

Валидация методики определения IL-1b в культуральной жидкости с помощью HEK-Blue-IL1b

- **Аналитическая методика (Analytical Procedure)** - под аналитической методикой понимается способ проведения анализа. Она должна подробно описывать стадии, необходимые для выполнения каждого аналитического испытания. Описание может включать (но не ограничиваться): приготовление образца, референтного стандарта и реагентов, использование прибора, построение калибровочной кривой, использование расчетных формул и т. д.
- **Специфичность (Specificity)** - способность безошибочно оценивать аналит в присутствии компонентов, наличие которых ожидается. Обычно они могут включать примеси, продукты деградации, матрицу и т. д. Недостаточная специфичность может быть скомпенсирована другой(ими) вспомогательной(ими) аналитической(ими) методикой(ими).
- **Правильность (Assay, истинность)** аналитической методики выражает степень совпадения между значением, принятым в качестве устоявшегося истинного значения или принятого референтного значения, и найденным значением.
- **Прецизионность (Precision, меткость)** аналитической методики выражает степень совпадения (степень разброса) между серией и змерений, полученных из нескольких проб одной и той же однородной пробы в предписанных условиях. Прецизионность можно р ассматривать на трех уровнях: повторяемости (Repeatability), промежуточной прецизионности (Intermediate precision) и воспроизводимости (Reproducibility).
Прецизионность необходимо изучать с использованием однородных аутентичных проб. Однако при невозможности получить одно родную пробу ее можно изучить с использованием искусственно приготовленных проб или раствора пробы.
Прецизионность аналитической методики обычно выражают в виде дисперсии, стандартного отклонения (sd) или коэффициента вариации (CV) серии измерений.

Повторяемость выражает прецизионность в одних и тех же рабочих условиях в течение короткого промежутка времени. Повторяемость также называют прецизионностью внутри анализа.

Промежуточная прецизионность выражает внутрिलाбораторные вариации: разные дни, разные аналитики, разное оборудование и т. д.

Воспроизводимость выражает прецизионность между лабораториями (совместные исследования, обычно применяется к стандар тизации методологии).
- **Предел обнаружения (Limit of Detection)** аналитической методики — это наименьшее количество аналита в пробе, которое подда ется обнаружению, но необязательно определяется количественно в виде точного значения.
- **Предел количественного определения (Limit of Quantification)** аналитической методики — это наименьшее количество аналита в пр обе, которое поддается количественному определению с удовлетворительной прецизионностью и правильностью. Предел колич ественного определения — это параметр количественных анализов для низких содержаний соединений в матрицах проб и используется, в частности, для определения примесей и (или) продуктов деградации.

Нижний предел количественного определения (LLOQ) аналитической методики - это наименьшее количество аналита в пробе, кот орое поддается количественному определению с удовлетворительной прецизионностью и правильностью.

Верхний предел количественного определения (ULOQ) аналитической методики - это наибольшее количество аналита в пробе, к оторое поддается количественному определению с удовлетворительной прецизионностью и правильностью.
- **Линейность (Linearity)** аналитической методики — это ее способность (в заданном диапазоне) получать результаты испытаний, кот орые прямо пропорциональны концентрации (количеству) аналита в пробе.
- **Диапазон (Range)** аналитической методики — это интервал между наибольшей и наименьшей концентрациями (количествами) ана лита в пробе (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет подходящую степень прециз ионности, правильности и линейности
- **Устойчивость (Robustness)** аналитической методики — это мера ее способности оставаться неизменной вследствие небольших, но намеренных вариаций параметров метода и служит признаком ее надежности во время обычного использования.
- **Валидация метода** - это подтверждение испытанием и предоставление объективных доказательств, что определенные требования для специфического предполагаемого использования удовлетворены (3). Валидация важна, так как определяет даст ли метод надежные результаты в контексте его предполагаемого использования. Предполагаемое использование должно быть четко определено перед началом времязатратных и дорогих валидационных экспериментов.
- **Образец контроля качества (QC)** - образец матрицы с известным содержанием аналита, используемый для отслеживания качества биоаналитического метотда и для оценки валидности и честности результатов анализа образца с неизвестным содержанием аналита в независимой постановке.
- **Серия (Batch, партия)** - набор образцов с неизвестным содержанием аналита из одного или нескольких источников и набор образцов контролей качества, которые обрабатываются одновременно.
- **Аналит (Analyte)** - специфическое химическое соединение, которое необходимо измерять. Может быть лекарством, биомолекулой, его/ее производным, метаболитом и/или продуктом деградации в биологической матрице.

Взято из (1), (2), (3) и (4)

Parametr	EMA	FDA
----------	-----	-----

Reference Standards	<p>The reference material should be well characterised and documented (e.g. certificate of analysis and origin). The purest reference standard available at the time should be procured. It is strongly recommended that the batch of the reference standard used for the preparation of calibration standards and QC samples is the same as used for dosing in the non clinical and clinical studies. In case of change of batch, an analytical characterisation and bioanalytical evaluation should be carried out prior to use to ensure that the performance characteristics of the method are not altered.</p>	<p>The sponsor should provide the certificates of analyses (Co A), including the source, lot number, and expiration date (with the exception of United States Pharmacopeia (USP) standards) for commercially available reference standards</p>
Calibration Curve	<p>The response function of the calibration curve is measured indirectly and is generally non linear and often sigmoidal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • A minimum of 6 calibration standards should be run at least in duplicate. The calibration standards should be spaced approximately evenly on a logarithmic scale within the anticipated range. • In addition to the calibration standards, anchor points outside the range of quantification can be used to facilitate the fitting of the curve. • A minimum of 6 independent runs should be evaluated during the validation. The results must be reported in a table to establish the overall robustness of the regression model of the calibration curve. A calibration standard may be excluded from the curve due to a technical error with an assignable cause (e.g. pipetting error). • The target back-calculated concentrations of the calibration standards should be within 20% of the nominal value (25% at LLOQ and ULOQ) for at least 75% of calibration standards. The anchor calibrators do not require acceptance criteria since they are beyond the quantifiable range of the curve. • (CC) In case replicates are used, the criteria (within $\pm 15\%$ or $\pm 20\%$ for LLOQ) should also be fulfilled for at least 50% of the calibration standards tested per concentration level. In case a calibration standard does not comply with these criteria, this calibration standard sample should be rejected, and the calibration curve without this calibration standard should be re-evaluated, including regression analysis. In case all replicates of the LLOQ or the ULOQ calibration standard are rejected then the batch should be rejected from the validation, the possible source of the failure be determined and the method revised (if necessary). If the next validation batch also fails, then the method should be revised before restarting validation. Although the calibration curve should preferably be prepared using freshly spiked samples, it is allowed to use previously prepared and stored calibration samples, if supported by appropriate stability data. 	<p>For LBAs, in addition to the calibration standards, anchor points outside the range of quantification can facilitate the fitting of the curve. Anchor points should not be used as part of the acceptance criteria for the run. For most LBAs, calibration (standard) curves are inherently nonlinear, and in general, more calibration standards are needed to define the fit over the calibration curve range for LBAs than for CCs. In addition, the response-error relationship for LBA standard curves is a variable function of the mean response (i.e., heteroscedasticity).</p> <p>Elements:</p> <ul style="list-style-type: none"> • A blank and at least six, non-zero calibrator levels covering the quantitation range, including LLOQ per validation run. • Calibration curves are usually run in duplicate. • Additional calibrators may be used as anchor points. • All blanks and calibrators should be in the same matrix as the study samples. • The concentration-response relationship is usually fit with a four- or five-parameter logistic model. Other models may be acceptable with justification. <p>Acceptance Criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Non-zero calibrators should be $\pm 20\%$ of nominal (theoretical) concentrations, except at LLOQ and ULOQ where the calibrator should be $\pm 25\%$ of the nominal concentrations in each validation run. • 75% and a minimum of six non-zero calibrator levels should meet the above criteria in each validation run. • Anchor points should not be included in the curve fit.
Quality Control Samples		<p>The sponsor should prepare any calibration standards and QCs from separate stock solutions. However, if the sponsor can demonstrate the precision and accuracy in one validation run using calibrators and QCs prepared from separate stock solutions, then the sponsor can use calibrators and QCs prepared from the same stock solution in subsequent runs. The sponsor should make up calibrators and QCs in lots of blank matrix that is free of interference or matrix effects.</p>

Selectivity and Specificity	<p>Selectivity of a ligand-binding assay is the ability to measure the analyte of interest in the presence of unrelated compounds in the matrix. Generally there is no extraction due to the inherent characteristics of macromolecules. Then, unrelated compounds present in matrix e.g. degrading enzymes, heterophilic antibodies or rheumatoid factor, may interfere with the analyte of interest in the ligand binding assay. Selectivity is tested by spiking at least 10 sources of sample matrix at or near the LLOQ. These sources should include lipemic and haemolysed samples. It is also strongly recommended that sources from relevant disease population be included. Selectivity should be evaluated at the low end of an assay where problems occur in most cases. It may be prudent also to evaluate selectivity at higher analyte concentrations. In cases where interference is concentration dependent, it is essential to determine the minimum concentration where interference occurs. It may be necessary to adjust the lower level of quantification accordingly, before assay validation. The accuracy should be within 20% (25% at the LLOQ) of the nominal spiked concentration in at least 80% of the matrices evaluated.</p> <p>Specificity of the binding reagent(s) refer(s) to its (their) ability to bind solely to the analyte of interest. Specificity is related to the concept of cross-reactivity. Ideally the binding reagent should be specific such that no cross-reactivity occurs with structurally "related compounds" (e.g. endogenous compounds, isoforms, variants forms of the analyte, or physico-chemically similar compounds) or with anticipated concomitant medication. During method development and validation, frequently these "related molecules" are not available. Evaluation of specificity may be conducted after the original validation is completed as more data on the behaviour of the analyte become available. Specificity should be tested with QC samples by adding increasing concentrations of available "related molecules" or drugs expected to be concomitantly administered, into drug-naïve sample matrix (matrix obtained from animals or subjects never exposed to the analyte) and measuring the accuracy of the macromolecule of interest at both LLOQ and ULOQ. The assay acceptance criteria of the QC samples should be within 25% of the nominal values.</p>	<p>During method development, the sponsor should verify that the substance being measured is the intended analyte to minimize or avoid interference.</p> <p>The sponsor should analyze blank samples of the appropriate biological matrix (e.g. plasma) from at least six (for CCs) or ten (for LBAs) individual sources. The sponsor should ensure that there are no matrix effects throughout the application of the method. Refer to Table 1 for details of selectivity and specificity requirements and acceptance criteria</p> <p>For LBAs, it is important to investigate any interference originating from structurally or physiologically similar analytes (i.e., exogenous interference) or matrix effects (i.e., endogenous interference). Investigating exogenous interference involves determining the cross-reactivity of molecules that could potentially interfere with the binding interaction, including molecules structurally related to the drug, any metabolites, concomitant medications (and their significant metabolites), or endogenous matrix components. The sponsor should evaluate each factor individually and in combination with the analyte of interest to determine its ability to cause interference. Matrix effects evaluation involves comparing calibration curves in multiple sources of the biological matrix against a calibration curve in the matrix for parallelism (serial dilution of incurred samples) and nonspecific binding. The sponsor should eliminate or minimize any significant interference. If such attempts are unsuccessful, the sponsor could consider the development of an orthogonal method to eliminate or minimize the interference.</p>
Sensitivity	<p>The lower limit of quantification (LLOQ) is the lowest concentration of analyte in a sample which can be quantified reliably, with an acceptable accuracy and precision. The LLOQ is considered being the lowest calibration standard (see Accuracy and Precision). (CC) In addition, the analyte signal of the LLOQ sample should be at least 5 times the signal of a blank sample.</p>	<p>The LLOQ defines the method sensitivity and should be determined during method development. The method should be developed and validated such that it will be able to meet the requirements necessary for the intended study samples. The LLOQ evaluation can be done separately or as part of the precision and accuracy assessment for the calibration range. The specific recommendations to validate sensitivity are listed in Table 1.</p>

<p>Accuracy, Precision, and Recovery</p>	<p>The accuracy of an analytical method describes the closeness of the determined value obtained by the method to the nominal concentration of the analyte (expressed in percentage). Accuracy should be assessed on samples spiked with known amounts of the analyte, the quality control samples (QC samples). The QC samples should be spiked independently from the calibration standards, using separately prepared stock solutions, unless the nominal concentration(s) of the stock solutions have been established. The QC samples are analysed against the calibration curve, and the obtained concentrations are compared with the nominal value. The accuracy should be reported as percent of the nominal value. Accuracy should be evaluated for the values of the QC samples obtained within a single run (the within run accuracy) and in different runs (the between-run accuracy). To enable evaluation of any trends over time within one run, it is recommended to demonstrate accuracy and precision of QC samples over at least one of the runs in a size equivalent to a prospective analytical run of study samples.</p> <p>The precision of the analytical method describes the closeness of repeated individual measures of analyte. Precision is expressed as the coefficient of variation (CV). Precision should be demonstrated for the LLOQ, low, medium and high QC samples, within a single run and between different runs, i.e. using the same runs and data as for the demonstration of accuracy.</p> <p>For the estimation of precision and accuracy QC samples should not be freshly prepared, but should be frozen and treated the same way as for the analysis of study samples.</p> <ul style="list-style-type: none"> • At least 5 QC samples (anticipated LLOQ, less than 3 times the LLOQ (low QC), around 30 - 50% of the calibration curve range (medium QC), and at least at 75% of the upper calibration curve range (high QC) and anticipated ULOQ) should be used to assess accuracy, precision and the total error of the method. • Validation should mimic the actual study samples analysis, i.e. in case a study sample is measured twice (i.e. using 2 wells) as recommended then during validation QCs should be analysed twice (i.e. using 2 wells per QC sample). • Measurements should be made across at least 6 independent assay runs over several days. • Regarding within-run and between-run accuracy, the mean concentration should be within 20% of the nominal value at each concentration level (25% at the LLOQ and ULOQ). • The within-run and between-run precision should not exceed 20% (25 % at LLOQ and ULOQ). • Furthermore the total error (i.e. sum of absolute value of the % relative error and % coefficient of variation) should not exceed 30% (40% at LLOQ and ULOQ). 	<p>Method validation experiments for estimating accuracy and precision should include a minimum six (for LBAs) independent runs (i.e., accuracy and precision (A & P) runs; see Table 1) conducted over several days.</p> <p>Each A & P run should include a calibration curve and multiple QC concentrations that are analyzed in replicates.</p> <p>The sponsor should use freshly prepared calibrators and QCs in all A & P runs. Use of freshly prepared QCs in all A & P runs is preferred; however, if this is not possible, the sponsor should use freshly prepared QCs in one or more A & P runs.</p> <p>Elements:</p> <ul style="list-style-type: none"> • A & P should be established with at least six independent A & P runs, five QC levels per run (LLOQ, L, M, H, ULOQ QC), and ≥ three replicates per QC level. <p>A & P Run Acceptance Criteria:</p> <ul style="list-style-type: none"> • The run should meet the calibration acceptance criteria and include the LLOQ calibrator. • This run has no QC acceptance criteria. <p>Accuracy: Within-run and between runs:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ± 20% of nominal concentrations; except ±25% at LLOQ, ULOQ <p>Precision: Within-run and between runs:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ± 20% CV, except ± 25% at LLOQ, ULOQ <p>Total Error:</p> <ul style="list-style-type: none"> • QCs should be ±30%, except at LLOQ, ULOQ ±40%
--	--	--

Stability	<p>Stability of the analyte is evaluated using samples of the low and high level QC samples as described before (section 4.1.9). As previously mentioned, the investigation of stability should cover short-term stability at room temperature or sample processing temperature and freeze-thaw stability. In addition, long-term freezer stability should be studied at each temperature at which study samples will be stored. The mean concentration at each level should be within 20% of the nominal concentration</p> <p>Stability studies should investigate the different storage conditions over time periods that equal or exceed those applied to the actual study samples.</p> <p>The following stability tests should be evaluated:</p> <ul style="list-style-type: none"> •stability of the stock solution and working solutions of the analyte and internal standard, •freeze and thaw stability of the analyte in the matrix from freezer storage conditions to room temperature or sample processing temperature, •short term stability of the analyte in matrix at room temperature or sample processing temperature, •long term stability of the analyte in matrix stored in the freezer, <p>In addition the following tests should be performed if applicable:</p> <ul style="list-style-type: none"> •stability of the processed sample at room temperature or under the storage conditions to be used during the study (dry extract or in the injection phase), •on-instrument/ autosampler stability of the processed sample at injector or autosampler temperature. <p>Regarding the freeze and thaw stability: The QC samples are stored and frozen in the freezer at the intended temperature and thereafter thawed at room or processing temperature. After complete thawing, samples are refrozen again applying the same conditions. At each cycle, samples should be frozen for at least 12 hours before they are thawed. The number of cycles in the freeze-thaw stability should equal or exceed that of the freeze/thaw cycles of study samples.</p> <p>Regarding long term stability of the analyte in matrix stored in the freezer: The QC samples should be stored in the freezer under the same storage conditions and at least for the same duration as the study samples. For small molecules it is considered acceptable to apply a bracketing approach, i.e. in case stability has been proved for instance at -70°C and -20°C, it is not necessary to investigate the stability at temperatures in between. For large molecules (such as peptides and proteins) stability should be studied at each temperature at which study samples will be stored. Study samples may be used in addition to QC samples, but the exclusive use of study samples is not considered sufficient as the nominal concentrations of those samples is not known. The results of the evaluation of long term stability should be available before the study report is issued.</p> <p>Regarding the stability of stock and working solutions: It is not needed to study the stability at each concentration level of working solutions and a bracketing approach can be used. It is not needed to study the stability of stable-isotope labelled internal standards if it is demonstrated that no isotope exchange reactions occur under the same conditions as the stability of the analyte was demonstrated.</p>	
-----------	--	--

Dilutional linearity	Because the narrow range of the calibration standard curve, it is necessary to demonstrate with QC samples that the analyte of interest, when present in concentrations exceeding the range of quantification (above ULOQ), can be accurately measured by the assay after dilution in blank matrix to bring the analyte concentrations into the validated range for analysis. An additional reason for conducting dilutional experiments is to detect a possible prozone or "hook effect" i.e. a signal suppression caused by high concentrations of analyte. The back-calculated concentration for each dilution should be within 20% of the nominal concentration after correction for dilution and the precision of the final concentrations across all the dilutions should not exceed 20%	Dilutional linearity demonstrates the accurate measurement of concentrations of spiked samples (i.e., QCs) exceeding the quantitation range when serially diluted to within the quantitative assay range.
Parallelism	If study samples are available, parallelism between the calibration standard curve and serially diluted study samples should be assessed to detect possible matrix effect or differing affinities for metabolites. A high concentration study sample (preferably close to Cmax) should be diluted to at least three concentrations with blank matrix. The precision between samples in a dilution series should not exceed 30%. In case the sample does not dilute linearly (i.e. in a non parallel manner), a procedure for reporting a result should be defined a priori. If study samples are not available during the validation of the method, parallelism should be evaluated as soon as study samples become available	Parallelism demonstrates that the serially diluted incurred sample response curve is parallel to the calibration curve. Parallelism is a performance characteristic that can detect potential matrix effects and interactions between critical reagents in an assay.

Область применения методики - измерение концентрации IL-1b в пробах культуральной жидкости клеток ТНР-1

Количество валидационных постановок - 6 независимых постановок в разные дни. Валидационные эксперименты включают в себя построение калибровочной кривой и определение правильности и прецизионности (вместе с определением чувствительности). Эксперименты по определению стабильности, специфичности и параллелизма могут быть проведены вместе или отдельно от валидационных испытаний

Элемент	Описание	Критерий приемлемости валидационного эксперимента	Критерий приемлемости аналитического эксперимента
Калибровочная кривая	<ul style="list-style-type: none"> Калибровочная кривая строится в трипликатах Каждая кривая состоит из 6 калибровочных уровней, якорных уровней и образца матрицы, не содержащий аналита (blank) Раствор стандартного калибровочного образца IL-1b в матрице (пг/мл), в скобках интервал, в который должны попадать рассчитанные по калибровочной кривой значения для калибровочных образцов для каждого уровня <p>2500 - якорный уровень 1250 - калибровочный уровень, ULOQ 625 - калибровочный уровень 312,5 - калибровочный уровень 156,25 - калибровочный уровень 78,125 - калибровочный уровень 39,0625 - калибровочный уровень, LLOQ 19,53125 - якорный уровень 9,765625 - якорный уровень 0 - blank (матрица)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Калибровочная кривая строится по минимум 6-ти калибровочным уровням Якорные уровни могут включаться в построение калибровочной кривой, blank исключается из построения Калибровочные стандарты 75% и минимум 6 калибровочных уровней должны соответствовать приведенным ниже критериям в каждом валидационном эксперименте: Рассчитанные по калибровочной кривой значения концентраций калибровочных стандартов должны быть в пределах $\pm 20\%$ от номинального (теоретического) значения концентраций ($\pm 25\%$ для LLOQ и ULOQ) Для blank и якорных точек значения правильности не рассчитываются Если калибровочный стандарт не удовлетворяет этим критериям, этот стандартный образец исключается, калибровочная кривая перестраивается без этого образца и заново проводится оценка правильности. Если все репликаты стандартных образцов LLOQ и ULOQ исключены, серия исключается из валидации, проводится поиск источника неуспеха и если необходимо, метод пересматривается. Если следующий валидационная серия также не принимается, метод необходимо пересмотреть перед стартом валидационного эксперимента 	--/--

Контроли качества (QC)	<ul style="list-style-type: none"> Контроли качества готовятся из стока, отличного от стока стандартного калибровочного образца для построения калибровочной кривой. Если приемлемая правильность и прецизионность (см ниже) будет продемонстрирована в одном валидационном эксперименте с применением калибраторов и контролей качества из разных стоков, в последующих экспериментах будут использоваться калибраторы и контроли качества из одного стока Концентрации IL-1b в образцах контролей качества, пг/мл 1250 - ULOQ 625 - H 312.5 - необязательный 156.25 - M 78.125 - L 39.0625 - LLOQ 	<ul style="list-style-type: none"> Для каждого валидационного эксперимента готовятся свежие образцы QC ≥3 уровня QC (L, M & H) в трипликатах в каждом валидационном эксперименте Соответствие критериям приемки калибровки ≥ 67% QCs должны лежать в диапазоне $\pm 20\%$ от номинальных (теоретических) значений ≥ 50% QCs на каждом уровне должны лежать в диапазоне $\pm 20\%$ от их номинальных концентраций 	<ul style="list-style-type: none"> ≥ 3 уровней QC (L, M & H) и ≥ 2 репликаторов на каждый уровень QC в каждом аналитическом эксперименте Общее число образцов QCs должно составлять 5% от образцов с неизвестным содержанием аналита, и быть не меньше 6 Если аналитический эксперимент состоит из отдельных серий, критерии приемки должны быть применены ко всему эксперименту и к каждой отдельной серии ≥ 67% QCs должны быть в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения ≥ 50% QCs на каждом уровне должны лежать в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения
Определение правильности и прецизионности		<ul style="list-style-type: none"> 5 уровней QC (LLOQ, L, M, H, ULOQ) Каждый уровень QC в трипликатах в 6 независимых экспериментах в разные дни Правильность: внутри анализа и между анализами: (средние значения) QCs должны лежать в диапазоне $\pm 20\%$ от номинального значения для каждого концентрационного уровня; за исключением $\pm 25\%$ для LLOQ, ULOQ Прецизионность: внутри анализа и между анализами: $\pm 20\%$ CV, за исключением $\pm 25\%$ для LLOQ, ULOQ Полная ошибка (сумма абсолютного значения относительной ошибки и CV): QCs должны быть $\pm 30\%$ от номинального значения, за исключением $\pm 40\%$ LLOQ, ULOQ 	
Чувствительность	<ul style="list-style-type: none"> Определение чувствительности является частью экспериментов по определению правильности и прецизионности Низший калибровочный стандарт на калибровочной кривой определяет чувствительность (LLOQ - 39 пг/мл IL-1b) 	<ul style="list-style-type: none"> Правильность должна быть $\pm 25\%$ от номинальной концентрации (при определении в трипликатах в 6 независимых валидационных экспериментах, проведенных в разные дни) Прецизионность должна быть $\pm 25\%$ CV (при определении в трипликатах в 6 независимых валидационных экспериментах, проведенных в разные дни) Полная ошибка $\leq 40\%$ 	<ul style="list-style-type: none"> Сигнал аналита с концентрацией LLOQ должен быть минимум в 5 раз выше сигнала матрицы (blank). П & П должна составлять $\pm 25\%$ от номинальной концентрации Если указанные выше критерии не соблюдены, в качестве LLOQ может быть выбран следующий калибровочный уровень или следующая низшая точка, если ULOQ не подошла (при условии, что итоговая калибровочная кривая соответствует критериям приемки) и калибровочная модель не меняется
Стабильность	<ul style="list-style-type: none"> Испытания проводятся отдельно от валидационных испытаний Предлагается оценить стабильность в условиях, которые встречались при разработке теста Стабильность в условиях проведения эксперимента по ингибированию инфламмосомы NLRP3 в THP-1 (4.5 ч при 37°C) Стабильность после однократной заморозки на 24 ч Стабильность после 24 часов при температуре +4 	<ul style="list-style-type: none"> Минимум 3 репликата L и H QC концентраций Правильность вычисленной средней концентрации на каждом уровне должна быть не хуже $\pm 20\%$ от номинальной концентрации 	

Параллелизм	<ul style="list-style-type: none"> Испытания проводятся отдельно от валидационных испытаний 	<ul style="list-style-type: none"> Из изучаемого образца с неизвестной высокой концентрацией аналита необходимо приготовить как минимум 3 разведения в матрице (с более низкими концентрациями аналита) Прецизионность между образцами в серии разведений не должна превышать 30% В случае, если сигнал от разведения образцов не ложится на параллельную калибровочной кривой кривую, необходимо отразить это в отчете о проведенном эксперименте и произвести расследование о наличии эффекта матрицы или взаимодействия между реагентами 	
Специфичность	<ul style="list-style-type: none"> Испытания проводятся отдельно от валидационных испытаний Необходимо проверить влияние TNF-а на правильность измерений IL-1b Необходимо проверить влияние IL-1a на правильность измерений IL-1b 	<ul style="list-style-type: none"> К образцам QCs на уровнях LLOQ и ULOQ необходимо добавить возрастающие количества интерферирующих соединений (TNF-а или IL-1a) Правильность измерения IL-1b в таких образцах должна лежать в пределах $\pm 25\%$ от номинального значения 	