ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 70150— 2022

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Общие требования и методы испытаний

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2022

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 15 июня 2022 г. № 470-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2022

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Общие требования и методы испытаний

PCR kits for the animal diseases diagnostics. General requirements and test methods

Дата введения — 2022—12—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на тест-системы и наборы реагентов, предназначенные для применения в ветеринарных лабораториях, выполняющих исследования для диагностики инфекционных болезней животных, или определения генетических детерминантов устойчивости микроорганизмов к антимикробным средствам методом ПЦР, а также распространяются на компоненты наборов реагентов и тест-систем, имеющих аналогичное функциональное назначение и изготовляемых отдельно.

Стандарт разработан в целях установления единых требований к организации испытаний тест-систем и наборов реагентов для диагностики инфекционных болезней животных или определения генетических детерминант устойчивости микроорганизмов к антимикробным средствам методом ПЦР.

Настоящий стандарт не распространяется на ПЦР тест-системы для выявления фитопатогенов, тестирования ГМО и идентификации сырьевого состава мясной и рыбной продукции, на диагностические наборы ИФА.

Стандарт не распространяется на стандартные образцы и калибраторы, требующие установления типа стандартного образца, используемые при валидации методов и внешней оценки качества лабораторных исследований.

Стандарт не распространяется на оборудование для диагностики *in vitro* (приборы, аппараты, анализаторы, аналитические комплексы, средства измерения и программное обеспечение указанного оборудования).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 28311 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31929—2013 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

Издание официальное

ГОСТ Р 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 51088 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации

ГОСТ Р 52682 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Термины и определения

ГОСТ Р 52833 (ИСО 22174:2005) Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячно издаваемого информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если изменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 52833, ГОСТ Р 52682, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **аналитическая чувствительность:** Минимальное количество целевых последовательностей (ДНК/РНК) в единице объема образца, которое может быть обнаружено при проведении анализа.

3.2 **аналитическая специфичность:** Способность метода обнаруживать только целевые последовательности ДНК/РНК.

3.3 **биологический материал:** Биологические жидкости, ткани и экскреты.

3.4 **воспроизводимость результатов:** Характеристика результатов испытаний, определяемая близостью результатов испытаний одного и того же объекта по единым методикам в соответствии с требованиями инструкции по применению тест-системы (набора реагентов) для диагностики *in vitro* с применением различных экземпляров оборудования, разными операторами, в разное время, в разных лабораториях.

3.5 **производитель:** Физическое или юридическое лицо, ответственное за производство, упаковывание и/или маркировку тест-системы ветеринарного назначения для диагностики *in vitro*, независимо от того, выполняет ли эти операции вышеупомянутое лицо или третья сторона от его имени.

3.6 **компонент:** Составная часть тест-системы, упакованная и маркированная.

Примечание — Компоненты могут содержать реактивы (ферменты, буферные растворы и разбавители), калибраторы, контрольные материалы и другие предметы и материалы по ГОСТ Р 51088.

3.7 **коэффициент вариации:** Показатель воспроизводимости результатов определения, рассчитанный как отношение значения среднего квадратического отклонения к среднему арифметическому значению.

3.8 **набор реагентов:** Комплект реагентов (реактивов), предназначенный выполнения определенного этапа ПЦР-исследования (проведения ПЦР, выделения нуклеиновых кислот, проведения реакции обратной транскрипции, выполнение УФ-детекции и др.).

3.9 **нормативный документ:** Документ, содержащий перечень определяемых по результатам соответствующих экспертиз показателей качества и (или) методов контроля качества лекарственной формы, описания биологических, биохимических, микробиологических, физико-химических, физических, химических и других методов анализа лекарственных средств для ветеринарного применения, требования к используемым в целях проведения данного анализа реактивам, титрованным растворам, индикаторам и установленный его производителем.

3.10 **пороговое значение *Ct*:** Значение цикла в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени», на котором регистрируется пересечение графика накопления

флуоресцентного сигнала (имеющего экспоненциальный рост и достоверно отличимого от приборного шума) с пороговой линией, определенной производителем или выставляемой как 10 % от максимального флуоресцентного сигнала. Его величина зависит от исходного количества копий матрицы и от эффективности амплификации ДНК.

3.11 **целевое назначение:** Область применения продукта, отраженная в технической документации, инструкции по применению и информации, предоставленной изготовителем изделия.

3.12 **срок годности тест-системы [набора реагентов]:** Интервал времени, в течение которого функциональные характеристики тест-системы (набора реагентов) ветеринарного назначения для диагностики *in vitro* при хранении в определенных условиях гарантированы.

3.13 **стабильность:** Способность набора реагентов или тест-системы ветеринарного назначения для диагностики *in vitro* сохранять свои свойства в пределах, заданных производителем.

3.14 **сходимость результатов:** Характеристика результатов испытаний, определяемая близостью результатов испытаний одного и того же объекта по одной и той же методике в соответствии с требованиями инструкции по применению тест-системы (набора реагентов) в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же экземпляра оборудования в течение короткого промежутка времени.

3.15 **тест-система:** Набор или несколько наборов реагентов и дополнительных компонентов, которые предназначены для выполнения специфического диагностического исследования *in vitro.*

3.16 **инструкция по применению:** Документ, регламентирующий порядок применения тест-системы (набора реагентов), а также сведения об утилизации или уничтожении.

3.17 **референсный набор:** Набор реагентов (тест-система) с подтвержденными характеристиками.

3.18 **целевые фрагменты:** Последовательности ДНК, выбранные производителем для амплификации.

В настоящем стандарте использованы следующие сокращения:

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

ПЦР — полимеразная цепная реакция;

ОТ — обратная транскрипция;

ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

НК — нуклеиновая кислота;

РНК — рибонуклеиновая кислота.

4 Общие требования

4.1 Требования к тест-системам (наборам реагентов)

4.1.1 Требования к комплектности, внешнему виду, упаковке и маркировке тест-системы (набора реагентов)

Комплектация тест-системы, внешний вид, состояние упаковки, а также маркировка тест-системы (набора реагентов) и ее компонентов должны соответствовать требованиям нормативного документа.

В комплект тест-системы (набора реагентов) должны быть включены:

- набор реагентов для амплификации специфического фрагмента ДНК;
- набор реагентов для проведения обратной транскрипции (при необходимости);
- набор контрольных образцов ПЦР (положительный контрольный образец ПЦР или положительный контрольный образец этапа выделения НК для использования на этапе ПЦР (при необходимости), отрицательный контрольный образец ПЦР);
- набор контрольных образцов этапа выделения НК (отрицательный контрольный образец этапа выделения НК, внутренний контрольный образец этапа выделения НК, положительный контрольный образец этапа выделения НК (при необходимости));
- набор реагентов для проведения электрофореза (при необходимости);
- набор реагентов для экстракции ДНК/РНК (при необходимости).

Объем каждого компонента должен быть достаточным для проведения заявленного количества исследований с учетом поступления единичных проб.

4.1.2 В комплект тест-системы (набора реагентов) должна быть вложена инструкция по применению.

4.1.3 Требования к характеристикам качества тест-систем (наборов реагентов) и их компонентам:

- характеристики компонентов тест-системы (набора реагентов) должны соответствовать требованиям, установленным в нормативном документе;
- все компоненты тест-системы (набора реагентов) должны быть устойчивы к процессу транспортирования;
- компоненты, предназначенные для хранения в морозильной камере при температуре не выше минус 16 °С, должны быть устойчивы к многократному замораживанию и оттаиванию;
- у тест-системы (набора реагентов) должны быть охарактеризованы целевое назначение, аналитическая специфичность и чувствительность;
- тест-система (набор реагентов) одной серии должна демонстрировать сходимые результаты для положительных контролей и отсутствие продуктов амплификации для отрицательного контроля;
- результаты, полученные при использовании тест-системы (набора реагентов) одной серии, должны быть воспроизводимыми.

4.2 Требования к предоставлению тест-систем (наборов реагентов) для проведения испытаний

4.2.1 Отбор тест-систем (наборов реагентов) для проведения испытаний производится согласно правилам отбора, указанным в ГОСТ 31929 (пункт 4.4). Тест-систему (набор реагентов) следует предоставлять для испытаний в количестве, необходимом для проведения полноценных испытаний, но не менее двух наборов одной серии.

4.3 Требования к организациям, проводящим тестирование ПЦР тест-систем (испытательным лабораториям)

4.3.1 Испытательные лаборатории должны иметь необходимые правоустанавливающие документы на осуществляемый вид деятельности в соответствии с законодательством РФ.

4.3.2 Общие требования к помещениям — по [1], ГОСТ Р 52833.

4.3.3 Помещение следует оборудовать общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

4.3.4 При работе с электроустановками требования к безопасности должны соответствовать ГОСТ Р 12.1.019.

4.3.5 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

4.3.6 При выполнении работ необходимо соблюдать требования [1] и [2].

4.3.7 При выполнении всех работ необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с химическими реактивами.

4.3.8 Требования к персоналу — по ГОСТ Р 52833, ГОСТ ISO/IEC 17025.

4.3.9 Персонал должен знать правила работы в лаборатории, использующей методы амплификации ДНК, санитарно-гигиенические нормы, правила охраны труда, пожарной и электробезопасности.

4.3.10 Средства измерения, дозирующие устройства, весы и другое оборудование, используемые при испытаниях, необходимо поверить в соответствии с требованиями, предъявляемыми к средствам измерения по ГОСТ 28311.

4.3.11 Высокотехнологичное лабораторное оборудование, используемое при проведении испытания, должно находиться в исправном состоянии с документально подтвержденным техническим обслуживанием.

4.4 Условия выполнения испытаний

4.4.1 Испытания на соответствие внешнего вида, комплектности, маркировки тест-системы (набора реагентов) проводятся визуально. Оценка специфичности и чувствительности, стабильности, сходимости и воспроизводимости результатов тест-систем (наборов реагентов) проводится с использованием контрольных образцов по параметрам полимеразной цепной реакции, указанным в инструкции по применению.

4.4.2 Контрольные образцы могут быть сформированы в виде панели в испытательной лаборатории либо предоставлены заказчиком. Состав панели для проведения испытаний согласуют с заказчиком.

4.4.3 В контрольную панель для проверки специфичности должны входить образцы, содержащие целевую ДНК/РНК возбудителя, методику обнаружения которого планируется контролировать с использованием данной панели, а также образцы, свободные от элементов, способных выступать в качестве целевой ДНК/РНК при проведении исследования с помощью данной методики. Панель может содержать один или несколько видов матрицы, в зависимости от цели формирования конкретной панели. В качестве образцов панели могут использоваться:

- штаммы коллекции микроорганизмов;
- вакцинные препараты, успешно прошедшие проверку в рамках процедур регистрации в том числе молекулярно-генетическими методами;
- биологический материал от животных, содержащий целевую ДНК/РНК возбудителя, методику обнаружения которого планируется контролировать;
- биологический материал от животных, не содержащий целевую ДНК/РНК возбудителя, методику обнаружения которого планируется контролировать.

В состав контрольной панели должно входить не менее трех положительных образцов, а также не менее 10 отрицательных образцов, содержащих ДНК или РНК близкородственных целевому микроорганизмов и других патогенов, которые могут вызывать у животного схожие клинические симптомы.

Панель для проверки специфичности, сформированную в испытательной лаборатории или предоставленную заказчиком, необходимо протестировать с помощью референсного ПЦР-набора (при наличии) для выявления целевой ДНК/РНК возбудителя, методику обнаружения которого планируется контролировать с использованием данной панели.

4.4.4 Контрольная панель образцов для определения чувствительности должна содержать серию (не менее трех проб) 10-кратных разведений целевой последовательности ДНК/РНК в разном биологическом материале, указанном в инструкции по применению тест-системы (набора реагентов). Концентрация целевой ДНК/РНК в последнем разведении в панели должна быть в 10 раз меньше заявленной чувствительности ПЦР тест-системы. В панели контрольных образцов для проведения испытаний на чувствительность могут использоваться штаммы микроорганизмов, содержащих целевую ДНК/РНК с известной концентрацией, либо образцы, содержащие генно-инженерную конструкцию с фрагментом целевой ДНК, с известной концентрацией.

4.4.5 Количество контрольных образцов должно быть достаточным для проведения полноценных испытаний.

Отдельные компоненты тест-систем (наборов-реагентов) могут быть запрошены дополнительно для проведения контрольных испытаний.

4.4.6 Если в состав тест-системы (набора регентов) не входит набор для экстракции ДНК/РНК, то для выделения ДНК/РНК следует использовать набор, указанный в инструкции по применению или в нормативном документе. Если в этих документах нет рекомендаций по использованию набора для экстракции ДНК/РНК, то выбор набора для экстракции осуществляет испытательная лаборатория.

5 Методы испытаний

5.1 Проверка внешнего вида, комплектности, маркировки тест-системы (набора реагентов)

5.1.1 Проверку внешнего вида, комплектности, маркировки компонентов тест-системы (набора реагентов) проводят визуально по следующим параметрам:

а) комплектность в соответствии с нормативным документом и инструкцией по применению;

б) внешний вид, целостность и состояние упаковки набора и его компонентов; наличие на упаковке указаний о способе хранения и транспортирования тест-системы (набора реагентов) или их компонентов;

в) наличие маркировки всех компонентов.

5.1.2 Каждый компонент тест-системы (набора реагентов) подвергают визуальному контролю для установления соответствия следующих показателей внешнего вида:

а) агрегатного состояния;

б) цвета;

в) прозрачности (для жидкостей);

г) наличия или отсутствия осадка либо хлопьев (для жидкостей);

д) консистенции;

е) наличия посторонних примесей.

5.1.3 Проверку соответствия объема каждого компонента заявленному количеству исследований проводят с использованием аттестованных средств измерений.

5.2 Оценка стабильности тест-системы (набора реагентов)

5.2.1 Тест-систему (набор реагентов) для амплификации проверяют:

- на устойчивость к температурному режиму транспортирования;
- устойчивость к многократному замораживанию и оттаиванию (при наличии компонентов, хранящихся при температуре не выше минус 16 °С, если предусмотрено их размораживание перед работой и/или не даны специальные рекомендации по работе с данными компонентами (например, аликвотирование перед началом работ)).

5.2.2 При проведении испытаний стабильности набор делят на три аликвоты, одна из которых является контрольной. Две другие используют для проверки стабильности. Контрольную аликвоту набора выдерживают при температурах хранения, указанных в инструкции по применению. Результаты амплификации контрольных образцов контрольной аликвоты сравнивают с результатами других аликвот после соответствующих испытаний стабильности.

5.2.3 Устойчивость к многократному замораживанию и оттаиванию тест-системы (набора реагентов) оценивают по результатам амплификации положительных контролей, входящих в состав набора после нескольких циклов замораживания и оттаивания каждого компонента из аликвоты набора для амплификации.

Расчет количества циклов (N) проводят по формуле

$$N = P/k + 1, \quad (1)$$

где P — число исследований, заявленное производителем для данной тест-системы (набора реагентов);

k — количество необходимых контрольных образцов согласно инструкции по применению.

Каждый цикл замораживания и оттаивания включает 30 мин оттаивания при комнатной температуре и 60 мин замораживания при заявленной температуре хранения. После завершения процедур замораживания/оттаивания проводят амплификацию положительного контроля в трех повторах и отрицательного контроля.

При испытаниях тест-систем (наборов реагентов) для выявления РНК возбудителей для оценки стабильности используют дополнительный контрольный образец, содержащий целевую РНК, и применяют его в сравнительных реакциях ОТ-ПЦР вместе с контрольными образцами, входящими в состав тест-системы (набора-реагентов).

Если инструкция содержит специальные рекомендации по работе с компонентами набора (например, аликвотирование, работа на льду и т. п.), то стабильность оценивают с учетом данных рекомендаций и особенностей компонента.

5.2.4 Для проверки устойчивости к процессу транспортирования аликвоту компонентов тест-системы (набора) хранят в термоизолирующей пенопластовой коробке во льду в течение максимального срока транспортирования, указанного в инструкции по применению. После завершения хранения в течение срока транспортирования ставят ПЦР положительного и отрицательного контролей в трех повторах (и дополнительного контрольного образца, содержащего целевую РНК, если применимо).

5.2.5 Оценку стабильности реагентов для наборов с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР осуществляют визуально после этапа электрофореза на основании соответствия размера полученного амплифицируемого фрагмента, а также отсутствия неспецифических фрагментов на электрофореграмме.

Соответствие размера амплифицируемого фрагмента определяют с использованием маркера молекулярных масс ДНК.

5.2.6 Тест-систему (набор реагентов) с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР считают устойчивой к условиям транспортирования реагентов и многократному замораживанию/оттаиванию, если после постановки сравнительных ПЦР контрольной аликвоты и аликвот после завершения процедур транспортирования и замораживания/оттаивания на электрофореграмме наблюдаются четкие фрагменты ожидаемого размера.

5.2.7 Стабильность реагентов для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени оценивают по значению коэффициента вариации значений Ct для положительного контроля (а также контрольного образца, содержащего целевую РНК, для про-

верки реагентов, предназначенных для проведения реакции ОТ или ОТ-ПЦР), полученных после проведения ПЦР соответствующих аликвот реагентов (после завершения процедур транспортировки или замораживания/оттаивания) и контрольной аликвоты.

Расчет коэффициента вариации значений *Ct* (*V*), %, проводят по формуле

$$V = \frac{\delta}{\bar{x}} \cdot 100\ \%, \qquad (2)$$

где $\bar{x}$ — среднее арифметическое полученных результатов *Ct*;

δ — среднеквадратическое отклонение:

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n}}, \qquad (3)$$

где *n* — количество значений *Ct*, полученных в испытании (для оценки стабильности с учетом повторов *n* = 6).

5.2.8 Тест-систему (набор реагентов) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени считают устойчивой к процессу транспортирования, а также к многократному замораживанию и оттаиванию, если значение коэффициента вариации не превышает 10 %.

5.3 Оценка аналитической специфичности тест-системы

5.3.1 Для подтверждения соответствия тест-системы (набора реагентов) заявленным характеристикам специфичности проводят лабораторные испытания с использованием контрольной панели образцов.

Из каждого образца контрольной панели проводят экстракцию ДНК/РНК и ПЦР (ОТ-ПЦР) согласно инструкции по применению тест-системы (набора реагентов) в двух повторностях.

5.3.2 Испытания проводят двукратно, в разные дни, разными исполнителями, на разных приборах. Оценку характеристик специфичности проводят по результатам испытаний.

5.3.3 Оценку специфичности ПЦР для наборов с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР осуществляют визуально, на основании соответствия размера фрагмента, полученного после амплификации, а также отсутствия неспецифических фрагментов на электрофореграмме. Соответствие размера амплифицируемого фрагмента определяют с помощью маркера молекулярных масс ДНК.

5.3.4 Если результатом испытания является отсутствие на электрофореграмме продуктов амплификации для образцов панели, не содержащих целевые фрагменты ДНК/РНК, и наличие продуктов амплификации соответствующего размера для образцов панели, содержащих целевые фрагменты ДНК/РНК, специфичность тест-системы (набора реагентов) считают 100 %-ной для данной панели образцов.

5.3.5 Оценку специфичности ПЦР тест-систем с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляют на основании наличия или отсутствия значений *Ct* для образцов контрольной панели.

5.3.6 Для тест-систем с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени должны отсутствовать значения *Ct* (по каналам, определяющим амплификацию целевой ДНК) для образцов контрольной панели, не содержащих целевые фрагменты ДНК, и присутствовать соответствующие значения *Ct* для образцов, содержащих целевые фрагменты ДНК.

5.4 Оценка аналитической чувствительности тест-системы

5.4.1 Для подтверждения соответствия тест-системы (набора реагентов) заявленным характеристикам чувствительности проводят лабораторные испытания тест-системы с использованием контрольной панели образцов согласно параметрам, указанным в инструкции по применению.

Из каждого образца контрольной панели проводят экстракцию ДНК/РНК в двух повторах. Каждый полученный повтор амплифицируют в двух повторах.

5.4.2 Испытания проводят двукратно, в разные дни, разными исполнителями, на разных приборах. Оценку характеристик чувствительности проводят по результатам испытаний.

5.4.3 Оценку чувствительности ПЦР для тест-систем (наборов реагентов) с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР осуществляют визуально, на основании наличия или отсутствия полученного амплифицируемого фрагмента для образцов контрольной панели с разной концентрацией ДНК/РНК.

5.4.4 Оценку чувствительности тест-систем (наборов реагентов) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляют на основании наличия или отсутствия значений *Ct* для образцов контрольной панели с разной концентрацией ДНК/РНК.

5.4.5 Для тест-систем с электрофоретической и гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации положительными должны быть все повторы, содержащие целевые фрагменты ДНК в концентрации, превышающей или равной заявленной чувствительности тест-системы.

5.4.6 Чувствительность тест-системы (набора реагентов) считают соответствующей заявленным характеристикам при получении положительных результатов ПЦР для всех повторов контрольных образцов с концентрацией, соответствующей заявленной.

5.5 Оценка сходимости и воспроизводимости результатов

5.5.1 Для оценки сходимости результатов проводят серию испытаний амплификации контрольных образцов, входящих в комплект анализируемой тест-системы. Для проверки сходимости проводят ПЦР одним оператором, на одном приборе, в один день отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца в 10 повторах.

При испытаниях тест-систем (наборов реагентов) для выявления РНК возбудителей для оценки сходимости используют дополнительный контрольный образец, содержащий целевую РНК. 10 повторов образца используют в постановке ОТ-ПЦР вместе с контрольными образцами, входящими в состав тест-системы.

5.5.2 Оценку сходимости результатов ПЦР для наборов с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР осуществляют визуально, на основании соответствия размера и яркости полученного амплифицируемого фрагмента, а также отсутствия неспецифических фрагментов на электрофореграмме.

Результаты считают сходимыми, если после постановки ПЦР для всех повторов положительного контроля, а также образца, содержащего целевую РНК (если применимо), на электрофореграмме наблюдаются четкие фрагменты ожидаемого размера.

Оценку сходимости результатов ПЦР для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляют на основании расчета коэффициента вариации значений *Ct* (*V*) для положительного контроля (образца, содержащего целевую РНК) по формулам (2), (3), где $n = 10$.

Результаты считают сходимыми, если коэффициент вариации (*V*) не превышает 5 %.

5.5.3 Воспроизводимость результатов оценивают по результатам амплификации положительного контрольного образца. Амплификацию отрицательного контрольного образца и положительного контрольного образца в 10 повторах осуществляют двумя операторами на разных приборах в разные дни.

5.5.4 Оценку воспроизводимости результатов ПЦР для наборов с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР осуществляют визуально, на основании соответствия размера и яркости полученного амплифицируемого фрагмента, а также отсутствия неспецифических фрагментов на электрофореграмме.

5.5.5 Оценку воспроизводимости результатов ПЦР для наборов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени осуществляют на основании расчета коэффициента вариации значений *Ct* (*V*).

Расчет проводят по формулам (2), (3), где $n = 10$.

Результаты считают воспроизводимыми, если коэффициент вариации (*V*) не превышает 10 %.

Библиография

[1] МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности

[2] СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней

УДК 619:543.061:543.9:006.354 ОКС 11.220

Ключевые слова: ПЦР, тест-система, набор реагентов, полимеразная цепная реакция, диагностика инфекционных болезней животных, чувствительность, специфичность, стабильность, сходимость, воспроизводимость

Редактор *З.А. Лиманская*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 16.06.2022. Подписано в печать 07.07.2022. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1,24.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «РСТ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru