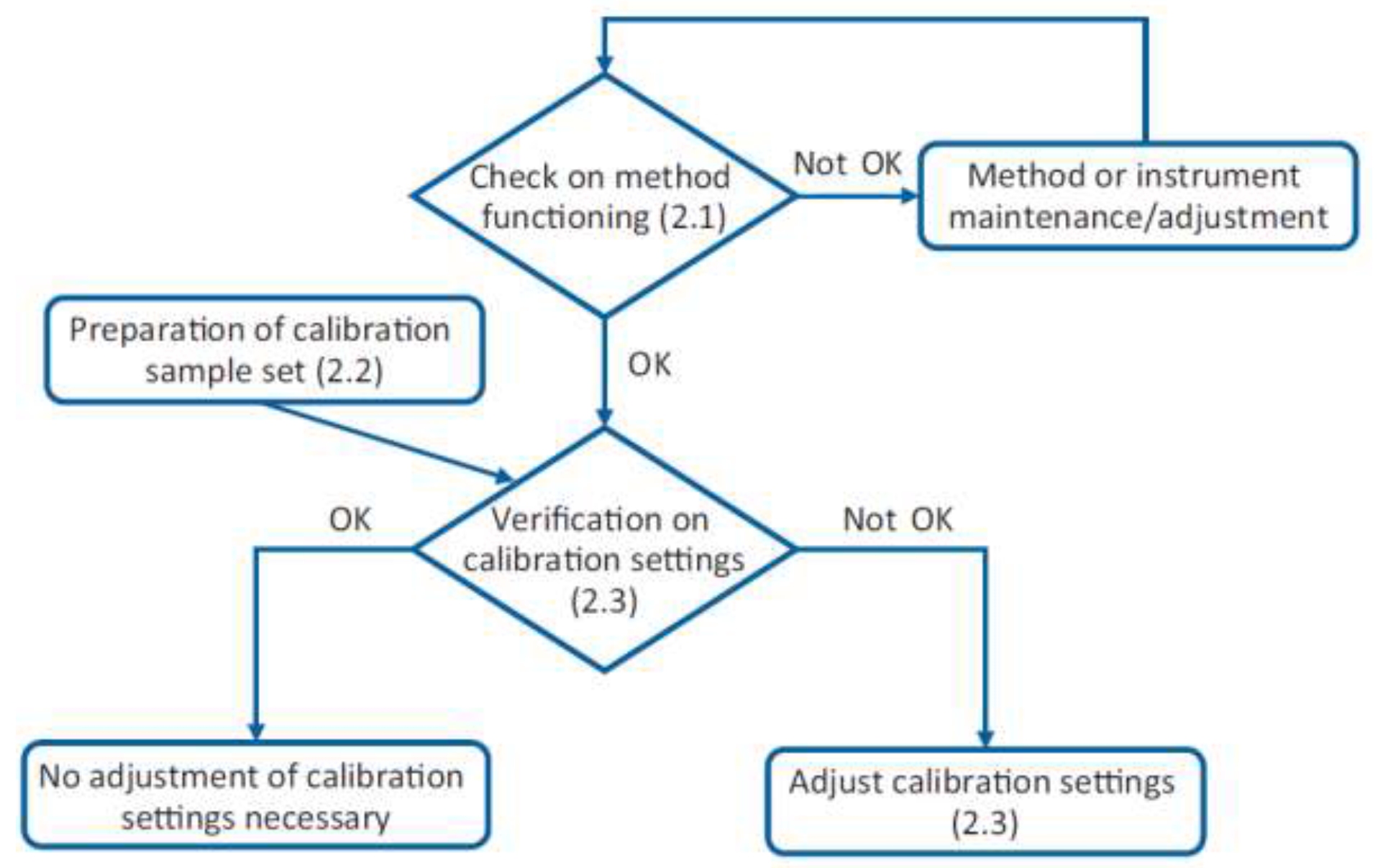
Ui,∆ = 2 \* ui,∆ (3)

e. Если ∆ *i,meas* ≤ *Ui,∆*, то нет существенной разницы между результатом измерения и сертифицированным значением при доверительном уровне приблизительно 95 %.

5 Проверка/корректировка параметров калибровки стандартными методами.

Крупномасштабный подсчет соматических клеток основан на применении стандартных методов, таких как флюорооптоэлектронный подсчет. Результаты применения этих методов могут различаться для разных методов, разных лабораторий, разных приборов и в разные периоды времени. Таким образом, важно правильно откалибровать стандартные методы по эталону и периодически проверять правильность параметров калибровки. Если результаты прямого микроскопического эталонного метода подсчета соматических клеток имеют ограниченную прецизионность, стабильной и надежной альтернативой может служить набор калибровочных образцов, приготовленный на основе материалов CRM ERM®-DB001 с указанными эталонными значениями.

Рекомендуется следовать многоэтапной процедуре в соответствии с рисунком 1.



Проверка работы метода (2.1)

Не удовл.

Ведение/регулировка метода или прибора

Подготовка набора калибровочных образцов (2.2)

Удовл.

Не удовл.

Проверка настроек калибровки (2.3)

Удовл.

Не требуется корректировка настроек калибровки

Отрегулировать настройки калибровки (2.3)

Рисунок 1. Блок-схема, показывающая проверку настроек калибровки стандартных методов.

5.1 Проверка надлежащего функционирования стандартного метода

Перед проверкой настроек калибровки стандартного метода следует убедиться в том, что стандартный метод работает должным образом и соответствует требованиям в отношении холостых проверок, эффекта переноса, других специфичных для метода критических аспектов и повторяемости. Дополнительные указания по таким проверкам с применением флюорооптоэлектронных счетчиков см. в ISO 13366-2|IDF 148-2 [7].

5.2 Подготовка набора проб для проверки/корректировки параметров калибровки

Набор образцов для проверки/корректировки настроек калибровки стандартного метода можно подготовить путем смешивания восстановленного материала образца из ERM®-BD001a и ERM®-BD001b в различных соотношениях в соответствии с протоколами инструкций, прилагаемых к материалам. В результате будет получена выборка как минимум с пятью уровнями количества клеток и с равноудаленным распределением от сертифицированного эталонного значения ERM®-BD001a до сертифицированного эталонного значения ERM®-BD001b. Рекомендация использовать заявленные эталонные значения, основанные на объединенном (50/50) пуле данных, полученном на основе наборов данных эталонного метода и произвольно выбранных наборов данных стандартного метода [2], соответствует руководству в ISO 13366-2|IDF 148- 2 [7] по использованию подходящих калибровочных материалов. Эталонное значение для каждого образца может быть рассчитано на основе относительного количества ERM®-BD001a и ERM®-BD001b в каждом образце. Полученный набор образцов позволяет проверить и, при необходимости, скорректировать настройки калибровки в соответствии с рекомендациями ISO 13366-2|IDF 148-2 [7] и ISO 8196-2|IDF 128-2 [5], см. следующий абзац.

5.3 Проверка/корректировка параметров калибровки

ПРИМЕЧАНИЕ 1

Подход, представленный в этом параграфе, основан на обычной регрессионной модели наименьших квадратов с обязательным условием приблизительного постоянства в распределении остатков по всему диапазону калибровки. В противном случае следует преобразовать данные так, чтобы остаточная дисперсия была распределена равномерно по всему диапазону. Исходя из опыта, хорошим вариантом для этого может быть преобразование квадратного корня.

ПРИМЕЧАНИЕ 2

При работе с сертифицированными стандартными образцами предполагается, что погрешность расчетных эталонных значений для образцов в наборе градуировочных образцов пренебрежимо мала. Таким образом, рассчитанные эталонные значения должны быть нанесены на ось х, а средние значения стандартных методов — на ось у. Отмечается, что это обратно ситуации при стандартном испытании, когда истинное значение оценивается по измерению стандартным методом посредством применения настроек наклона и точки пересечения:

*xest = наклон \* y + точка пересечения* (4)

где

*x* *est* = оценка истинного значения

*y* = показания прибора

a. Для проверки настроек наклона и точки пересечения стандартного метода необходимо произвести измерение набора калибровочных образцов с текущими настройками наклона и точки пересечения.

b. Произвести измерение каждого образца из набора калибровочных образцов стандартным методом, по крайней мере, в двух повторностях. Рассчитать среднее значение *y̅i* для каждого образца.

c. Нанести рассчитанные эталонные значения *Xi* и отдельные средние значения образцов *q*, полученные с помощью стандартного метода *y̅i*, на график оси XY. Проверить распределение точек данных, которое должно быть линейным, регулярным и однородным. Если одна или несколько точек данных значительно отклоняются от линейной тенденции, проверить процесс подготовки набора образцов, расчет эталонных значений и функционирование стандартного метода. При необходимости повторить измерения.

d. Используя полученные значений для набора калибровочных образцов, рассчитать уравнение регрессии *y̅i* = *b \* xi+ a* обычным методом наименьших квадратов.

e. Рассчитать остаточное стандартное отклонение от регрессии, *syX*:

(5)

f. Получить или вычислить значения *bc* и *ac,* соответствующие текущим настройкам наклона и точки пересечения:

*b c = 1/наклонc* (6)

и

*ac = -точка пересечения c/наклонc* (7)

где

*наклонc* = текущая настройка наклона

*точка пересечения c* = текущая настройка точки пересечения

g. Проверить, отличается ли вычисленное значение b от значения *bc* статистически значимым образом.

Для этого рассчитать стандартное отклонение *b:*

(8)

где

(9)

При условии применения доверительного интервала 95%, текущий наклон остается корректным, если:

(10)

где *t0,975* — квантиль 0,975 распределения Стьюдента с q-2 степенями свободы.

h. Проверить, отличается ли среднее смещение от значения *a* при текущей калибровке, *αc* статистически значимым образом.

Для этого рассчитать стандартную ошибку уравнения регрессии:

(11)

где *q* — количество калибровочных образцов.

Среднее смещение остается корректным, если оно согласуется с:

(12)

где *t0,975* — квантиль 0,975 распределения Стьюдента с *q-2* степенями свободы, а *y̅*(*x̅*) — прогнозируемое значение от *x̅* на *y̅* (*x̅*) *= b · x̅ + a.*

Если и тест для наклона, и тест для среднего смещения является отрицательным, *а* отличается от *ac* статистически не значимым образом, если

*a* - *t*0,975 · *sa ≤ ac ≤ a* + *t*0,975 · *sa* 13.

где

14.

Дополнительную информацию об этой процедуре проверки см. в ISO 8196-2|IDF 128-2 [5].

i. Корректировка калибровки необходима, если один из тестов в рамках пунктов g) или h) является отрицательным, то есть если одно из требований не выполняется. В таком случае результирующие значения для нового наклона, *наклонn*, и новой точки пересечения, *точка пересеченияn*, имеют следующий вид:

*наклонn = 1/b* (15)

и

*точка пересеченияn = -a/b* (16)

Записать рассчитанные значения *a, b*, *наклонn* и *точка пересеченияn* для будущей проверки. Для широко применяемых флюорооптоэлектронных методов согласно ISO 13366-2|IDF 148-2 [7] ожидаемые значения наклона составляют 1,00 ± 0,10, и значения точки пересечения составляют 0 ± 50 000 клеток/мл в случае обычной регрессии наименьших квадратов с непреобразованными данными.

6 Присвоение эталонных значений вторичному стандартному образцу (ВСО)

Во многих ситуациях так называемые ВСО могут обеспечить более практичные и/или более экономичные инструменты для прослеживаемой фиксации результатов стандартов испытаний. ВСО можно использовать для целей калибровки или в качестве пробных образцов между измерениями. Каждому ВСО можно присвоить соответствующие эталонные значения, применяя сравнительный подход к характеристике ВСО[8].

Для этого аналогичный ВСО с примерно равным ПСК должен быть проанализирован одновременно с ССО с использованием рабочего стандартного метода в постоянных условиях. ПСК материала ССО можно настроить путем смешивания ERM®-BD001a и ERM®-BD001b в надлежащем соотношении и расчета соответствующего эталонного значения, см. параграф 5.2.

Уровень неопределенности материала смешанного ССО и несмешанного ССО можно рассчитать по формуле:

(17)

где

*uCRMBD*001*a* = уровень неопределенности при сертифицированном значении для CRM ERM®-BD001a

*uCRMBD*001*b* = уровень неопределенности при сертифицированном значении для CRM ERM®-BD001b

*fCRMBD*001*a* = объемная доля CRM ERM®-BD001a в смешанном образце

*fCRMBD*001*b* = объемная доля CRM ERM®-BD001b в смешанном образце

a. Подготовить такое количество (смешанных) ССО и ВСО, которое позволяет провести не менее 15 (= n) повторных парных измерений с помощью одного и того же прибора в одной и той же лаборатории, непосредственно друг за другом, обеспечивая парные значения *Ci,CRM* и *Ci,SRM* на основе двух последовательных измерений.

b. Рассчитать для каждого парного измерения разницу *Ei* между двумя результатами:

(18)

c. С учетом аддитивности смещения для примерно равных значений ПСК, теперь можно рассчитать эталонное значение для ВСО, *xSRM*:

(19)

где

*Ccrm* — эталонное значение (смешанного) CRM, и (20)

d. Стандартный уровень неопределенности с эталонным значением для ВСО, *uSRM*, составляет:

(21)

где *uCMR* представляет собой стандартный уровень неопределенности значения, переносимый ССО, и

(22)

e. Расширенная неопределенность *U* *SRM* составляет:

*U SRM = 2u SRM* (23)

7 Использование в проверке квалификации

CRM ERM®-BD001 является стабильным и имеет сертифицированные эталонные значения. Таким образом, он может служить надежным опорным образцом при включении в наборы проб для проверки квалификации. В качестве альтернативы для этой цели может быть включен один или несколько ВСО с присвоенными эталонными значениями в соответствии с ранее описанной процедурой согласно Kuselman *et al.* (2002) [8].

ПРИМЕЧАНИЕ 3

Файл расчета в формате Excel, который позволяет легко выполнять описанные выше расчеты для проверки работоспособности метода, проверки настроек калибровки стандартного метода и присвоения эталонных значений ВСО, можно загрузить по ссылке https://www.icar.org/Excel-templates-with-guidance-on-use-ECJRCCRMSCC.xls.

Таким образом, этот файл расчета в формате Excel предоставляет средства для объединения проверки работоспособности метода, линейности и настроек калибровки в одной процедуре. Единственным дополнительным условием является то, что каждый образец из набора для проверки настроек калибровки измеряется не менее чем в 15 параллельных опытах.

8 Переход с параметрами калибровки стандартных методов

Применение CRM ERM®-BD001 для калибровки стандартных методов означает изменение фиксации подсчета соматических клеток в молоке. Это может привести к существенному изменению настроек калибровки при использовании стандартных методов и, как следствие, к изменению результатов стандартных измерений. Степень изменений будет различаться для разных лабораторий и регионов, в зависимости от систем фиксации, которые применялись до того. Следует отметить, что более значительные изменения, возможно, потребуют переоценки нормативных ограничений, предельных значений в рамках систем оплаты за молоко и/или в программ мониторинга здоровья вымени. Поэтому рекомендуется, чтобы лаборатории, отмечающие значительное изменение содержания при переходе на использование CRM ERM®-BD001, связались с соответствующими регуляторными и надзорными органами и другими заинтересованными сторонами для организации оптимального процесса перехода.

В числе рассматриваемых в этой связи аспекты могут быть следующие:

• Степень смещения содержания при применении материалов CRM ERM®-BD001 с их заявленными сертифицированными эталонными значениями.

• Участие организаций, занимающихся подсчетом соматических клеток (лабораторий, ветеринарных служб, фермеров) в соответствующем регионе, и необходимость согласования в переходный период.

• Участие регуляторных и надзорных органов. Необходимость и возможности для сопутствующей переоценки нормативных ограничений, предельных значений в рамках программ оплаты молока и/или программ здоровья вымени.

• Последствия для деятельности лабораторий при проверке квалификации. Какую систему фиксации применяют другие участвующие в программе лаборатории? Необходимы ли изменения в рамках проверки квалификации и оценки эффективности?

• Последствия для лабораторных протоколов.

• Время перехода. Когда лучше осуществить переход? Это будет сделано в один

этап или в несколько этапов?

• Коммуникация с соответствующими заинтересованными сторонами. Что? Кому?

Поскольку ситуации на местах значительно различаются, необходимо разработать индивидуальные подходы на местном уровне.

Если принято решение о переходе в несколько шагов, местный уровень содержания будет постепенно адаптироваться к уровню содержания, полностью совпадающему с заявленными эталонными значениями CRM ERM®-BD001. Предполагается, что в соответствующих случаях будет достаточно перехода в два или три этапа.

Практичная процедура при реализации этих этапов заключается в том, чтобы в тщательно контролируемых и надлежащим образом защищенных условиях произвести измерения восстановленных материалов CRM ERM®-BD001 многократно при текущих настройках калибровки и, после удаления возможных отклоняющихся результатов, рассчитать среднее значение для обоих образцов ERM®-BD001a и ERM®-BD001b, соответственно *x̅a,local* и *x̅b,local*. На основе этих значений и указанных эталонных значений при CRM

ERM®-BD001, *xa,CRM* и *xb,CRM*, временные местные эталонные значения, *xa,CRM промежуточный* и *xb,CRM промежуточный* могут быть рассчитаны и присвоены двум восстановленным стандартным образцам.

Пример. В случае двухэтапного перехода промежуточные местные эталонные значения могут быть установлены следующим образом:

*xa,CRM промежуточный =* (*x̅a,местный* + *xa,CRM*)/2 и *xb,CRM промежуточный =* (*x̅b,местный* + *xb,CRM*)/2 (24)

Такие материалы с промежуточными местными эталонными значениями могут использоваться на переходном этапе в соответствии с международными стандартами и рекомендациями, упомянутыми в этом документе; таким образом отмечается промежуточный статус этих присвоенных эталонных значений и исключаются любые предположения о том, что результирующие уровни содержания будут стандартно прослеживаться до CRM ERM®-BD001.

9 Библиография

1. Американская ассоциация общественного здравоохранения. (2012) Стандартные методы исследования молочных продуктов, 17-е изд. APHA Press.

2. Объединенный исследовательский центр ЕС. (2020) Отчет о сертификации. Сертификация концентрации соматических клеток (подсчет соматических клеток, ПСК) в коровьем молоке: ERM®-BD001. Доступно по ссылке: https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/ERM-BD001

3. IDF (2008) По направлению к эталонной системе для подсчета соматических клеток в молоке. Bull IDF 427.

4. ISO 8196-1|IDF 128-1. (2009) Молоко. Определение и оценка общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 1. Аналитические признаки и оценка общей точности альтернативных методов.

5. ISO 8196-2|IDF 128-2. (2009) Молоко. Определение и оценка общей точности альтернативных методов анализа молока. Часть 2. Калибровка и контроль качества в лаборатории по анализу молочной продукции.

6. ISO 13366-1|IDF 148-1. (2008) Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 1. Метод с применением микроскопа (Контрольный метод).

7. ISO 13366-2|IDF 148-2. (2006) Молоко. Подсчет соматических клеток. Часть 2: Руководство по работе флуорооптоэлектронных счетчиков.

8. И. Кусельман, А. Вайсман и В. Вегшайдер (2002). Отслеживаемые значения свойств внутренних стандартных образцов. Accred Qual Assur 7, стр. 122-124.

10 Благодарности

- Харри ван ден Байгаарт, Qlip BV, Нидерланды, bijgaart@qlip.nl

- Сильвия Орландини, Международный комитет по учету животных, Нидерланды, silvia@icar.org

- Вернер Лугинбуль, ChemStat, Швейцария, info@chemstat.ch