

УДК 577.2:575:57.08:658.562

ВНУТРІШНЬОЛАБОРАТОРНА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ВИДОВОЇ ПРИНАЛЕЖНОСТІ М'ЯСА ЗА ВИКОРИСТАННЯ ПЛР-РЧ ТЕСТ-СИСТЕМИ «М'ЯСО-ТЕСТ»

Р. В. Облап

e-mail: rob lap@hotmail.com

Державне Підприємство «Укрметртестстандарт»,
Метрологічна, 4, м. Київ, 03143, Україна

Проведено процедуру внутрішньолабораторної валідації методу визначення видової приналежності м'яса згідно з європейськими стандартами та нормами. Процедуру валідації проводили за використання розробленої тест-системою «М'ясо-тест» на основі TaqMan-технології методу ПЛР у реальному часі. Даний діагностичум дозволяє здійснювати ідентифікацію видової належності тваринних тканин у м'ясній сировині, подрібненій сировині у складі м'ясних напівфабрикатів, готових необроблених м'ясних виробів та тих, що зазнали термічної обробки. Тест-систему виконано у форматі мультиплексу та вона дозволяє одночасно ідентифікувати три мішені – курятину, свинину та яловичину.

Валідацію методу проводили за такими основними параметрами, як специфічність, межа виявлення, аналітична чутливість, ефективність ампліфікації та лінійність. Специфічність методу становила 100% за всіма трьома каналами – Fat (курятину), Hex (свинину) та Rox (яловичину). Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. В межах робочого діапазону ($Ct \leq 39$) хибно-негативних та хибно-позитивних результатів не спостерігалось, що засвідчувало високий рівень застосованого методу. Межа виявлення та аналітична чутливість для каналів Fat та Hex становили 1×10^{-6} та 1×10^{-5} нг, відповідно. Для каналу Rox межа виявлення становила 1×10^{-7} нг, а аналітична чутливість – 1×10^{-6} нг. Отримані значення нахилу калібрувальних кривих (α) вкладалися в діапазон від $-3,58$ до $-3,10$, що свідчило про задовільну ефективність ампліфікації. Розраховані значення ефективності ПЛР для каналів Fat, Hex, Rox склали 103,2, 100,0 та 94,9 %, відповідно, що є досить високим показником для діагностичних тест-систем. Також було показано чітку залежність значень Ct досліджуваних зразків від логарифму початкової концентрації внесеного субстрату ($R^2 \geq 0,98$).

Отримані параметри валідації відповідають стандартам ЄС щодо проведення ПЛР аналізу та дозволяють застосовувати дану методику в лабораторній практиці. Даний підхід може бути рекомендований випробувальним лабораторіям для забезпечення максимального ступеню вірогідності одержаних результатів та позбавлення аналітичних помилок, що призводять до виникнення хибно-позитивних та хибно-негативних результатів.

Ключові слова: валідація, ПЛР у реальному часі, фальсифікація м'яса.

Постановка проблеми

Одним із основних джерел білку у раціоні харчування людини є м'ясо тварин. Крім білку, воно багате на жири, вітаміни, мінеральні речовини та інші життєво важливі компоненти. Серед видів м'яса тварин одне із провідних місць за рівнем споживання посідають яловичина, свинина, баранина та курятину. Контроль м'ясної сировини за показниками безпеки та якості здійснюється державною ветеринарною та фітосанітарною службами України відповідно до низки Законів України [1, 2] та чинних нормативно-правових актів щодо виробництва, транспортування, зберігання, реалізації, а також експорту та імпорту відповідної продукції [3, 4].

В Україні м'ясна сировина виробляється не тільки для забезпечення потреб внутрішнього ринку, але й для експорту. Тому забезпечення належного рівня ветеринарно-санітарного

контролю за безпечністю та якістю м'ясної продукції має дуже велике значення. М'ясна сировина та продукти харчування, до складу яких вона входить, потребують ретельної перевірки за органолептичними, фізико-хімічними та мікробіологічними показниками [5, 6].

Реорганізація контролюючих установ в Україні, яка проводилась останнім часом, призвела до того, що на ринках та магазинах країни значно збільшилася кількість фальсифікованих продовольчих товарів, у тому числі м'ясної продукції як вітчизняного, так і імпортного виробництва. А прийняття нових законів, спрямованих на суворе дотримання певних вимог щодо якості сировини і продукції без належного рівня контролю ще не гарантує повного зникнення фальсифікатів з полиць магазинів.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

За даними низки досліджень м'ясна продукція, що не відповідає вимогам ветеринарної та фітосанітарної служб, становить в окремих торговельних мережах та ринках до 15–30% від кількості всієї перевіреної продукції. Були випадки реалізації фальсифікованої продукції, що супроводжувалася всіма належними документами і сертифікатами відповідності. В якості фальсифікату найчастіше виступає малоцінна м'ясна сировина, продукція другого та третього сортів, яку реалізують як продукцію високої якості. Тому зараз особливо гостро постає питання щодо необхідності більш достовірного визначення як видової приналежності самої м'ясної сировини, так і складу готової подрібненої м'ясної продукції [7].

Контроль за свіжістю та безпекою м'ясної сировини та готових м'ясних виробів здійснюють за допомогою органолептичних, фізико-хімічних та мікробіологічних методів аналізу. Але, на жаль, за їх допомогою неможливо встановити видовий склад м'яса у продуктах, особливо якщо кількість внесеного фальсифікату незначна стосовно основної сировини.

Застосування імунологічних методів аналізу для виявлення фальсифікації м'ясної продукції також не дає 100% гарантії. Дані методи аналізу не дозволяють встановити виду приналежності м'ясної сировини, якщо її вміст у готовій продукції не перевищує 10–20% від загальної маси продукту. Більше того, зазначені методи практично не є придатними для дослідження м'ясної сировини близькоспоріднених видів тварин і м'ясних продуктів, що зазнали термічної обробки [8].

Найбільш перспективними для визначення видової приналежності тканин тваринного походження у складі як м'ясної сировини, так і готової продукції, що зазнала термічної обробки, є молекулярно-генетичні методи аналізу, особливо полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). У порівнянні із імунологічними методами досліджень, встановлення видової приналежності за допомогою ПЛР-аналізу характеризується на порядок більшою чутливістю, більш широким спектром диференціювання тваринних тканин, відсутністю обмежень щодо співвідношення складових частин дослідного зразку, високою відтворюваністю та повторюваністю результатів,

своєю універсальністю, а також можливістю здійснення як якісного, так і кількісного аналізу [9].

Незважаючи на те, що визначення фальсифікації м'ясної продукції методом ПЛР широко використовується в закордонних лабораторіях, в Україні цей напрямок ще не знайшов широкого практичного застосування в області ветеринарно-санітарної експертизи. Частково це може бути пов'язане з відсутністю доступних та конкурентоспроможних діагностиків вітчизняного виробництва. Тому, безумовно, для вирішення вищезазначеної проблеми необхідна розробка сучасних, високочутливих, адаптованих під різні прилади ПЛР тест-систем для можливості здійснення контролю видового складу м'ясної сировини та готової м'ясної продукції.

Мета, завдання та методика досліджень

В 2014 році на базі лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ДП «Укрметрест-стандарт» було розроблено тест-систему на основі методу ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR), що дозволяє здійснювати ідентифікацію видової належності тваринних тканин у м'ясній сировині, подрібненій сировині у складі м'ясних напівфабрикатів, готових необроблених м'ясних виробів та тих, що зазнали термічної обробки [10].

Необхідною умовою успішного застосування будь-якої діагностичної тест-системи або методу у практиці лабораторних досліджень є проведення попередньої процедури внутрішньолaboratorної валідації. Це, насамперед, пов'язано з тим, що на достовірність кінцевого результату впливає безліч різноманітних факторів, між іншим, пробопідготовка зразків для аналізу, якісна та кількісна оцінка екстрагованої ДНК або білку, кінетика проходження реакції, застосоване обладнання. Ігнорування оцінки та контролю певних параметрів при проведенні аналізу може негативно вплинути на точність, правильність та достовірність отриманих результатів. Тому проведення процедури валідації регламентується стандартом ДСТУ ISO / ІЕС17025 [11].

Метою даної роботи було проведення внутрішньолaboratorної валідації методу визначення видової приналежності м'яса за використання розробленої тест-системи «М'ясо-тест» на основі ПЛР у реальному часі.

Матеріалом для виділення геномної ДНК слугували зразки сирого м'яса різних видів тварин і птиці, м'ясних продуктів, які піддавалися термічній обробці, кормів для тварин, м'ясовмісних продуктів, до складу яких входила різноманітна рослинна сировина. Тотальну ДНК виділяли методом СТАБ-преципітації з власними модифікаціями [12]. Концентрацію виділеної нуклеїнової кислоти та її чистоту за співвідношеннями A_{260}/A_{280} та A_{260}/A_{230} визначали на спектрофотометрі «BioPhotometer AG 22331» (Eppendorf, Німеччина). Виділення ДНК з кожного досліджуваного зразка здійснювали у двох повторностях, кожен виділений зразок ДНК ампліфікували також у двох повторностях.

Проведення ПЛР-РЧ здійснювали за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 1x Таq-буфер (75 мМ Трис-НCl (pH 8,8); 20 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,01% Tween 20); 0,2 мМ дНТФ суміш; 2,5 мМ MgCl_2 , 5 пкмоль праймерів; 2,5 пкмоль зонду; 50-500 нг ДНК та 1 од. Таq ДНК полімерази (Thermo Fisher Scientific, США). Визначення присутності ДНК курятини відбувалося за каналом FAM, свинини та яловичини – HEX та ROX, відповідно. Кожному флуоресційному барвнику відповідав належний йому гасник флуоресценції - BHQ1-2. Температурний профіль складався з початкової денатурації впродовж 3 хв за 94°C та наступних 45 циклів: денатурації – 20 с за 95°C, гібридизації праймерів та синтезу – 40 с за 60°C.

Обробку результатів та статистичний аналіз здійснювали за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™. Основними критеріями аналізу отриманих результатів було порівняння значень граничних циклів (C_t) та рівня репортерної флуоресценції (ΔR_n). Зразок вважався позитивним у разі наявності експоненціальної кривої ампліфікації хоча б по одному з каналів - Fam, Hex або Rox, у межах ΔR_n від 300 до 1000 та значень $C_t \leq 39$.

Валідацію методу проводили згідно з вимогами Об'єднаного Центру Досліджень (JRC) та Інституту здоров'я та захисту споживачів Європейського Союзу [13].

Результати досліджень

Внутрішньолабораторну валідацію методу визначення видової приналежності м'яса

проводили за такими основними параметрами, як специфічність, межа виявлення, аналітична чутливість, ефективність ампліфікації та лінійність.

Специфічність (Specificity). Для методу ПЛР специфічність визначається його здатністю ідентифікувати наявність певних (специфічних) фрагментів ДНК обраного об'єкту у досліджуваному зразку. У даному випадку специфічність дозволяє довести, що ідентифіковано саме шуканий об'єкт.

Перевірку специфічності роботи тест-системи у форматі мультиплексу здійснювали шляхом тестування зразків ДНК, ізольованої з наступних організмів: курка (*Gallus gallus*), свиня (*Sus domesticus*), ВРХ (*Bos taurus*), вівця (*Ovis aries*), індик (*Meleagris gallopavo*), качка (*Anas platyrhynchos*), гуска (*Anser domesticus*), кінь (*Equus caballus*), лосось (*Salmo salar*), людина (*Homo sapiens*), соя (*Glycine max*), кукурудза (*Zea mays*), ріпак (*Brassica napus*), рис (*Oryza sativa*), жито (*Secale cereal*), пшениця (*Triticum aestivum*), ячмінь (*Hordeum vulgare*), овес (*Avena sativa*), гречка (*Fagopyrum esculentum*), томати (*Lycopersicon esculentum*), картопля (*Solanum tuberosum*), кишкова паличка (*Escherichia coli*). Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. Результати досліджень підтвердили 100% специфічність за всіма трьома каналами – Fam (курятини), Hex (свинини), Rox (яловичини).

Межа виявлення (LOD, limit of detection). Чутливість методу, в широкому розумінні визначається як можливість із застосуванням даного методу реєструвати невеликі зміни концентрації досліджуваної речовини. Для методу якісної ПЛР чутливість рівноцінна межі виявлення. Під чутливістю або межею виявлення розуміють ту мінімальну кількість ДНК, яку здатна виявляти дана тест-система. Під аналітичною чутливістю – мінімальну кількість мішені, за якої тест-система забезпечує 100% відтворюваність результатів аналізу [14].

На межу виявлення суттєво впливають такі фактори, як метод виділення ДНК, ефективність її застосування, індивідуальні особливості тест-системи, підхід щодо ідентифікації результату ампліфікації [15, 16].

Визначення аналітичної чутливості тест-системи проводили за допомогою кількісно охарактеризованих препаратів курячої, свинячої

та коров'ячої ДНК. Якісний склад ДНК перевірявся спектрофотометрично за допомогою BioPhotometer® (Eppendorf, Німеччина). В роботі використовувалися лише ті зразки ДНК, в яких значення показників $A_{260/280}$ та $A_{260/230}$ лежали в межах 1,8–2,0 та 1,5–2,0, відповідно. Для трьох досліджуваних препаратів ДНК була приготовлена серія десятикратних розведень.

Кожна серія нараховувала від 11 до 12 точок, які лежали в діапазоні від $n \times 10^2$ до $n \times 10^{-9}$ нг ДНК. Кожна точка аналізувалася у 10 повторностях. На підставі отриманих даних (наявність-відсутність сигналу) було визначено межу виявлення та аналітичну чутливість тест-системи за всіма трьома каналами (табл. 1).

Таблиця 1. Результати визначення аналітичної чутливості тест-системи «М'ясо-тест» за використання десятикратних розведень ДНК (нг)

Розведення \ Мішені	FAM	HEX	ROX
1×10^2	10	10	10
1×10^1	10	10	10
1×10^0	10	10	10
1×10^{-1}	10	10	10
1×10^{-2}	10	10	10
1×10^{-3}	10	10	10
1×10^{-4}	10	10	10
1×10^{-5}	10	10	10
1×10^{-6}	9	7	10
1×10^{-7}	5	3	6
1×10^{-8}	5	5	7
1×10^{-9}	–	–	3

За каналом Fam (курятина) для визначення межі виявлення та аналітичної чутливості використовували 11 точок десятикратних розведень ДНК м'яса курки з концентраціями від 100 до 1×10^{-8} нг/реакцію (рис. 1 а). Сигнал ампліфікації спостерігався за всіма точками, а стабільні значення C_t коливалися від $14,48 \pm 0,33$ до $36,20 \pm 0,23$. За концентрації ДНК, меншої ніж 1×10^{-5} нг, спостерігався великий розкид значень між повторами.

Отримані результати дозволили встановити, що межа виявлення за каналом Fam становить 1×10^{-6} нг, а аналітична чутливість – 1×10^{-5} нг. Для каналу Hex (свинина) також було використано 11 точок розведень ДНК з тим самим співвідношенням концентрацій (рис. 1 б). Сигнали ампліфікації було зафіксовано практично за всіма точками, за винятком

розведення 1×10^{-8} . Стабільні значення C_t коливалися від $15,41 \pm 0,23$ до $36,46 \pm 0,25$. Межа виявлення та аналітична чутливість становили 1×10^{-6} та 1×10^{-5} нг, відповідно. Що стосується каналу Rox (яловичина), то було досліджено 12 точок десятикратних розведень ДНК м'яса яловичини з концентраціями від 100 до 1×10^{-9} нг /реакцію. (рис. 1 с). Сигнал ампліфікації спостерігався за всіма точками, значення C_t лежали у межах від $12,85 \pm 0,17$ до $35,67 \pm 0,18$. Межа виявлення за даним каналом – 1×10^{-7} нг, аналітична чутливість – 1×10^{-6} нг.

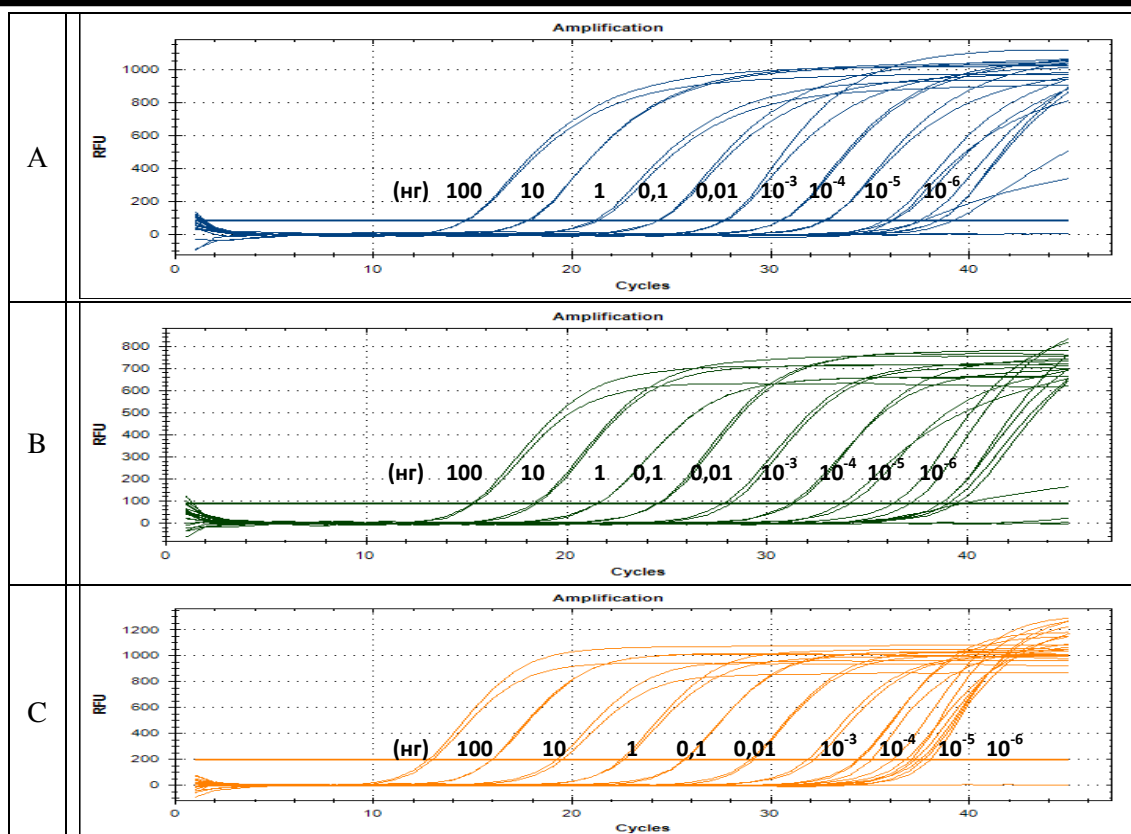


Рис. 1. Визначення межі виявлення та аналітичної чутливості тест-системи. Графіки накопичення флуоресційного сигналу ПЛР-РЧ за каналами: А) FAM (курятина), В) HEX (свинина), С) ROX (яловичина)

Ефективність (Amplification efficiency).

Ефективність ПЛР є величиною, яка демонструє в скільки разів за один цикл змінюється кількість фрагментів ДНК та описується рівнянням $E = 10^{-(1/\alpha)} - 1$. За ефективності ПЛР у 100% за кожен цикл відбувається подвоєння продукту ампліфікації. У такому випадку кут нахилу кривої дорівнює $-3,322$, а величина фактору ампліфікації -2 [17]. Зменшення ефективності ПЛР, наприклад, до 83 % ($\alpha = -3,800$) свідчить про необхідність подальшої оптимізації умов ампліфікації за рахунок зміни концентрації праймерів і зондів або $MgCl_2$. У свою чергу, занадто високі значення E (143 %, $\alpha = -2,600$) може означати непропорційне розщеплення зонду по відношенню до напрацьованої кількості ампліконів.

Ефективність роботи тест-системи за трьома каналами перевіряли шляхом проведення ПЛР із серією десятикратних розведень препаратів ДНК. Оскільки ефективність ПЛР залежить тільки від кута нахилу кривої, абсолютні значення концентрації ДНК були непотрібні [12]. Кожна серія десятикратних розведень ДНК складалася з чотирьох точок. На основі отриманих значень C_t за допомогою програмного забезпечення CFX Manager, Version 1.6.541.1028 (Bio-Rad) будувалися графіки стандартних кривих в системі координат $\log [N] / C_t$ (d). Стандартні криві описуються загальним лінійним рівнянням $y = -\alpha x + b$, де α виражає тангенс кута нахилу кривої, та дозволяють оцінити ефективність ампліфікації (рис. 2).

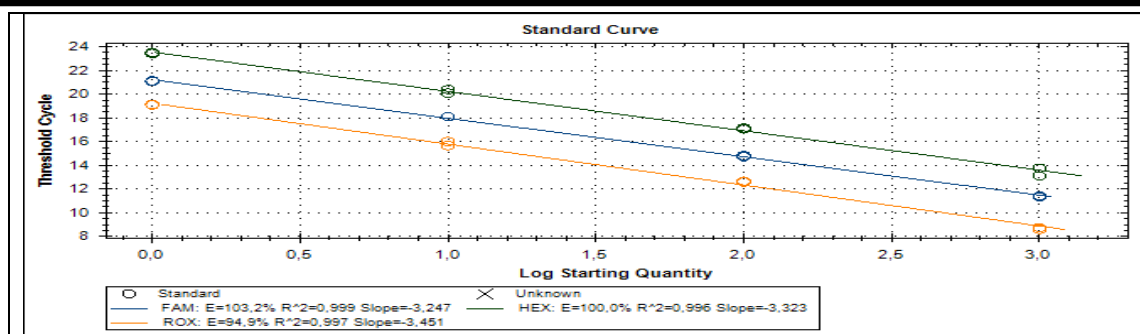


Рис. 2. Оцінка ефективності роботи тест-системи за трьома каналами. Стандартні криві, побудовані за результатами ПЛР-РЧ серій десятикратних розведень ДНК

Коефіцієнт кореляції лінійної регресії R^2 (R^2 Coefficient). R^2 є коефіцієнтом, який характеризує лінійність ампліфікації та обчислюється як квадрат коефіцієнта кореляції між вимірною величиною C_t та логарифмом початкової концентрації матриці. Припустимо значення $R^2 \geq 0,98$. Лінійність характеризує можливість за використання даної методики, у межах діапазону її застосування, одержувати результати випробувань, прямо пропорційні концентрації досліджуваної речовини у зразку [18].

Визначення лінійності ампліфікації здійснювали шляхом регресійного аналізу та побудови стандартної кривої залежності значень граничного циклу від логарифму числа копій ДНК, внесених у реакційну суміш. В таблиці 2 для кожного каналу наведено дані щодо розрахунків кута нахилу кінетичної кривої (α , Slope), ефективності реакції (E) та коефіцієнта кореляції (R^2). Отримані дані демонструють, що за всіма трьома каналами значення кутів нахилу α вкладалися в діапазон від $-3,58$ до $-3,10$, а показники R^2 були не нижчими за $0,99$ [41]. Розраховані значення ефективності ПЛР для каналів Fam, Hex, Rox склали $103,2$, $100,0$ та $94,9\%$, відповідно, що є досить високим показником для діагностичних тест-систем.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Таким чином, було проведено внутрішньолабораторну валідацію методу визначення видової приналежності м'яса за використання ПЛР-РЧ тест-системи «М'ясо-тест» згідно з міжнародними вимогами. Отримані параметри валідації відповідають стандартам ЄС щодо проведення ПЛР аналізу та дозволяють застосовувати дану методику в лабораторній практиці.

Слід зазначити, що проведення внутрішньолабораторної валідації будь-якого методу є необхідною умовою для отримання достовірних результатів та має бути невід'ємною частиною кожної випробувальної лабораторії, особливо акредитованої згідно з стандартом ДСТУ ISO / IEC17025.

У подальшій перспективі наших досліджень є розробка та запровадження методичних вказівок для випробувальних лабораторій щодо проведення процедури валідації методів на основі полімеразної ланцюгової реакції.

References

1. Pro veterynarnu medytsynu [About veterinary medicine]. № 2498-XII. (1992) [in Ukrainian].
2. Pro osnovni pryntsyipy ta vymohy do bezpechnosti ta yakosti kharchovykh produktiv [The basic principles and requirements for the safety and quality of food products]. № 771/97. (1997) [in Ukrainian].
3. Derzhavnyi departament veterynarnoi medytsyny Ministerstva ahrarynoi polityky Ukrainy (2002). Pravyla peredzabiinoho veterynarnoho ohliadu tvaryn i veterynarno-sanitarnoi ekspertyzy miasa ta miasnykh produktiv [Rules for pre-slaughter veterinary inspection of animals and veterinary and sanitary examination of meat and meat products]. Retrieved from <http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0524-02> [in Ukrainian].
4. Evropeyskiy Parlament i Sovet Evropeyskogo Soyuzu (2002). Reglament ob ustanovlenii obshchikh printsipov i trebovaniy prodovolstvennom prave, o sozdanii evropeyskogo organa po bezopasnosti pishchevykh produktov i ob ustanovlenii protsedury obespecheniya bezopasnosti pishchevykh produktov [Regulation establishing common principles and requirements in food law, on

the establishment of a European Food Safety Authority and on the establishment of a procedure food safety]. Retrieved from <https://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es178-2002.pdf> [in Russian].

5. Oliinyk, L. V. (2004). Veteryarno-sanitarnyi kontrol kharchovykh toksykoinfektsii [Veterinary and Sanitary Control of Food Toxic Infections]. Kyiv: Ahrarna nauka [in Ukrainian].

6. Pawsey, Rosa K. (2010). Food and its safety. *Med. Conflict. Surv.*, 10 (2), 156–163.

7. Haidei, O. S., Zahrebelnyi, V. O., Novozhytska, Yu. M. & Usachenko, N. V. (2014). Vyznachennia vydovi prynalezhnosti (falsyfikatsii) produktiv kharchuvannia ta kombikormiv dlia tvaryn za dopomohoiu PLR-RCh [Determination of the species belonging (falsification) of food products and animal feeds using the PCR-RF]. *Veteryarna biotekhnolohiia*, 25, 18–27 [in Ukrainian].

8. Ansfield, M., Reaney, S. D. & Jackamn, R. (2000). Production of a sensible immunoassay for detection of ruminant and porcine proteins, heated to >130°C at 2.7 bar, in compound animal feedstuff. *Food Agric Immunol.*, 12, 273–284.

9. Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F. & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Sci.*, 82, 444–449.

10. Oblap, R. V., Novak, N. B. & Dyman, T. M. (2014). Rozroblennia test-system na osnovi PLR-RCh dlia vyznachennia vydovoi nalezhnosti tkanyn u skladi kharchovykh produktiv [Rozroblennia test-system na osnovi PLR-RCh dlia vyznachennia vydovoi nalezhnosti tkanyn u skladi kharchovykh produktiv]. *Tekhnolohiia vyrobnytstva i pererobky produktsii tvarynnytstva*, 2 (112), 112–115 [in Ukrainian].

11. General requirement for the competence of testing and calibration laboratories (2017). ISO/IEC 17025:2017. Geneva, Swizerland : International Organization for Standardization.

12. Rebrykov, D. V. (Ed.) (2009). PTsR v realnom vremeni [Real-time PCR]. Moskva: BYNOM. Laboratoriya znanyi [in Russian].

13. European Network of GMO Laboratories (2015). Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods for GMO Testing. Retrieved from http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf.

14. Nosyrev, P., Nosyreva, M., Rasskazova, T. & Korneyeva, N. (2003). Praktikum po GMP.

Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya i praktika [Workshop on GMP. Validation of analytical methods: theory and practice] *Remedyum*, 10, 69–71 [in Russian].

15. Kostiuk, S. A. (2012). Validatsiya molekulyarno-biologicheskikh metodov laboratornoy diagnostiki [Validation of molecular biological laboratory diagnostic methods]. *Meditinskiye Novosti*, 4, 16–19 [in Russian].

16. Vovelgesang, J. & Hadrich, J. (1998). Limit of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. *Accred. Qual. Assur.*, 3, 242–255.

17. Thermo Fisher Scientific (2015). Real-Time PCR: Understanding Ct. Retrieved from <http://sequencingfacility.med.monash.edu.au/pdf/understanding.pdf>

18. Kostyuk, S. A. (2012). Validatsiya molekulyarno-biologicheskikh metodov laboratornoy diagnostiki [Validation of molecular biological laboratory diagnostic methods]. *Meditinskiye novosti*, 4, 16–19 [in Russian].

LABORATORY METHOD VALIDATION OF MEAT SPECIES-SPECIFIC DETECTION USING REAL-TIME PCR TEST-SYSTEM “MEAT-TEST”

R. Oblap

e-mail: roblap@hotmail.com

SE «Ukrmetrteststandart»,

4, Metrologichna Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Intralaboratory validation of meat-species identification method was performed according to european standards and regulations. Validation was performed by designed test-system "Meat-test" on the basis of TagMan technology Real-Time PCR. This test-system allows to perform species-specific identification of animal tissues in meat raw material, grinded up meat raw material in the content of semi-finished meat products, finished untreated meat products, and meat products under thermal treatment. Test-system id designed as multiplex and it allows to identify three targets-chicken, pork and beef, simultaneously.

Method validation was performed for such basic parameters as specificity, limit of detection, analytical sensitivity, amplification efficiency and linearity. Method specificity was 100% for all three indicators – Fam (chicken), Hex (pork), and Rox (beef). No cross reactions was detected. No false-negative and false-positive results was detected,

what shows high level of applied method. Limit of detection and analytical sensitivity for Fam and Hex was 1×10^{-6} and 1×10^{-5} ng, respectively. Limit of detection was 1×10^{-7} ng, and analytical sensitivity was 1×10^{-6} ng for Rox. Obtained values of slope of calibration curves (α) were within $-3,58$ to $-3,10$, what shows normal amplification efficiency. Calculated PCR efficiency values for Fam, Hex, Rox, was 103,2, 100,0 and 94,9 %, respectively, what is high enough value for diagnostic test-system. Clear dependence of analysed samples Ct values on logarithm of initial concentration of added substrate was shown ($R^2 \geq 0,98$).

Obtained validation parameters meet the EU PCR-performing standards. It enables application of this method in laboratory practice. This approach can be recommended to test laboratories for high reliability implementation of obtained results and analytical errors (false-positive and false-negative results) elimination.

Keywords: validation, Real-Time PCR, meat falsification.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МЯСА С ПОМОЩЬЮ ПЦР-РВ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «М'ЯСО-ТЕСТ»

Р. В. Облап

e-mail: roblop@hotmail.com

Государственное предприятие

«Укрметртестстандарт»,

ул. Метрологическая, 4, Киев, 03143, Украина

Проведена процедура внутрилабораторной валидации метода определения видовой принадлежности мяса согласно европейским стандартам и нормам. Процедуру валидации проводили с помощью разработанной тест-системы «Мясо-тест» на основе TaqMan-технологии метода ПЦР в реальном времени. Данный диагностикум позволяет осуществлять идентификацию видовой принадлежности тканей животных в мясном сырье, измельченном сырье в составе мясных полуфабрикатов, готовых необработанных мясных изделиях, а также тех, что подверглись термической обработке. Тест-система выполнена в формате мультиплекса и позволяет одновременно идентифицировать три мишени – курятину, свинину и говядину.

Валидацию метода проводили по таким основным параметрам, как специфичность, предел обнаружения, аналитическая чувствительность, эффективность амплификации и линейность. Специфичность метода составляла 100% по всем трем каналам – Fam (курятина), Hex (свинина) и Rox (говядина). Перекрестных реакций при этом выявлено не было. В пределах рабочего диапазона ($Ct \leq 39$) ложно-отрицательных и ложно-положительных результатов не наблюдалось, что свидетельствовало о высоком уровне примененного метода. Предел обнаружения и аналитическая чувствительность для каналов Fam и Hex составляли 1×10^{-6} и 1×10^{-5} нг, соответственно. Для канала Rox предел обнаружения составлял 1×10^{-7} нг, а аналитическая чувствительность – 1×10^{-6} нг. Полученные значения угла наклона калибровочных кривых (α) вкладывались в диапазон от $-3,58$ до $-3,10$, что свидетельствовало об удовлетворительной эффективности амплификации. Рассчитанные значения эффективности ПЦР для каналов Fam, Hex и Rox составили 103,2, 100,0 и 94,9 %, соответственно, что является довольно высоким показателем для диагностических тест-систем. Также была показана четкая зависимость значений Ct исследуемых образцов от логарифма начальной концентрации внесенного субстрата ($R^2 \geq 0,98$).

Полученные параметры валидации отвечают стандартам ЕС по проведению ПЦР анализа и разрешают применять данную методику в лабораторной практике. Данный подход может быть рекомендован испытательным лабораториям для обеспечения максимального уровня достоверности полученных результатов и избеганию появления аналитических ошибок, которые могут приводить к возникновению ложно-положительных и ложно-отрицательных результатов.

Ключевые слова: валидация, ПЦР в реальном времени, фальсификация мяса.