ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 20391-2— 2023

Биотехнология

ПОДСЧЕТ КЛЕТОК

Часть 2

Планирование эксперимента и статистический анализ количественной оценки эффективности метода подсчета

(ISO 20391-2:2019, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2023

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский институт стандартизации» (ФГБУ «Институт стандартизации») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 августа 2023 г. № 632-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 20391-2:2019 «Биотехнология. Подсчет клеток. Часть 2. Планирование эксперимента и статистический анализ количественной оценки эффективности метода подсчета» («Biotechnology — Cell counting — Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ИСО/ТК 276 «Биотехнология» Международной организации по стандартизации (ИСО).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочного международного стандарта соответствующий ему национальный стандарт, сведения о котором приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 Некоторые элементы настоящего стандарта могут являться объектами патентных прав

*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

© ISO, 2019
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2023

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения, обозначения и сокращения 1
4 Сущность эксперимента 7
5 План эксперимента 9
6 Статистические методы 13
7 Отчетность 18
Приложение А (справочное) Метод оценки вклада погрешности пипетирования в надежность разбавления 20
Приложение В (обязательное) Метод вычисления сглаженных погрешностей $e_{smoothed}$ при получении набора измеренных долей разбавления $DF_{measured}$ 23
Приложение С (справочное) Примерные формулы для вычисления *PI* 25
Приложение D (справочное) Сценарий 1. Оценка качества разового процесса подсчета клеток 27
Приложение Е (справочное) Сценарий 2. Сопоставление качества нескольких процессов подсчета клеток 32
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочного международного стандарта национальному стандарту 43
Библиография 44

Введение

Подсчет клеток влияет на многие аспекты биотехнологии, от биопроизводства до медицинской диагностики и передовой терапии. Подсчет клеток выполняет функции технологического контроля качества, или его результаты используют в процессе принятия решений. Подсчитанное количество клеток также является важным параметром многих анализов, включая оценку удельной активности и жизненного потенциала, которые часто нормализуют к подсчитанному количеству клеток для обеспечения возможности сравнения данных.

Обычно подсчитанное количество клеток выражают как концентрацию, отражающую общее количество клеток в популяции (общее количество клеток в суспензии) или субпопуляции (дифференциальное количество клеток). Развитие технологий приборостроения привело к появлению целого ряда методик и специальной аппаратуры для подсчета общего и/или дифференциального количества клеток. При отсутствии доступных стандартных образцов или экспериментально проверенных данных трудно определить точность метода измерений. Ситуацию усугубляет сложность приготовления биологических препаратов (например, поиск необходимых типов клеток, определение источников поставок и т. д.). Существуют несколько стандартов, устанавливающих методы подсчета количества клеток, отражающих специфику их конкретного применения или использования особых измерительных систем (см. ИСО 20391-1 и [16]). В некоторых из этих методов применяют подход сопоставимости, при котором результат каждого нового метода испытаний для подсчета количества клеток сравнивают с результатами, полученными при выполнении более распространенного метода подсчета. Но несмотря на то, что такой сопоставимый подход позволяет сравнивать данные новых исследований с результатами традиционных методов, он не отражает аспекты качества этих измерительных процессов [17]. В связи с отсутствием стандартных образцов или стандартных методов [17] остается необходимость разработки методов обеспечения качества определения количества клеток.

Настоящий стандарт устанавливает метод оценки аспектов качества определения количества клеток за счет использования серии разбавлений при проведении эксперимента. По этой схеме выбирают показатели качества для оценки эффективности метода определения количества клеток. В частности, показатели качества дают возможность оценить точность и пропорциональность метода определения количества клеток. Этот подход особенно полезен при невозможности определения точности (например, при отсутствии отслеживаемых связей со стандартным методом или стандартным образцом), а также он применим в общем плане к таким аспектам, как валидация и мониторинг качества процедуры определения количества клеток [17].

Требования, приведенные в настоящем стандарте, определяют достоверность данных выбранного метода определения количества клеток. Этот подход используют для выбора или оптимизации процесса измерения заданного клеточного препарата. Также этот подход позволяет получить вспомогательные параметры эффективности, которые можно использовать при аттестации характеристик эффективности конкретного метода определения количества клеток.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биотехнология

ПОДСЧЕТ КЛЕТОК

Часть 2

Планирование эксперимента и статистический анализ количественной оценки эффективности метода подсчета

Biotechnology. Cell counting.
Part 2. Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance

Дата введения — 2024—03—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод оценки аспектов качества определения количества клеток конкретного клеточного препарата посредством набора показателей качества, установленных на основании плана эксперимента с серией разбавлений и статистического анализа данных. В основе показателей качества лежат повторяемость измерений и степень соответствия результатов идеальной пропорциональной реакции на разбавление. Данный метод применяют к определению общего и дифференциального количеств клеток, а также к способам прямого и косвенного подсчетов при условии соответствия процедуры измерения критериям плана эксперимента (например, клетки, суспендированные в растворе).

Данный метод является наиболее подходящим в период разработки, оптимизации, валидации, оценки и/или верификации процедуры подсчета количества клеток.

Указанный метод применяют при отсутствии надлежащих стандартных образцов для оценки точности измерений. Однако, он напрямую не обеспечивает точность подсчета количества клеток.

Данный метод главным образом применяют для исследований эукариотических клеток.

Примечание — Существуют несколько международных и национальных стандартов, устанавливающих методы подсчета количества клеток, отражающих специфику их конкретного применения. При необходимости используют действующие стандарты при выполнении работ в рамках их области применения.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий стандарт [для датированной ссылки применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированной — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 20391-1, *Биотехнология. Подсчет клеток. Часть 1. Общее руководство по методам подсчета клеток*

3 Термины, определения, обозначения и сокращения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

ИСО и МЭК ведут терминологические базы данных для использования в области стандартизации по следующим адресам:

- электропедия МЭК: доступна на gost.e-ecolog.ru
- платформа онлайн-просмотра ИСО: доступна на gost.e-ecolog.ru

Издание официальное

3.1 Термины и определения

3.1.1 **точность (измерения)** (accuracy): Близость измеренного значения величины к истинному значению измеряемой величины.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 2.13, с изменениями — примечания удалены]

3.1.2 **смещение (измерения)** (bias): Оценка систематической погрешности измерения.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 2.18]

Примечание 1 — Систематическая погрешность измерения представляет собой составляющую погрешности измерения, которая остается постоянной или закономерно изменяется при повторных измерениях. Стандартным значением величины для систематической погрешности измерения является истинное значение величины или измеренное значение величины эталона с пренебрежимо малой неопределенностью измерений, или принятое значение величины.

Примечание 2 — Данный термин также определяют как разницу между ожидаемым результатом испытания и принятым стандартным значением (см. ИСО 3534-1).

3.1.3 **концентрация клеток** (cell concentration): Количество клеток на единицу объема.

Примечание 1 — Этот термин обычно используют для обозначения количества клеток в суспензии (например, количество клеток на миллилитр).

Примечание 2 — Термин «концентрация клеток» также относят к общему количеству клеток или количеству клеток определенной подсистемы в объеме жидкости (например, количество жизнеспособных клеток на миллилитр).

3.1.4 **количество клеток** (cell count): Дискретное число клеток.

Примечание 1 — Количество клеток, как правило, выражают в виде концентрации клеток.

3.1.5 **подсчет клеток** (cell counting): Измерительный процесс определения количества клеток.

3.1.6 **клеточная суспензия** (cell suspension): Клетки, диспергированные в жидкой среде.

3.1.7 **продукты клеточного распада (в клеточной суспензии)** (debris): Фрагменты клеток и/или частицы вещества биологического и не биологического происхождения.

3.1.8 **дифференциальное количество клеток** (differential cell count): Численность подмножества клеток, которые отличаются от других субпопуляций клеток, по крайней мере, одним отличительным признаком, идентифицированным в процессе измерения.

Примечание 1 — Концентрации, выведенные из дифференциального количества клеток, могут быть выражены в виде абсолютной концентрации или относительной величины (т. е. в процентах) по отношению к общей численности клеток или иной предварительно определенной популяции.

3.1.9 **доля разбавления** (dilution fraction): Доля снижения концентрации растворенного вещества в растворе по сравнению с первоначальной концентрацией.

Примечание 1 — Долю разбавления измеряют в диапазоне от 0 до 1.

Примечание 2 — Долю разбавления также называют «степенью разбавления» или «коэффициентом разбавления».

Пример — Степень снижения концентрации клеток (растворенное вещество) в клеточной суспензии (раствор) по сравнению с первоначальной концентрацией клеток в суспензии.

3.1.10 **серия разбавлений** (dilution series): Ряд растворов, имеющих последовательно повышающиеся или последовательно понижающиеся концентрации одного и того же вещества.

Примечание 1 — Серию разбавлений можно получить способом последовательного или индивидуального разбавления.

Примечание 2 — В отношении клеточной суспензии термин «серия разбавлений» означает ряд суспензий с последовательно повышающимися или последовательно понижающимися концентрациями клеток.

3.1.11 **планирование эксперимента** (experimental design): Процесс планирования исследования для достижения поставленных целей.

Примечание 1 — План распределения условий проведения эксперимента среди участников и статистический анализ выполнения этого плана. Обычно сюда входит определение независимых переменных величин, зависимых переменных величин, количества участников и метод отбора проб, порядок распределения участников по условиям эксперимента, а также последовательность выдачи тестовых заданий.

3.1.12 **индивидуальное разбавление** (independent dilution): Серия разбавлений, в которой каждый раствор готовят отдельно от других.

Примечание 1 — В общем, серию индивидуальных разбавлений готовят из общего базового раствора с учетом заранее заданной (или целевой) доли разбавления.

3.1.13 **промежуточная прецизионность** (intermediate precision): Один из наборов условий измерений, включающий применение одной и той же методики измерений, то же местоположение и выполнение повторных измерений на одном и том же или подобных объектах в течение длительного периода времени, а также другие условия, которые могут изменяться.

Примечание 1 — Изменения могут включать новые калибровки, калибраторы, измерительные системы, а также новых операторов.

Примечание 2 — Системная погрешность оператора относится, в частности, к ошибкам, допускаемым операторами в силу недостатка опыта работы.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 2.22, с изменениями — удалено примечание 3]

3.1.14 **предел количественного определения (содержания клеток);** LoQ (limit of quantitation; LoQ): Наименьшее количество аналита в пробе, которое можно определить количественно конкретным аналитическим методом с требуемой прецизионностью и точностью.

Примечание 1 — Предел количественного определения описывает количественный анализ низких уровней клеток в матрицах пробы.

3.1.15 **линейность** (linearity): Способность получать результаты измерений, которые прямо или косвенно посредством конкретных математических преобразований будут пропорциональны количеству клеток в пределах заданного диапазона.

[[14], с изменениями]

Примечание 1 — Для подсчета клеток, термин «концентрация аналита» означает концентрацию клеток (общую или дифференциальную) в пробе.

Примечание 2 — Когда совокупность измерений демонстрирует линейность в диапазоне заданных входных параметров (при всех других неизменных входных параметрах и условиях измерений), ожидаемое значение измеряемой величины выражают как сумму постоянных составляющих систематической погрешности и входного параметра, помноженного на фиксированную константу.

3.1.16 **измеряемая величина** (measurand): Величина, подлежащая измерению.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 2.3 с изменениями — удалены примечание и примеры]

3.1.17 **измеренная доля разбавления** (measured dilution fraction): Доля разбавления, измеренная с помощью поверенных приборов.

Примечание 1 — Например, количество жидкости можно проверить путем измерения массы жидкости (с учетом ее плотности) с использованием калиброванных и контролируемых весов надлежащей чувствительности.

3.1.18 **процесс измерения (подсчет количества клеток)** (measurement process): Весь процесс определения количества клеток.

Примечание 1 — Процесс измерения включает приготовление проб, системы измерений, параметры настройки [например, выбор апертуры, гейтирование (гейтинг) размера клеток, кратность увеличения, время подсветки и т. д.] и анализ данных.

3.1.19 **прецизионность измерения** (measurement precision): Близость между показаниями или измеренными значениями величины, полученными при повторных измерениях для одного и того же или аналогичных объектов при заданных условиях.

Примечание 1 — Прецизионность измерения обычно имеет числовое выражение в виде расхождения результатов, например стандартное отклонение, вариативность или коэффициент вариативности (CV) в заданных условиях измерения.

Примечание 2 — Термин «заданные условия» может означать, например повторяемость измерений, промежуточную прецизионность измерений или воспроизводимость измерений (см. ISO 5725-1).

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 2.15 с изменениями — удалены примечание 3 и примечание 4.]

3.1.20 **пропорциональность** (proportionality): Характеристика, демонстрируемая совокупностью измерений, в которой при изменении значения входного параметра (и неизменности всех других вводных и условий измерения) отношение ожидаемого значения измерения к значению этого входного параметра, при котором были произведены измерения, остается постоянным.

Примечание 1 — Для подсчета клеток, термин «концентрация аналита» означает концентрацию клеток (общую или дифференциальную) в пробе.

Примечание 2 — Если ряд измерений показывает пропорциональность на некотором диапазоне данного входного параметра, то ожидаемое значение измерений можно выразить как произведение входного параметра на фиксированную константу, в отсутствии систематической погрешности.

Примечание 3 — Когда ряд проведенных измерений демонстрирует пропорциональность в диапазоне заданных входных параметров, тогда $Y = cX$, где Y — ожидаемое значение измерений — выражают как входной параметр X, помноженный на фиксированную константу c, без составляющей систематической погрешности.

3.1.21 **константа пропорциональности** (proportionality constant): Постоянный множитель, напрямую соотносящий измеряемую величину и входной параметр.

3.1.22 **индекс пропорциональности (подсчета клеток)** (proportionality index): Мера отклонения от пропорциональности в экспериментальной схеме серии разбавлений.

Примечание 1 — Индекс пропорциональности *PI* является специфичным для клеточного препарата и подлежащего оценке подсчета клеток.

3.1.23 **p-значение** (p-value): Выходные данные для статистической проверки гипотезы

Примечание 1 — *P*-значение получают следующим образом: устанавливают распределение статистики при выполнении нулевой гипотезы, т. е. распределение статистики на основе предположения, что нулевая гипотеза верна. *P*-значение вычисляют на основании нулевого распределения как вероятности соблюдения тестовой статистики, имеющей такие же предельные значения или даже превышающие предельные значения тестовой статистики, полученной на основании фактических данных.

3.1.24 **величина** (quantity): Свойство материального объекта или явления, общее в качественном отношении для многих объектов или явлений, но в количественном отношении индивидуальное для каждого из них.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 1.1 с изменениями — удалены примечания и примеры]

3.1.25 **диапазон** (range): Количественный интервал, ограниченный округленными или приблизительными предельными показателями.

3.1.26 **стандартный образец; эталонный образец** (reference material; reference standard): Материал, достаточно однородный и стабильный в отношении определенных свойств для того, чтобы использовать его при измерении или при оценивании качественных свойств в соответствии с предполагаемым назначением.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 5.13 с изменениями — удалены примечания и примеры]

3.1.27 **референтный метод; референтная процедура выполнения измерений** (reference method; reference measurement procedure): Тщательно изученная методика измерений, дающая значения с неопределенностью измерения, соответствующей предполагаемому применению, особенно при оценке правильности других методик измерения для той же величины и при определении характеристик стандартного образца.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 2.7]

3.1.28 **повторяемость** (repeatability): Прецизионность измерений в заданных условиях измерения.

Примечание 1 — Повторяемость также можно рассматривать как степень совпадения результатов последовательных измерений одной и той же измеряемой величины в тех же условиях [17].

3.1.29 **остаточная погрешность (количественный анализ)** (residual): Численная разница между наблюдаемым значением зависимой переменной и прогнозным значением.

3.1.30 **проба** (sample): Одна или несколько частей (материала), взятых из системы и предназначенных для того, чтобы получить информацию относительно системы.

Примечание 1 — Часто проба служит основанием для принятия решения в отношении системы или продукции.

Примечание 2 — Например, небольшое количество или аликвота клеточной суспензии, взятой из большого объема этого материала [17].

[ISO 15198:2004, 3.22 с изменениями — термин «популяция» заменен термином «система», добавлены примечания]

3.1.31 **серийное разбавление** (serial dilution): Поэтапное разбавление вещества в растворе, при котором снижение концентрации носит накопительный характер, то есть, уменьшение значения происходит при каждом последующем разбавлении.

Примечание 1 — В серийно разбавленных растворах количественные показатели всех растворов, кроме первого, находятся в зависимости от предыдущего разбавления.

3.1.32 **базовый клеточный раствор** (stock cell solution): Достаточно устойчивая (во времени) клеточная суспензия относительно высокой концентрации, пригодная для разбавления до уровня рабочих экспериментальных растворов.

3.1.33 **систематическая погрешность** (systematic error): Составляющая погрешности измерения, остающаяся постоянной или же закономерно изменяющаяся при повторных измерениях одной и той же величины.

Примечание 1 — Стандартным значением величины для систематической погрешности измерения является истинное значение величины или измеренное значение величины эталона с пренебрежимо малой неопределенностью измерений, или принятое значение величины

Примечание 2 — Систематическая погрешность измерения и ее причины могут быть известны или неизвестны. Для компенсации известной систематической погрешности может вводиться поправка.

Примечание 3 — Систематическая погрешность измерения равна разности погрешности измерения и случайной погрешности измерения.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 2.17]

3.1.34 **целевая доля разбавления** (target dilution fraction): Доля разбавления, получаемая при добавлении заданного количества раствора.

3.1.35 **испытательный образец** (test sample): Небольшая аликвота, взятая из пробы материала и подготовленная для измерений заданным методом.

Примечание 1 — Обычно испытательные образцы являются репрезентативными образцами пробы, из которой проводят отбор материала, иногда их называют «репрезентативными испытательными образцами».

3.1.36 **общий подсчет клеток** (total cell count): Подсчет всех клеток, независимо от их характерных признаков.

3.1.37 **точный подсчет; точное количественное значение** (true count; true quantity value): Количественное значение, соответствующее определению термина «количество».

Примечание 1 — При подходе, основанном на прогнозируемой ошибке, точное количественное значение считают уникальной величиной, которую практически невозможно установить. Подход на основе неопределенности допускает, что, благодаря очевидному и неполному количеству элементов в описании термина «количество», не может быть установлено единое точное количественное значение, но возможно существование набора точных количественных значений, соответствующих определению. Однако, этот набор значений на практике установить невозможно. В других подходах полностью отсутствует понятие «точного количественного значения», исследователи применяют концепцию метрологической совместимости результатов измерений для оценки их адекватности.

Примечание 2 — В особых случаях, при наличии фундаментальной константы, считают, что «количество» имеет единое точное количественное значение.

Примечание 3 — Когда дефинициальную неопределенность, связанную с измеряемой величиной, считают ничтожной в сравнении с другими компонентами неопределенности измерения, считают, что измеряемая величина имеет «существенно уникальное» точное количественное значение. Этот подход принят в Руководстве ISO/IEC Guide 98-3 и сопутствующих документах, в которых слово «точный» считают излишним.

[Руководство ISO/IEC Guide 99:2007, 2.11 с изменениями — Документ «Руководство по погрешностям в измерении» (GUM) заменен на руководство «ISO/IEC Guide 98-3»]

3.1.38 **валидация** (validation): Подтверждение посредством представления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены.

[ISO 9000:2015, 3.8.13 с изменениями — удалены примечания]

3.1.39 **вариативность** (variability): Количественное выражение функции распределения вероятностей в отношении переменной величины, параметра или условия.

[ISO 16732-1:2012, 3.29]

3.2 Список сокращений и условных обозначений

Список сокращений и условных обозначений в порядке употребления

Сокращение или обозначение	Описание
β	Константа пропорциональности, которая может отличаться от значения k_{ideal}

Продолжение

Сокращение или обозначение	Описание
β_1	Скалярный коэффициент, выведенный при подгонке модели пропорциональности
CV	Коэффициент вариативности
CV_{ij}	Коэффициент вариативности для набора из K_{ij} — числа параллельных наблюдений за репрезентативным испытательным образцом j, при целевой доле разбавления df_i
$\%\overline{CV}_{df_i}$	Средний процент вариативности CV для набора из n_i — числа репрезентативных испытательных образцов, при целевых долях разбавления df_i
c_{ideal}	Константа идеальной пропорциональности
tc_j	Теоретический/точный подсчет материала образца j
DF	Доля разбавления
DF_j	Доля разбавления материала образца j, контролируемая процессом измерения или установленная экспериментально
tDF	Теоретическая/точная доля разбавления
DF	Набор уникальных целевых долей разбавления
$DF_{measured}$	Набор измеренных долей разбавления
df_i	Целевая доля разбавления
df_{ij}	Измеренная доля разбавления
e	Остаточная погрешность между данными и подобранной моделью
$e^{smoothed}$	Сглаженная остаточная погрешность между обработанным количеством подсчитанных клеток и подобранной моделью пропорциональности
$e_i^{smoothed}$	Сглаженная остаточная погрешность при использовании доли целевого разбавления для анализа пропорциональности (сглаженная остаточная погрешность для каждого целевого значения доли разбавления DF)
$e_{ij}^{smoothed}$	Сглаженная остаточная погрешность при использовании измеренной доли разбавления для анализа пропорциональности (сглаженная остаточная погрешность для каждого репрезентативного испытательного образца)
$E(oc_j)$	Ожидаемое значение наблюдаемых подсчетов
i	Индекс целевой доли разбавления
j	Индекс реплицированного репрезентативного испытательного образца
k	Индекс параллельного измерения репрезентативного испытательного образца
K_{ij}	Количество параллельных измерений репрезентативного испытательного образца
I	Количество целевых долей разбавления
n_i	Количество реплицированных репрезентативных испытательных образцов с целевой долей разбавления
PI	Индекс пропорциональности
R^2	Коэффициент определенности
Y_{ijk}	Наблюдаемое значение измерения k репрезентативного испытательного образца j с целевой долей разбавления i
$\overline{Y}_{df_i}$	Среднее количество подсчитанных клеток для набора из n_i — числа репрезентативных испытательных образцов с целевыми долями разбавления df_i
$\overline{Y}_{ij.}$	Среднее значение по серии из K_{ij} — числа повторных наблюдений за j^{th} репрезентативным испытательным образцом df_i

Окончание

Сокращение или обозначение	Описание
$\overline{Y}\ldots$	Среднее значение $\overline{Y}_{ij.}$ по индивидуальным репрезентативным испытательным образцам j для набора n_j реплицированных репрезентативных испытательных образцов
$\lambda_{DF_k}^{\text{proportional}}$	Расчетное количество подсчитанных клеток с DF_k с использованием коэффициента β_1, полученного из модели пропорциональности $\lambda_i^{\text{proportional}}$
$\lambda_{ij}^{\text{proportional}}$	Модель пропорциональности $\overline{Y}_{ij}$ относительно df_{ij}

4 Сущность эксперимента

4.1 Общие положения

Высокая достоверность результатов подсчета клеток предполагает, что измерения выполняют с надлежащей точностью и прецизионностью [15]. Для контролируемой серии разбавлений можно использовать концепцию пропорциональности в качестве внутреннего стандарта, а отклонение от пропорциональности может служить альтернативой прямой оценки точности результатов [16]. В частном случае использование плана эксперимента и статистического анализа, показателей качества, описывающих отклонение от пропорциональности, и коэффициента вариативности *CV* оценивают для определения аспектов качества процесса подсчета клеток.

Показатели качества используют для оценки общего качества процесса подсчета клеток, когда процесс измерения включает приготовление и обработку проб, получение и обработку/корректировку данных.

В идеальной ситуации точность подсчета оценивают с использованием стандартного метода и/или эталонного образца с известным «точным» значением результата (дополнительная информация приведена в ИСО 5725-1 и ИСО 5725-2). При отсутствии надлежащего эталонного образца или недоступности стандартного метода качество подсчета клеток можно косвенно оценить по степени выдерживания или отклонения от фундаментального принципа пропорциональности, предполагающего, что количество подсчитанных клеток должно быть пропорционально доле разбавления *DF* в идеальных экспериментальных условиях. Отклонение от пропорциональности будет означать появление систематической ошибки измерения, снижающей общую степень достоверности подсчета.

Прецизионность подсчета клеток указывает на степень совпадения результатов, полученных при повторных измерениях того же самого или аналогичного клеточного препарата в заданных условиях. Экспериментальные данные, имеющие низкую прецизионность, но среднее значение результатов подсчета клеток, хорошо вписывающиеся в принцип пропорциональности, снижают качество процесса измерения. Низкая прецизионность измерений (то есть, большая случайная погрешность) может скрывать отклонения от пропорциональности.

4.2 Пропорциональность

Теоретические точные подсчеты образцов, взятых из общего, идеально гомогенизированного базового раствора, связаны между собой соответствующими долями разбавления в соответствии с формулой

$$tc_j = c_{\text{ideal}} \cdot tDF_j, \tag{1}$$

где tc_j — теоретическое точное количество подсчета для образца j;

c_{ideal} — неизвестная константа пропорциональности, равная теоретическому точному подсчету для индивидуального образца;

tDF_j — точная доля разбавления для образца j.

При строгом контроле доли разбавления теоретическое значение tDF_j может быть аппроксимировано при помощи DF_j в соответствии с формулой

$$tDF_j \cong DF_j, \tag{2}$$

где DF_j — доля разбавления образца j, контролируемая в процессе измерения или установленная экспериментально.

Не калиброванный, но во всех других отношениях идеальный измерительный процесс должен продемонстрировать пропорциональное отношение между ожидаемым значением наблюдаемых подсчетов $E(oc_j)$ и долей разбавления. То есть при отсутствии систематических ошибок измерения значение $E(oc_j)$ вычисляют по формуле

$$E(oc_j) = \beta \cdot DF_j, \tag{3}$$

где β — константа пропорциональности, которая может отличаться от c_{ideal}.

Комбинирование формул (1) и (3) дает основание для прямого соотнесения tc_j к $E(oc_j)$ через константу в соответствии с формулой

$$tc_j = \left(\frac{c_{ideal}}{\beta}\right) \cdot E\left(oc_j\right). \tag{4}$$

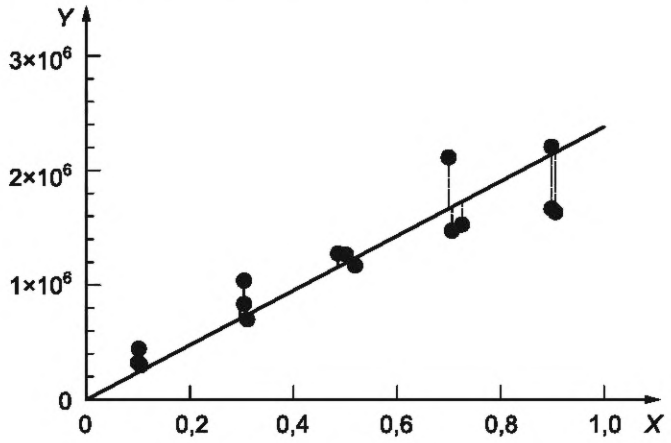
Если значение β известно (например, посредством использования эталонного образца), а $\beta \cong c_{ideal}$, тогда $E(oc_j) \cong tc_j$ (то есть, может быть установлена точность наблюдаемых подсчетов).

Если значение β не известно, степень соответствия между ожидаемым пропорциональным соотношением [см. формулу (3)] и измеренным соотношением можно использовать для оценки качества процесса подсчета клеток, так как любое отклонение от пропорциональности является показателем присутствия погрешностей измерения.

Примечание — Погрешности измерений, значение которых увеличивается по мере разбавления раствора, не приведут к значительным изменениям пропорциональности и, следовательно, не будут обнаружены при выполнении анализа отклонений от пропорциональности.

4.3 Отклонение от пропорциональности

Отклонение от пропорциональности оценивают способом сложения отклонений обработанных данных подсчетов клеток от модели пропорциональности (см. рисунок 1).



X — доля разбавления; *Y* — концентрация клеток (клеток на мл); ● — среднее количество клеток по всем реплицированным наблюдениям; ——— — сглаженная модель пропорциональности; ——— — отклонения или остаточная погрешность *e* между данными подсчета клеток и пропорциональным соотношением

Примечание — Это схематическое отображение гипотетического исследования с использованием пяти целевых долей разбавления и трех испытательных образцов на каждую долю разбавления.

Рисунок 1 — Схематическое отображение гипотетических результатов подсчета клеток по плану эксперимента с серией разбавлений

Остаточные погрешности *e* могут возникать как результат систематических погрешностей, случайных погрешностей или их комбинаций в процессе измерения. Функции остаточных погрешностей чувствительны к изменениям систематической погрешности и прецизионности.

Индекс пропорциональности вычисляют на основании анализа сглаженных остаточных погрешностей $e_{smoothed}$ сглаженной модели пропорциональности (см. 6.4).

Примечание — Оценка отклонения от пропорциональности посредством проверки гипотезы (получение *p*-значения), в которой нулевая гипотеза предполагает, что ожидаемые подсчитанные количества будут пропорциональны доле разбавления, а альтернативной гипотезой является более гибкая модельная оценка (например, линейная или квадратичная) *p*-значения, в настоящем документе не рассматривается, потому, что высокая случайная погрешность измерения снижает возможность обнаружения статистически значимых отклонений от пропорциональности.

5 План эксперимента

5.1 Общие положения

Выбор метода подсчета клеток, требования к процедуре выполнения измерений, вероятные источники неопределенности, требования к аттестации измерительного оборудования, валидации метода измерений и отчетности описаны в ИСО 20391-1.

Выбор метода подсчета клеток, валидацию метода измерений и подготовку отчетности необходимо выполнять в соответствии с ИСО 20391-1.

5.2 Требования к процессу подсчета клеток

Описанные в настоящем стандарте методы планирования эксперимента и статистического анализа используют для оценки качества процесса подсчета клеток, в котором испытательный образец находится в формате суспензии.

Этот метод применяют к процессам общего, дифференциального, прямого и косвенного подсчета клеток.

Примечание 1 — Если перед началом подсчета клетки требуют существенной подготовки, например в случае выращивания клеток в скоплениях, которые необходимо отделить друг от друга, эти этапы индивидуализации клеток считают частью процесса подсчета клеток. В этом случае базовый клеточный раствор содержит скопления клеток, который впоследствии будут разбавлять и делить на отдельные испытательные образцы. После чего, до начала измерений каждый отдельный испытательный образец проходит этапы обработки по разделению клеточных скоплений на отдельные клетки. В этом случае проблемы возникают с поддержанием целостности раствора, когда испытательные образцы содержат скопления клеток.

Примечание 2 — Если клетки находятся в погруженном состоянии в матрицу или держатся на поверхности, процедуру помещения клеток в формат суспензии не считают частью процесса подсчета клеток применительно к целям настоящего стандарта.

В случае процесса измерения, когда редкие клеточные явления или малые количества клеток будут подсчитывать относительно больших фоновых популяций клеток, применяют дополнительные требования, кроме выполнения планирования эксперимента и статистического анализа, описанных в настоящем стандарте.

5.3 Приготовление образцов для эксперимента

5.3.1 Общие положения

Тестовым материалом для планирования эксперимента должна быть клеточная суспензия. Клетки могут быть в состояниях, отражающих их поведение (то есть, одиночные клетки, клеточные скопления и клеточные агломераты).

Процедуры приготовления и обработки репрезентативных испытательных образцов для подсчета клеток должны быть оптимизированы для поддержания неизменности свойств испытательных образцов, необходимых для подсчета.

При приготовлении образцов следует избегать повреждений клеток, приводящих к потере способности участвовать в подсчете, а также не использовать методики, способствующие возникновению или снижению количества клеточного дебриса, который может помешать процессу подсчета или искусственно улучшить его параметры.

Примечание 1 — В [18]—[21] даны дополнительные руководства в отношении порядка приготовления образцов определенных типов клеток.

Процедуры приготовления образцов следует выполнять в течение времени и в условиях, обеспечивающих устойчивость свойств клеток, способных повлиять на процесс подсчета.

Примечание 2 — Образцы, содержащие живые клетки, динамичны и следовательно могут быть неустойчивы в отношении свойств, способных повлиять на процесс подсчета. Такие виды взаимодействия, как межклеточное взаимодействие и взаимодействие клеток с материалом, вызывают изменения в образцах, способные повлиять на процесс подсчета клеток.

Образцы для процесса дифференциального подсчета клеток (например, концентрации жизнеспособных клеток) имеют определенную степень неоднородности, на которую может повлиять процедура разбавления. Процедуры приготовления должны быть направлены на получение испытательных образцов, являющихся репрезентативными для неоднородности базового клеточного раствора.

Примечание 3 — У неоднородных образцов некоторые клетки могут испытывать на себе влияние условий культуры/среды в большей степени, чем другие, и в свою очередь влиять на репрезентативность испытательных образцов.

5.3.2 Базовый клеточный раствор

Для приготовления всех репрезентативных испытательных образцов необходимо использовать один и тот же базовый клеточный раствор. Дополнительные базовые растворы можно использовать при условии, что их концентрации и состав являются номинально эквивалентными.

Концентрацию клеток в базовом клеточном растворе следует оценивать по результатам одного и того же оцениваемого процесса измерений.

В сценарии использования системы, когда оценке подвергают несколько процессов измерений (см. приложение D), следует выбрать один процесс измерения для оценки стартовой концентрации клеток в базовом клеточном растворе и отразить это в протоколе.

Следует выбрать значение концентрации базового клеточного раствора для приготовления генерации реплицированных репрезентативных испытательных образцов по всему диапазону концентраций целевого использования в рамках процесса подсчета клеток.

Показатели качества, определенные по результатам выполнения методов подсчета, описанных в настоящем стандарте, являются специфичными для клеточного препарата (то есть, базового клеточного раствора), исследованного по схеме эксперимента. Следовательно, базовый клеточный раствор и репрезентативные испытательные образцы должны быть идентичны испытательным образцам, предназначенным для процесса измерения.

Необходимо поддерживать сходство характерных признаков клеточного препарата, способных повлиять на процесс подсчета клеток. В целях оценки качества процесса подсчета, характерными признаками, которые должны быть аналогичными у репрезентативных испытательных образцов данного плана эксперимента и у испытательных образцов, предназначенных для процесса измерения, считают состав суспензионной среды, присутствие остатков органических веществ, степень агрегирования клеток, неоднородность клеточной популяции, оптические характеристики клеток, морфологию клеток и т.д. (см. раздел «Библиография»).

5.3.3 Доля разбавления согласно плану эксперимента

Иллюстрация обобщенного плана эксперимента с долями разбавления дана на рисунке 2. Дополнительные примеры приведены в приложениях C и D.

Допускают, что Y_{ijk} обозначает значение, полученное при наблюдении за k^{th}-м параллельным подсчетом j^{th}-го реплицированного репрезентативного испытательного образца для i^{th}-й целевой доли разбавления из общего базового клеточного раствора. То есть, допустим, что I обозначает количество уникальных целевых долей разбавления (i = 1, …, I; каждый индекс относится к уникальному целевому значению доли разбавления DF от 0 до 1); допускают, что n_i означает количество реплицированных репрезентативных испытательных образцов, подготовленных для целевой доли разбавления i, и допускают, что K_{ij} означает количество повторных измерений для j^{th}-го реплицированного репрезентативного испытательного образца для i^{th}-й целевой доли разбавления.

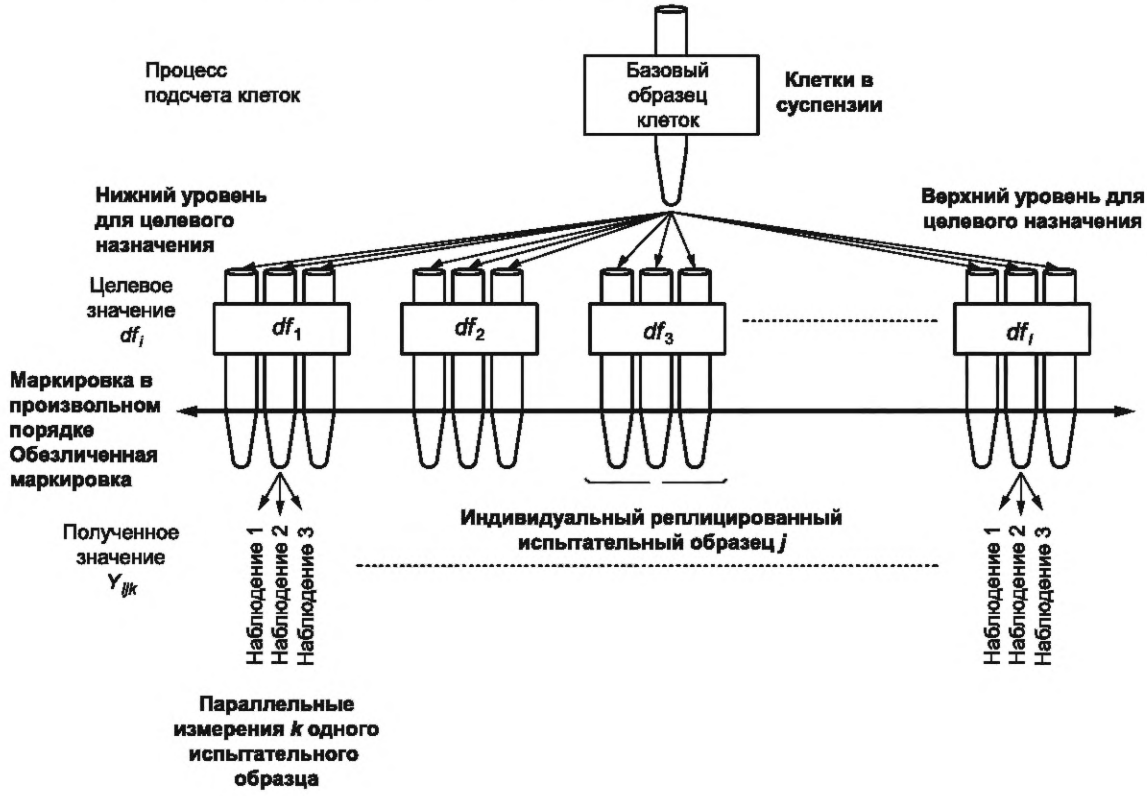
Приготавливают репрезентативные испытательные образцы для всего набора уникальных целевых долей разбавления, обозначенных как $DF = \{df_i\}_{i=1}^{I}$ (например, DF = {0,1; 0,3; 0,5; 0,5; 0,7; 0,9}), из базового клеточного раствора таким образом, чтобы значение концентрации клеток в репрезентативных испытательных образцах находилось в диапазоне значений концентрации целевого применения процесса подсчета клеток. В общем должны быть подготовлены не менее четырех уникальных целевых долей разбавления (df_i). Эти df_i доли должны быть равномерно расположены по линейной шкале и представлять весь диапазон целевого назначения. При выборе другой шкалы для расстановки долей разбавления, необходимо будет учесть дополнительные статистические требования.

Приготавливают реплицированные репрезентативные испытательные образцы. В общем необходимо подготовить не менее трех реплицированных репрезентативных испытательных образцов для каждой df_i (то есть, $n_i \geq 3$).

Выполняют параллельные измерения. В целом необходимо выполнить не менее трех параллельных измерений с каждым репрезентативным испытательным образцом (то есть, $K_{ij} \geq 3$), с использованием условия повторяемости измерения (то есть, один и тот же измерительный процесс, в той же лаборатории, тем же оператором на том же оборудовании, через небольшие промежутки времени).

Выбирают надлежащий план (например, устанавливают количество долей разбавления *DF*, количество реплицированных репрезентативных испытательных образцов, количество измерений) на основании заданной цели и с учетом доступности образца и устойчивости репрезентативных испытательных образцов с течением времени эксперимента. Анализ мощности (то есть, способности исследования обнаружить альтернативную гипотезу при точности измерения) может помочь в выборе надлежащего плана [22]. Анализ неопределенности измерения также может облегчить выбор надлежащего плана эксперимента.

Если доступность образца и(или) его устойчивость являются ограничивающими факторами, план эксперимента должен в максимально возможной степени и в первую очередь определять количество долей разбавления, затем количество реплицированных репрезентативных испытательных образцов и в конечном итоге — количество параллельных наблюдений.



Примечание — Эта схема отображает план эксперимента, начиная с единого базового раствора, из которого готовят три реплицированных репрезентативных испытательных образца (n_i = 3) для набора/целевых долей разбавления (df_1, df_2, ..., до df_I) способом индивидуального разбавления. Выполняют три параллельных наблюдения с каждым репрезентативным испытательным образцом (K_{ij} = 3).

Рисунок 2 — Схема, отображающая примерный план эксперимента с долями разбавления для процесса подсчета клеток

5.3.4 Требования к получению долей разбавления

Разбавляющее вещество выбирают таким образом, чтобы оно обеспечивало устойчивость свойств репрезентативного испытательного образца, способных повлиять на процесс подсчета клеток, в течение всего времени исследования серии разбавлений.

Необходимо гарантировать, что доли разбавления получают в результате точной повторяемости процесса.

Перед приготовлением последовательно разбавленных растворов следует тщательно перемешать базовый клеточный раствор до образования однородной клеточной суспензии. Клеточные растворы следует разбавлять таким образом, чтобы минимизировать их вариативность.

Примечание 1 — Сокращение количества операций разбавления может свести до минимума вариативность разбавленных растворов.

Процесс разбавления не должен сопровождаться появлением органических остатков и(или) повреждением клеток.

Во избежание ошибок смешивания, возникающих при серийном разбавлении, каждую долю разбавления необходимо получать индивидуально из базового раствора. Способ серийного разбавления можно применять, если этот процесс понятен, а доли разбавления находятся в пределах заданных параметров или могут быть скорректированы посредством надлежащего моделирования.

В идеальном варианте доля разбавления известна и эквивалентна df_i. На практике значение точной доли разбавления может иметь случайные или систематические отклонения от значения целевой доли разбавления, тем самым подвергая риску достоверность разбавления. На достоверность разбавления могут влиять ошибки пипетирования, неоднородность клеточной суспензии, потеря клеток из-за прилипания к сосуду или кончику пипетки, неустойчивость клеток во времени и погрешности смешивания при серийном разбавлении. Процесс получения долей разбавления должен учитывать эти виды влияния на достоверность разбавления.

Примечание 2 — Дополнительные общие указания по использованию пипеток приведены в [10] и в ИСО 8655-1, ИСО 8655-2 и ИСО 8655-6.

Необходимо обращать особое внимание на влияние погрешностей пипетирования на достоверность разбавления.

Примечание 3 — В контексте настоящего стандарта, термин «ошибка пипетирования» означает ошибку, возникающую вследствие неточного предположения об объемах суспензии, отмеряемых пипеткой при приготовлении репрезентативного испытательного образца. Ошибки из-за ненадлежащего смешивания или обработки образца не относятся к ошибкам пипетирования.

Влияние погрешностей пипетирования на достоверность разбавления следует оценить посредством отдельного исследования до начала выполнения плана эксперимента (предварительная оценка). В А.2 даны примерные процедуры предварительной оценки влияния ошибок пипетирования на достоверность разбавления.

Когда влияние погрешностей пипетирования на достоверность разбавления определяют способом предварительной оценки, пользователю необходимо установить критерии допустимости влияния ошибок пипетирования на достоверность разбавления и продемонстрировать соблюдение этих критериев (см. А.2). Если установленные пользователем критерии приемлемости ошибок пипетирования соблюдены, тогда для вычисления *PI* применяют целевое значение $DF(df_i)$ с использованием методов статистического анализа, описанных в 6.6.

Примечание 4 — В некоторых случаях желательно учитывать влияние ошибки пипетирования на значение *DF* для каждого испытательного образца по мере их получения для выполнения исследований серии разбавлений. Примеры: в случае ограниченного количества испытательных образцов для предварительной оценки или если предполагают, что ошибка пипетирования при получении долей разбавления может быть выше желаемой.

Если установленные пользователем критерии допустимости влияния ошибок пипетирования на достоверность разбавления соблюсти невозможно или когда пользователь решает не делать предварительную оценку ошибок пипетирования, влияние этих ошибок необходимо учитывать посредством получения измеренного значения *DF* для каждого индивидуального репрезентативного испытательного образца по мере их приготовления (см. А.3). В этом случае, для вычисления *PI* применяют набор измеренных долей разбавления, имеющих обозначения $DF_{measured} = \{df_{ij}\}_{ij}$ (например, $DF_{measured}$ = {0,104; 0,995; 0,102; 0,310; 0,294; 0,301 и т. д.} с использованием доработанных методов статистического анализа. (см. приложения В и С).

5.4 Маркировка испытательных образцов

Репрезентативные испытательные образцы необходимо маркировать с нанесением на них достаточной информации, обеспечивающей возможность их отслеживания до базового раствора и доли разбавления испытательных образцов.

Если процесс подсчета клеток предполагает ручные способы определения количества клеток (например, способ ручного подсчета клеток с использованием гемоцитометра) и(или) ручные способы идентификации клеток/клеточных популяций [например, ручное гейтирование (гейтинг) в проточной цитометрии], с целью снижения влияния человеческого фактора, репрезентативные испытательные образцы должны быть промаркированы таким образом, чтобы данные по разбавлению образцов и концентрациям клеток были обезличены для операторов, выполняющих измерения и(или) анализы.

5.5 Измерение испытательного образца

Измерения репрезентативных испытательных образцов необходимо проводить в течение времени и в условиях, обеспечивающих устойчивость репрезентативных испытательных образцов в плане сохранения их свойств, способных повлиять на процесс подсчета клеток в период выполнения исследования серии разбавлений.

Образцы для измерений должны быть получены из каждого репрезентативного испытательного образца в соответствии с процедурами, установленными для оцениваемого процесса подсчета клеток. Требования к приготовлению образцов для измерений приведены в ИСО 20391-1.

Перед приготовлением каждого образца для измерений репрезентативные испытательные образцы необходимо хорошо промешать.

Измерения проводят в соответствии с процедурами, установленными для оцениваемого процесса подсчета клеток. Процесс подсчета клеток включает приготовление образца (например, окрашивание, растворение, дизагрегация), обработку образца (например, пипетирование, смешивание), получение данных (например, настройка аппаратуры, загрузка образца) и обработку/корректировку данных [например, исправление совпадений, гейтирование (гейтинг), установка параметров визуального анализа]. Дополнительная информация приведена в ИСО 20391-1.

Измерения необходимо проводить таким образом, чтобы снизить влияние временного фактора.

Примечание — Произвольный порядок измерения образцов может снизить чувствительность *PI* и других показателей качества процесса подсчета клеток к систематическим временным эффектам.

Время, прошедшее между приготовлением конечного репрезентативного испытательного образца, и выполнением каждого наблюдения, необходимо регистрировать документально для контроля непредусмотренных временных эффектов во время исследования серии разбавлений.

6 Статистические методы

6.1 Общие положения

Обобщенная функциональная диаграмма анализа данных приведена на рисунке 3.

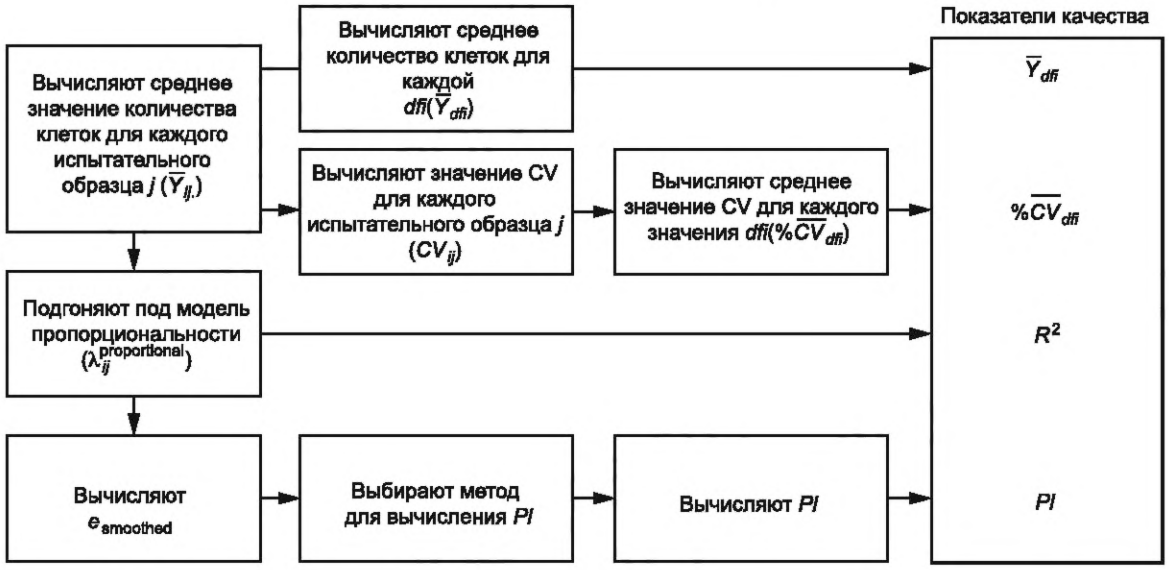


Рисунок 3 — Диаграмма, иллюстрирующая процесс анализа для расчета показателей качества на основании плана эксперимента с серией разбавлений

6.2 Подсчет среднего количества клеток

Подсчет среднего количества клеток $\overline{Y}_{dfi}$ для набора репрезентативных испытательных образцов (обозначенных как $j = 1, 2, ..., n_j$) с целевой долей разбавления df_j выполняют по формуле

$$\overline{Y}_{df_i} = \frac{\sum_{j-1}^{n} \overline{Y}_{ij.}}{n_i}, \quad (5)$$

где $\overline{Y}_{ij.}$ — среднее значение по набору K_{ij} параллельных наблюдений за j^{th}-м репрезентативных испытательным образцом df_i, вычисленное по формуле

$$\overline{Y}_{ij.} = \frac{\sum_{k=1}^{K_{ij}} Y_{ijk}}{K_{ij}}. \quad (6)$$

6.3 Прецизионность измерений

Прецизионность измерений оценивают с использованием коэффициента вариативности *CV* повторяемости результатов параллельных наблюдений и выражают в процентах (% *CV*).

Для серии K_{ij} параллельных наблюдений репрезентативного испытательного образца *j*, с целевой долей разбавления df_i, коэффициент вариативности *CV* вычисляют по формуле

$$CV_{ij} = \frac{\text{Стандартное отклонение}}{\text{среднее значение}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{K_{ij}-1}\sum_{k=1}^{K_{ij}} \left(Y_{tjk} - \overline{Y}_{ij}\right)^2}}{\overline{Y}_{ij}}. \quad (7)$$

Средний процент для набора n_i репрезентативных испытательных образцов с целевыми долями разбавления df_i вычисляют по формуле

$$\%CV_{df_i} = 100 \cdot \frac{\sum_{j=1}^{n_i} CV_{ij}}{n_i}, \quad (8)$$

где CV_{ij} вычисляют по формуле (7) для обозначения коэффициента вариативности репрезентативного испытательного образца *j* с целевой долей разбавления df_i.

6.4 Сглаженная модель пропорциональности

Модель пропорциональности необходимо встроить в соотношение $\overline{Y}_{ij}$ против df_{ij} при помощи формулы

$$\overline{Y}_{ij} = \beta_1 \cdot df_{ij} + \in_{ij}, \quad (9)$$

где β_1 — скалярный коэффициент, полученный в процессе подгонки модели;

$\in_{ij}$ — отклонение $\overline{Y}_{ij}$ от тенденции пропорциональности.

Долю разбавления *dfj* принимают как целевую долю разбавления *df*, если надежность разбавления была оценена предварительно и признана соответствующей техническим требованиям пользователя (см. А.1), в противном случае при подгонке модели пропорциональности используют измеренную долю разбавления df_{ij} для каждого репрезентативного испытательного образца *j* с каждой целевой долей разбавления.

Выбирают соответствующее допущение при моделировании соотношений средних значений отклонения для сглаживания модели пропорциональности.

Пропорциональность подсчитанных количеств клеток и долей разбавления оценивают с использованием метода взвешенных наименьших квадратов и допущенного соотношения средних значений отклонения.

Примечание — Количества клеток идеально моделируют с использованием допущения Пуассона для соотношения средних значений отклонения (вариативное значение равно среднему) вместо постоянного соотношения средних значений отклонения (метод обычных наименьших квадратов). Однако в биологических исследованиях данные подсчетов часто бывают «сверхразбросанными». В этих случаях, по закону распределения Пуассона, получают модели с заниженным значением вариативности данных. Можно рассмотреть другие варианты взаимоотношений между ожидаемым средним количеством подсчитанных клеток и ожидаемым вариативным количеством подсчитанных клеток. Например, квазипуассоновское соотношение средних значений отклонения (то есть, вариативность результатов параллельных наблюдений с фиксированной долей разбавления является пропорциональной (а не равной) ожидаемому результату с заданной долей разбавления) или вогнутое соотношение средних значений отклонения (то есть, вариативность параллельных наблюдений с фиксированной долей разбавления имеет большее значение при слабом и сильном разбавлении и меньшее значение при промежуточных разбавлениях). Для обоснования выбора конкретного соотношения среднего и вариативных значений проводят проверку по критерию согласованности ожидаемых и полученных данных.

Для каждого образца вычисляют прогнозное количество клеток на основании модели пропорциональности по формуле

$$\lambda_{ij}^{\text{proportional}} = \beta_1 \cdot df_{ij}, \tag{10}$$

где $\lambda_{ij}^{\text{proportional}}$ — модель пропорциональности.

6.5 Коэффициент детерминации

Коэффициент детерминации R^2 — это количественное значение, широко используемое в области анализа данных и планирования экспериментов, в качестве показателя того, насколько хорошо модель соответствует набору полученных результатов.

Для сглаживания модели пропорциональности вычисляют значение R^2 по формуле

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i \sum_j \left(\overline{Y}_{ij} - \lambda_{ij}^{\text{proportional}}\right)^2}{\sum_i \sum_j \left(\overline{Y}_{ij} - \overline{Y}_{...}\right)^2}, \tag{11}$$

где $\overline{Y}_{...}$ — среднее значение $\overline{Y}_{ij}$ по всем индивидуальным репрезентативным испытательным образцам j набора n_i реплицированных репрезентативных испытательных образцов по всему спектру целевых долей разбавления DF, вычисляемое по формуле

$$\overline{Y}_{...} = \frac{\sum_i \sum_j \overline{Y}_{ij}}{\sum_i n_i}. \tag{12}$$

6.6 Индекс пропорциональности *PI*

6.6.1 Общие положения

Индекс пропорциональности PI вычисляют на основании анализа сглаженных остаточных погрешностей e_{smoothed} из сглаженной модели пропорциональности.

Примечание 1 — Оценки на основании несглаженных остаточных погрешностей могут быть надлежащим показателем того, насколько близки результаты отдельных подсчетов клеток к их соответствующим идеальным значениям, по сравнению с систематической погрешностью в отклонении от пропорциональности. Даже после «сглаживания», отклонения от идеального поведения возникают в результате того, что пропорции смеси произвольной вариативности и систематической погрешности не известны, однако, оценка сглаженных остаточных погрешностей, по сравнению с оценкой отдельных остаточных погрешностей, снижает влияние случайной погрешности и дает более ясную картину систематической погрешности в отклонении от пропорциональности.

Примечание 2 — PI — это значение, специфическое для рассматриваемого процесса подсчета клеток, включая клеточный препарат, систему измерений, заданные настройки и корректировки данных, параметры обработки данных, процедуры отбора проб и выполнения измерений, а также план проведения эксперимента и метод статистического анализа, использованный при выведении значения PI (например, количество выполненных наблюдений и исследованных долей разбавления).

Примечание 3 — При вычислении значений PI в значительной степени полагаются на точность доли разбавления [допущение по формуле (2)]. Неучтенные случайные или систематические погрешности в долях разбавления повышают вариативность PI.

6.6.2 Вычисление значения сглаженной остаточной погрешности e_{smoothed}

Когда установленные пользователем критерии надежности разбавления соблюдены, среднее количество подсчитанных клеток $\overline{Y}_{dfi}$ по набору n_i репрезентативных испытательных образцов с целевыми долями разбавления df_i используют для вычисления значения сглаженной остаточной погрешности при использовании доли целевого разбавления e_i^{smoothed} при каждом значении df_i по формуле

$$e_i^{\text{smoothed}} = Y_{df_i} - \lambda_{df_i}^{\text{proportional}}, \tag{13}$$

где $\lambda_{df_i}^{\text{proportional}}$ — расчетное количество клеток при целевой доле разбавления df_i, вычисляемое с использованием β_1 [см. формулу (10)], по формуле

$$\lambda_{df_i}^{\text{proportional}} = \beta_1 \cdot df_i. \tag{14}$$

Если невозможно соблюсти установленные пользователем критерии надежности разбавления путем совершенствования методик пипетирования, значение измеренной доли разбавления получают во время приготовления индивидуальных реплицированных образцов. Далее измеренную долю разбавления df_{ij} можно использовать для вычисления значений сглаженной остаточной погрешности каждого репрезентативного испытательного образца e_{ij}^{smoothed} в соответствии с условиями приложения В.

6.6.3 Вычисление индекса пропорциональности *PI*

Пользователь должен вычислить индекс пропорциональности *PI* на основании сглаженных остаточных значений погрешности e_i^{smoothed} или e_{ij}^{smoothed}.

Пользователь должен выбрать подход для вычисления значения *PI* на основании целевого использования результатов подсчета клеток.

В таблице 1 даны примеры подходов к вычислению значения *PI*.

Примечание — Значение *PI* может быть определено с использованием разных подходов, в каждом из которых делают разный упор на влияние каждой сглаженной остаточной погрешности.

Таблица 1 — Подходы к оценке индекса пропорциональности *PI* с использованием метода, основанного на сглаженной остаточной погрешности[a]

Подход к вычислению *PI*	Описание влияния на индекс пропорциональности *PI*
R^2	R^2 (или коэффициент детерминации), основанный на остаточной погрешности метод оценки того, насколько близко прогнозные значения из статистической модели следуют за полученными значениями; является подходящим методом вычисления *PI*, когда значение отклонения равно при всех измерениях (основанное на R^2 значение *PI* изменяется в диапазоне от 0 до 1)
Масштабированный	Работает по процентной шкале, а не по абсолютной. Этот подход позволяет в равной степени взвесить вклад в *PI* по всем долям разбавления
Не масштабированный	Работает по абсолютной шкале, а не по процентной. В этом подходе наибольшее влияние на *PI* оказывают результаты больших (то есть, высококонцентрированных) долей разбавления
Абсолютное значение	Общая продолжительность абсолютных отличий (масштабированных или не масштабированных) между пропорциональной и гибкой моделями. После масштабирования количество остаточных фрагментов равное
Сумма квадратов	Всего квадратов различий (масштабированных или не масштабированных) между пропорциональной и гибкой моделями. Возведение в квадрат остаточных погрешностей придает большее влияние большим значениям остаточных погрешностей
[a] Данный список не является исчерпывающим; применяют и другие способы вычисления *PI* на основании значений сглаженных остаточных погрешностей.	

Для выбора способа вычисления *PI* можно применять комбинацию подходов, соответствующих целевому применению.

Примечание — Для примера, сумму абсолютных значений всех остаточных погрешностей, масштабированную на соответствующий прогнозный результат подсчета из пропорциональной модели [то есть сумму всех абсолютных значений масштабированных сглаженных остаточных погрешностей (PI_{AbsSSR}, см. С.1), можно использовать для более ровного определения вклада в сводную статистику каждой остаточной погрешности, по всем долям разбавления. В ином случае характер поведения при почти неразбавленных образцах стремится к преобладанию над *PI* характеристиками. Кроме того, использование концепции «абсолютного значения остаточных погрешностей» в противоположность концепции «квадратов значений остаточных погрешностей» снижает влияние выпадающих показателей и придает ровный вес каждому фрагменту остаточной погрешности в сводной статистике (то есть, если одна остаточная погрешность имеет значение в два раза больше другой, ее вклад в *PI* будет в два раза большим).

Примеры формул для вычисления значений *PI* приведены в приложении С.

6.7 Дополнительный статистический анализ и параметры качества

Методы дополнительного статистического анализа, пригодные для целевого использования, можно применять к данным подсчетов клеток, полученным по результатам плановых экспериментов и используемым для выработки дополнительных параметров, применимых для оценки качества процесса подсчета клеток (например, линейности, промежуточной прецизионности, %*CV* по всем реплицированным репрезентативным испытательным образцам и т. д.). При регистрации дополнительных параметров в протоколе эксперимента им должны быть даны определения и описаны способы их получения.

6.8 Интерпретация данных

6.8.1 Общие положения

Показатели качества, полученные в результате эксперимента и статистического анализа данных, описанные в настоящем стандарте, позволяют оценить весь процесс подсчета клеток, включая процедуры приготовления образцов, обработки образцов, получения данных и обработки и корректировки данных. Показатели качества специфичны для процесса измерения и исследуемого клеточного образца.

6.8.2 Интерпретация %*CV*

Низкие значения %*CV* означают, что процесс подсчета клеток более точен.

Для сравнения значений *CV,* полученных при разных измерительных процессах, можно использовать *p*-значение или доверительный интервал.

6.8.3 Интерпретация R^2

Значение R^2 колеблется в пределах от 0 до 1; чем больше R^2, тем лучше выполнена подгонка модели. Большее значение R^2 означает, что прогнозные значения из модели охватывают большую долю вариаций полученных данных. Оценка R^2 зависит от случайной вариативности данных. Следовательно, значение R^2 не устанавливает источник отклонений от модели пропорциональности, возникающих по причине случайной вариативности (неточности данных) или систематической диспропорциональности. Оценка R^2 на основании исходных значений остаточных (то есть, не сглаженных) погрешностей характеризует эффективность процесса на основании того, насколько индивидуальные измерения находятся близко к их соответствующим идеальным значениям, в противоположность систематической погрешности отклонения от пропорциональности.

Для R^2 должны быть установлены требования на основании целевого применения результатов.

Примечание — Распространенное мнение, что $R^2 > 0{,}95$ является конструктивным требованием, не актуально для данного анализа.

6.8.4 Интерпретация значений *PI*

Значения *PI* указыв*ают* на отклонение процесса подсчета клеток от пропорциональности. Значение *PI* частично используют для оценки качества процесса подсчета клеток, поскольку любое отклонение от пропорциональности свидетельствует о присутствии случайных или систематических погрешностей измерения. Например, низкая чувствительность процесса подсчета клеток или использование процесса подсчета клеток без соблюдения пределов количественной оценки могут привести к возникновению ошибок измерений, снижающих значения *PI*.

Для *PI* должны быть установлены требования на основании целевого применения результатов.

Индекс пропорциональности *PI* наиболее чувствителен к погрешностям измерений, которые не масштабируются при разбавлении. Погрешности измерений, масштабирующиеся пропорционально разбавлению, не приводят к существенным изменениям значений *PI* и должны оцениваться отдельно.

На основании способа вычисления *PI* можно прийти к выводу, что более высокое значение *PI* означает большую или меньшую степень отклонения от пропорциональности. Например, при использовании *PI,* основанного на коэффициенте детерминации R^2 сглаженных остаточных погрешностей (т. е. PI_{R^2SR}), значение, расположенное ближе к нулю, 0 будет означать большую степень отклонения от пропорциональности и более низкое качество измерения.

Примечание — Значения *PI* не подходят для оценки общей эффективности устройства подсчета клеток.

6.8.5 Сопоставление значений *PI*

Сопоставление значений *PI* применимо в случае использования одного и того же плана эксперимента с серией разбавлений (включая номинально аналогичную базовую концентрацию клеток) и одного и того же метода статистического анализа.

Значения *PI* сравнивают для оценки различий в отклонениях от пропорциональности между процессами подсчета клеток, между типами клеток и во времени.

Для получения среднего значения *PI* выполняют три или более оценок *PI* по общему плану эксперимента с серией разбавлений в аналогичных условиях с интервалами доверительности, обеспечивающими сравнение значений *PI* по всему процессу измерений.

Как альтернативный вариант, для оценки значимости различий между значениями *PI* по всему процессу подсчета клеток, при выполнении разовой оценки *PI*, применяют метод непараметрического бутстрэп-анализа для выработки интервалов доверительности для значений *PI*.

При выполнении непараметрического бутстрэп-анализа необходимо заранее установить предварительные условия, включая, например, количество бутсрэп-итераций и уровень доверительности; условия непараметрического бутстрэп-моделирования должны быть отражены в протоколе эксперимента (например, количество бутсрэп-итераций и уровень доверительности).

Примечание 1 — Непараметрический бутстрэп-анализ применяют, когда предварительные условия моделирования и выполненный анализ согласованы между собой.

Примечание 2 — Большое количество значений *PI,* полученных по результатам параллельных измерений *PI*, используют для установления тенденций и(или) резко отклоняющихся значений для процесса подсчета клеток.

7 Отчетность

7.1 Регистрация показателей качества

Результаты подсчета клеток выражают в контексте концентрации клеток в единицах «клеток/мл».

В зависимости от целевого применения результаты подсчетов можно регистрировать и в других единицах (например, клеток/см^2 или клеток/мг микроносителя).

Протокол должен содержать следующие показатели качества:

a) $\overline{Y}_{dfi}$ для каждого значения df_i;

b) $\%\overline{CV}_{dfi}$ для каждого значения df_i;

c) R^2 для сглаженной модели пропорциональности;

d) *PI.*

7.2 Документальное оформление плана эксперимента и метода статистического анализа

7.2.1 Протокол должен содержать информацию по плану эксперимента и методу статистического анализа для обеспечения возможности выполнения независимой оценки лицами, изучающими эти данные, но не принимавшими участие в исследовании, включая следующее:

a) описание исследованных систем подсчета клеток, включая следующее:

1) использованные в исследовании клеточные типы,

2) оцениваемые методы подсчета клеток,

3) исследованные диапазоны концентрации;

b) элементы плана эксперимента с долями разбавления, включая следующее:

1) набор уникальных целевых долей разбавления $DF = \{df_i\}^I_{i=1}$,

2) количество реплицированных репрезентативных испытательных образцов n_i,

3) количество параллельных наблюдений K_{ij};

c) метод оценки вкладов погрешностей пипетирования в надежность разбавления (например, предварительная оценка в соответствии с А.1 или измеренная гравиметрическим способом доля разбавления во время оценки значения *PI* в соответствии с А.2); когда делают предварительную оценку вкладов погрешностей пипетирования в надежность разбавления, то установленные пользователем критерии приемлемости вкладов погрешностей пипетирования в надежность разбавления должны быть зарегистрированы в протоколе эксперимента;

d) допущение по соотношению средних значений отклонения, использованное при подгонке модели пропорциональности;

e) формулу для подгонки модели пропорциональности [см. формулу (10)];

f) метод вычисления *PI*.

7.2.2 Дополнительные элементы отчетности по плану эксперимента и методу статистического анализа могут включать следующую информацию:

a) базовый клеточный раствор — концентрация и метод оценки концентрации;

b) план эксперимента — процесс получения разбавлений (например, этапы смешивания, разбавитель, индивидуальное или серийное разбавление), включая время, прошедшее после приготовления репрезентативного испытательного образца;

c) время выполнения каждого подсчета клеток и(или) время, прошедшее между приготовлением образца и получением результата измерения;

d) процедуры статистического анализа — дополнительные параметры, определение дополнительных параметров, обоснование выбора способа моделирования, параметры бутстрэп-моделирования;

e) неожиданные результаты, полученные во время выполнения плана эксперимента и статистического анализа.

7.3 Дополнительные элементы отчетности по процессу подсчета клеток

Дополнительные элементы отчетности по процессу подсчета клеток включают следующую информацию:

a) клетки — тип, количество пассажей или удвоений популяции, номер партии, источник получения;

b) реактивы — наименование, источник получения, номер партии, страна происхождения, человеческого или животного происхождения;

c) процесс измерения для метода подсчета клеток — включая аппаратуру, настройки приборов, приготовление образца, обработку данных.

Примеры оценки качества процесса подсчета клеток и соответствующих элементов отчетности приведены в приложениях D и E.

Приложение А
(справочное)

Метод оценки вклада погрешности пипетирования в надежность разбавления

А.1 Общие положения

В данном приложении термин «надежность разбавления» относится к вкладу погрешности пипетирования в надежность разбавления и не включает другие аспекты надежности разбавления. Данное приложение содержит примеры процедур для оценки надежности разбавления (в отношении погрешности пипетирования), применимые к настоящему стандарту.

А.2 Примерная процедура предварительной оценки вкладов погрешности пипетирования в надежность разбавления с использованием градуированной шкалы для получения точных расчетных значений объема при пипетировании

А.2.1 Примерную процедуру, обозначенную для предварительной оценки надежности разбавления, также используют в качестве средства повышения надежности разбавления таким образом, чтобы итоговая процедура пипетирования, выбранная для выполнения плана эксперимента согласно настоящему стандарту, отвечала техническим требованиям пользователя. Кроме того, процедуру, обозначенную для предварительной оценки надежности разбавления, используют для тренировки операторов эксперимента, до начала выполнения процедур, предусмотренных в настоящем стандарте.

Ниже изложена примерная процедура предварительной оценки вкладов погрешности пипетирования в надежность разбавления.

А.2.2 Выполняют действия по схеме разбавления, предусмотренной планом эксперимента, для получения индивидуальных репрезентативных испытательных образцов для каждой целевой доли разбавления df_i, для вычисления значения *PI* (включая репликации).

Разбавление должен выполнять тот же оператор с использованием той же пипетки (или пипетки с таким же типом микродозатора), процедуры пипетирования, аналогичной той, что будет использована для оценки *PI*.

Разбавляемым образцом может быть один из следующих:

a) клеточная суспензия, аналогичная клеточной суспензии, по которой предполагают оценивать значение *PI*;

b) суспензионная среда, аналогичная клеточной суспензии, по которой предполагают оценивать значение *PI*.

Не рекомендуют использовать воду для разбавления намеченного образца, поскольку погрешность пипетирования для воды, как правило, ниже погрешности пипетирования клеточных суспензий.

Разбавитель должен быть аналогичен разбавителю, предполагаемому для использования при оценке значения *PI*.

Во время разбавления измеряют массу пипетируемых суспензий, m_{1ij} и m_{2ij}, где here m_{1ij} — масса образца для разбавления, а m_{2ij} — масса разбавителя, пипетируемого для получения испытательного образца для целевой доли разбавления df_i.

Необходимо подобрать градуированную шкалу достаточной чувствительности для измерения массы пипетированной суспензии. При отсутствии подходящей шкалы можно использовать альтернативный способ для получения достоверных значений образца.

Например, градуированную шкалу с чувствительностью 0,0001 г можно использовать для получения точных значений объема образца до 0,01 мл (дополнительная информация приведена в ИСО 8655-2).

Допускают, что плотности образца для разбавления и разбавляющей среды приблизительно эквивалентны, предварительно оцененное значение *DF* ($df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$) для каждого репрезентативного испытательного образца вычисляют по формуле

$$df_{ij}^{\text{pre-evaluated}} = \frac{m_{1_{ij}}}{m_{1_{ij}} + m_{2_{ij}}}. \quad \text{(A.1)}$$

В некоторых случаях нецелесообразно делать допущение, что образец для разбавления и разбавляющая среда имеют приблизительно эквивалентные значения плотности. В этих случаях, соответствующие значения плотности каждого раствора следует учитывать при вычислении значения $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$.

А.2.3 Определяют предварительно оцененную надежность разбавления

Строят график зависимости $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$ от df_i и вычерчивают линию, проходящую через начало координат (0,0), то есть сглаживают модель пропорциональности [см. формулу (А.2)]

$$df_{ij}^{\text{pre-evaluated}} = \beta^{\text{pipetting}} df_i + \in_{ij}, \quad \text{(A.2)}$$

где $\beta^{\text{pipetting}}$ — константа;

$\in_{ij}$ — представляет отклонение значения $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$ от тенденции пропорциональности.

В идеальном случае значение $\beta^{pipetting}$ равно 1.

Вычисляют коэффициент детерминации для вклада от погрешности пипетирования в надежность разбавления $R^2_{Dilution}$ (см. таблицу А.1).

Если значение $R^2_{Dilution}$ превышает или равно определенный пользователем и предварительно заданный критерий (основанный на целевом использовании), то надежность разбавления достаточна, а значение df_i можно использовать для оценки *PI*.

В общем критерии вклада приемлемой погрешности пипетирования в надежность разбавления должно быть, как минимум, следующее соотношение: $R^2_{Dilution} \geq 0{,}98$.

Для поддержания надежности разбавления при малой доле разбавления используют многоэтапный процесс разбавления. Например, образец большего объема можно получить из базового клеточного раствора, чем серийно разбавляемый для достижения желаемой целевой доли разбавления. Погрешность, возникающую на каждом этапе разбавления, следует учитывать при вычислении надежности разбавления.

Характеристики R^2 зависят от целевого использования результатов подсчета клеток. Более низкое значение R^2 для надежности разбавления приводит к снижению чувствительности при определении отклонения от пропорциональности в процессе подсчета клеток.

Если значение $R^2_{Dilution}$ меньше определенного пользователем предварительно установленного критерия, то надежность разбавления не достаточна. В этом случае необходимо усовершенствовать процедуру обращения с жидкостью и выполнить оценку еще раз. При невозможности дальнейшего улучшения процедуры обращения с жидкостью, когда определенные пользователем критерии все еще не достигнуты, измеренное значение *DF* (df_{ij}) можно получить во время оценки *PI* и использовать при вычислении *PI*, с целью удовлетворения требований к надежности разбавления (см. А.2).

Таблица А.1 — Примерная таблица для сбора данных и оценки надежности разбавления

Целевое значение *DF*	Целевой объем клеточной суспензии, мл	Целевой объем разбавителя, мл	Реплицированный образец	Масса пипетированного образца, m_1 г	Масса пипетированного разбавителя, m_2 г	$df_{ij}^{pre\text{-}evaluated}$	$\beta^{pipetting}$	Надежность разбавления $R^2_{Dilution}$
0,3	0,6	1,4	1	0,586	1,444	0,289	0,975 4	0,999 4
0,3	0,6	1,4	2	0,589	1,444	0,290		
0,3	0,6	1,4	3	0,586	1,452	0,287		
0,5	1	1	1	0,966	1,029	0,484		
0,5	1	1	2	0,985	1,035	0,488		
0,5	1	1	3	0,963	1,037	0,482		
0,7	1,4	0,6	1	1,351	0,613	0,688		
0,7	1,4	0,6	2	1,356	0,615	0,688		
0,7	1,4	0,6	3	1,335	0,616	0,684		

А.3 Примерная процедура получения измеренного значения *DF* во время оценки *PI*, с использованием градуированной шкалы для достижения точных расчетных значений объема

А.3.1 Массу пипетированной клеточной суспензии и массу разбавляющей среды, используемой для получения целевой доли разбавления, можно измерить. Когда можно обоснованно допустить, что плотности этих растворов являются номинально эквивалентными, отношение масс этих растворов дает значение измеренной доли разбавления df_{ij}.

А.3.2 Выполняют действия по схеме разбавления, установленной в плане эксперимента, для получения индивидуальных репрезентативных испытательных образцов при каждом целевом значении *DF*(*dfj*) для вычисления *PI*.

Во время разбавления с целью получения каждого индивидуального репрезентативного испытательного образца, *j*, при целевой доле разбавления *i* измеряют массу пипетируемой клеточной суспензии m_{1ij} и массу пипетируемого разбавителя m_{2ij}.

Необходимо подобрать градуированную шкалу достаточной чувствительности для измерения массы пипетированной клеточной суспензии и разбавителя. При отсутствии подходящей шкалы следует использовать альтернативный способ для получения достоверных значений образца.

Например, градуированную шкалу с чувствительностью 0,0001 г можно использовать для получения точных значений массы образца до 0,01 мл (дополнительная информация приведена в ИСО 8655-2).

Допускают, что плотности клеточной суспензии и разбавляющей среды приблизительно эквивалентны, измеренное значение *DF* для каждого репрезентативного испытательного образца df_{ij} вычисляют по формуле

$$df_{ij} = \frac{m_{1_{ij}}}{m_{1_{ij}} + m_{2_{ij}}}. \quad (A.3)$$

В некоторых случаях нецелесообразно делать допущение, что клеточная суспензия и разбавляющая среда имеют приблизительно эквивалентные значения плотности. В этих случаях соответствующие значения плотности каждого раствора следует учитывать при вычислении значения df_{ij} (см. таблицу А.2).

Таблица А.2 — Примерная таблица для сбора данных и оценки измеренного значения *DF* для каждого репрезентативного испытательного образца

Целевое значение	Целевой объем клеточной суспензии, мл	Целевой объем разбавителя, мл	Реплицированный образец	Масса пипетированной клеточной суспензии, m_{1ij} г	Масса пипетированного разбавителя, m_{2ij} г	df_{ij}
0,3	0,6	1,4	1	0,582	1,407	0,293
0,3	0,6	1,4	2	0,599	1,415	0,298
0,3	0,6	1,4	3	0,597	1,426	0,295
0,5	1	1	1	1,013	1,012	0,500
0,5	1	1	2	1,009	1,019	0,498
0,5	1	1	3	0,959	1,021	0,484
0,7	1,4	0,6	1	1,397	0,604	0,698
0,7	1,4	0,6	2	1,399	0,604	0,698
0,7	1,4	0,6	3	1,395	0,596	0,701

Приложение В
(обязательное)

Метод вычисления сглаженных погрешностей $e_{smoothed}$ при получении набора измеренных долей разбавления $DF_{measured}$

После получения измеренных долей разбавления df_{ij} во время оценки подсчета клеток вычисляют значение сглаженной погрешности $e_{smoothed}$ на основании смоделированного числа клеток для каждого репрезентативного испытательного образца $\lambda_{df_{ij}}^{flexible}$, согласно настоящему приложению (см. рисунок В.1).

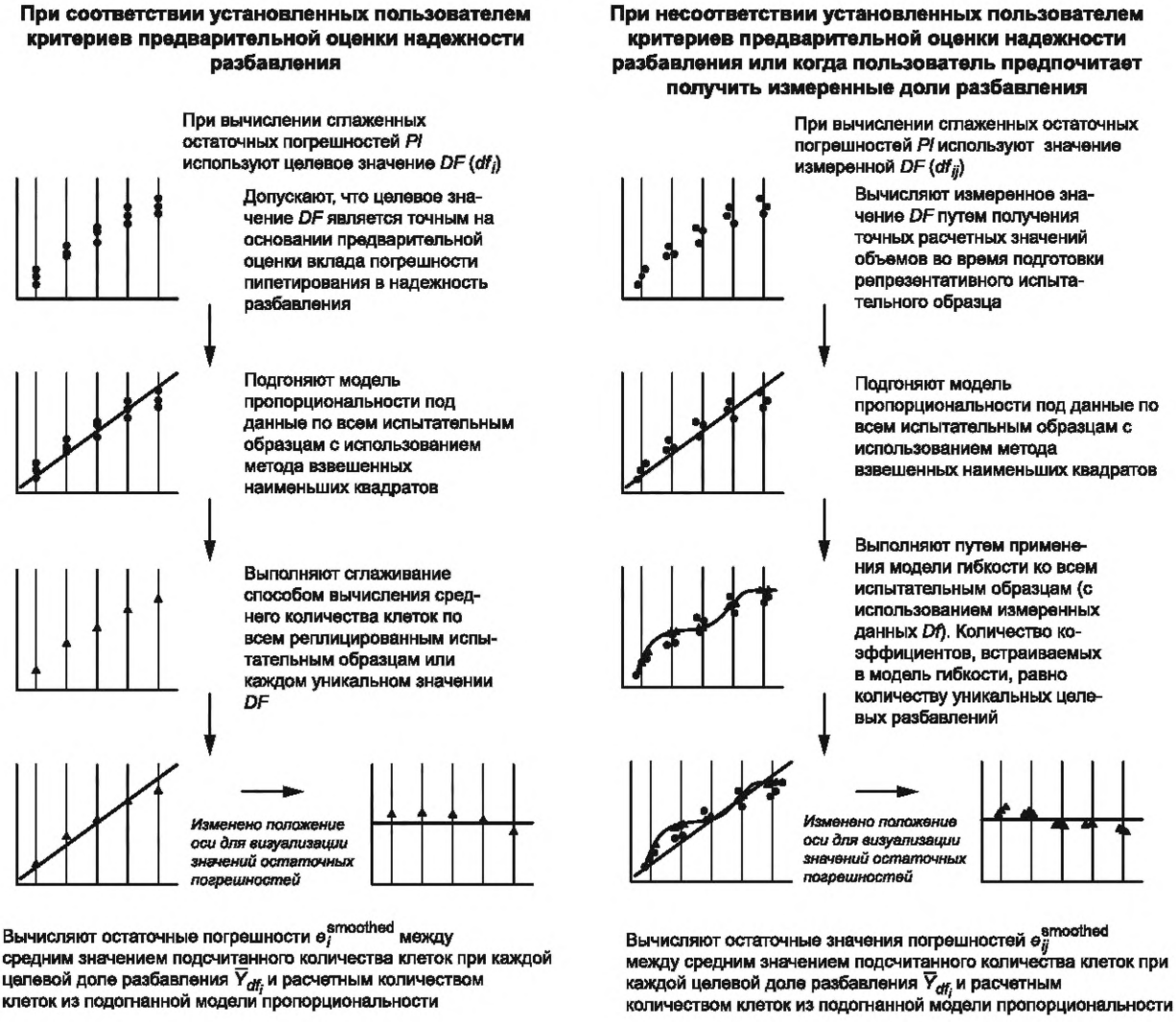


Рисунок В.1 — Графическое отображение разных методов вычисления сглаженных остаточных погрешностей на основании целевого и измеренного значения долей разбавления (то есть метода, используемого для получения долей разбавления)

Для вычисления сглаженных погрешностей $e_{ij}^{smoothed}$ при получении измеренного значения *DF* дают предварительную оценку смоделированного значения количества клеток $\lambda_{df_{ij}}^{flexible}$ для каждого репрезентативного испытательного образца, путем создания модели взвешенных наименьших квадратов для соотношения $\overline{Y}_{ij.}$ против df_{ij}, после константы модели гибкости.

Общее количество коэффициентов, подгоняемых под модель гибкости, включая пересечение, равно количеству уникальных целевых долей разбавления *I*.

Например, в случае, когда план эксперимента предусматривает использование трех целевых долей разбавления (*I* = 3), применяют квадратичную модель после квазипуассоновского допущения распределения [см. формулу (В.1)]

$$\lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}} = \gamma_0 + \left(\gamma_1 df_{ij}\right) + \left(\gamma_2 df_{ij}^2\right), \quad \text{(B.1)}$$

где γ_0, γ_1, γ_2 — скалярные коэффициенты, полученные при подгонке модели.

Значение e_{ij}^{smoothed} для репрезентативного испытательного образца j при целевой доле разбавления i вычисляют по формуле (B.2)

$$e_{ij}^{\text{smoothed}} = \lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}} - \lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}}, \quad \text{(B.2)}$$

где $\lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}}$ — расчетное количество клеток при df_{ij}, вычисляемое с использованием β_1 [см. формулу (10)] по формуле

$$\lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}} = \beta_1 \cdot df_{ij}. \quad \text{(B.3)}$$

Приложение С
(справочное)

Примерные формулы для вычисления *PI*

С.1 Подробный пример вычисления *PI* на основании суммы абсолютных значений масштабированных сглаженных остаточных погрешностей

Вычисления *PI* на основании суммы абсолютных значений масштабированных сглаженных остаточных погрешностей PI_{AbsSSR}:

Значение PI_{AbsSSR} , в случае использования e_i^{smoothed} [см. формулу (13)] вычисляют по формуле

$$PI_{\text{AbsSSR}} = \sum_i \left| \frac{e_i^{\text{smoothed}}}{\lambda_{df_i}^{\text{proportional}}} \right|, \tag{C.1}$$

где $\lambda_{df_i}^{\text{proportional}}$ — расчетное количество клеток при df_i, вычисленное по формуле (14).

Значение PI_{AbsSSR}, в случае использования e_{ij}^{smoothed} (см. формулу (В.2)] вычисляют по формуле

$$PI_{\text{AbsSSR}} = \sum_i \sum_j \left| \frac{e_{ij}^{\text{smoothed}}}{\lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}}} \right|, \tag{C.2}$$

где $\lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}}$ — расчетное количество клеток при df_{ij}, вычисленное по формуле (В.3).

С.2 Подробный пример вычисления *PI* на основании R^2 сглаженных остаточных погрешностей

Вычисление *PI* на основании R^2 сглаженных остаточных погрешностей (PI_{R^2SR}):

Значение PI_{R^2SR}, в случае использования e_i^{smoothed} [см. формулу (13)] вычисляют по формуле

$$PI_{R^2SR} = 1 - \frac{\sum_i \left(e_i^{\text{smoothed}}\right)^2}{\sum_i \left(\overline{Y}_{df_i} - \overline{\overline{Y}}_{...}\right)^2}, \tag{C.3}$$

где $\overline{Y}_{df_i}$ — вычисляют по формуле (5);

$\overline{\overline{Y}}_{...}$ — среднее значение средних количеств клеток при каждой df_i по всему набору *I* целевых долей разбавления, вычисленное по формуле

$$\overline{\overline{Y}}_{...} = \frac{\sum_i \overline{Y}_{df_i}}{I}. \tag{C.4}$$

Значение PI_{R^2SR}, в случае использования e_i^{smoothed} [см. формулу (В.2)] вычисляют по формуле

$$PI_{R^2SR} = 1 - \frac{\sum_i \sum_j \left(e_{ij}^{\text{smoothed}}\right)^2}{\sum_i \sum_j \left(\lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}} - \overline{\lambda}^{\text{flexible}}\right)^2}, \tag{C.5}$$

где $\lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}}$ — вычисляют по формуле (В.1) каждого реплицированного репрезентативного испытательного образца *j* при целевой доле разбавления df_i;

$\overline{\lambda}^{\text{flexible}}$ — среднее значение гибко смоделированных количеств клеток $\left(\lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}}\right)$ по всем реплицированным репрезентативным испытательным образцам и по всем целевым долям разбавления, данным в формуле

$$\overline{\lambda}^{\text{flexible}} = \frac{\sum_i \sum_j \lambda_{df_{ij}}^{\text{flexible}}}{\sum_i n_i}. \tag{C.6}$$

Обычно значение PI_{R^2SR} находится в диапазоне от 0 до 1. Чем ближе значение PI_{R^2SR} к 1, тем больше описание процесса измерения будет содержать признаков пропорциональности.

С.3 Дополнительные примеры вычисления *PI* при использовании измеренных долей разбавления

Значение *PI* можно вычислить на основании суммы квадратов сглаженных остаточных погрешностей PI_{SqSR} по формуле

$$PI_{SqSR} = \sum_i \sum_j \left(e_{ij}^{smoothed}\right)^2 . \quad (C.7)$$

Значение *PI* можно вычислить на основании суммы абсолютных сглаженных погрешностей PI_{AbsSSR} по формуле

$$PI_{AbsSR} = \sum_i \sum_j \left|e_{ij}^{smoothed}\right| . \quad (C.8)$$

Значение *PI* можно вычислить на основании суммы квадратов масштабированных сглаженных остаточных погрешностей PI_{SqSR} по формуле

$$PI_{SqSSR} = \sum_i \sum_j \left(\frac{e_{ij}^{smoothed}}{\lambda_{df_{ij}}^{proportional}}\right)^2 . \quad (C.9)$$

В этих случаях, чем ближе значение *PI* *к* 0, тем больше описание процесса измерения будет содержать признаков пропорциональности.

Приложение D
(справочное)

Сценарий 1. Оценка качества разового процесса подсчета клеток

D.1 Общие положения

Простейшим вариантом оценки является оценка качества разового процесса подсчета клеток. В этом случае рекомендуют дать оценку параметров метода, согласно описанию в настоящем стандарте *(%CV, R^2 и PI)*, и определить, насколько качество данного метода соответствует предварительно установленным требованиям.

D.2 Описание плана эксперимента и метода статистического анализа

В данном примере исследованы пять целевых долей разбавления с тремя индивидуальными реплицированными репрезентативными испытательными образцами на каждую долю разбавления. Было выполнено три подсчета общего количества клеток с использованием метода 2; подсчитывали клетки типа А для каждого реплицированного репрезентативного испытательного образца. Бирки прикрепили к образцам в произвольном порядке, а репрезентативные испытательные образцы измеряли в порядке нумерации бирок. Для аналитика, выполнявшего общий подсчет клеток, образцы были обезличенными. Измеренную долю разбавления получили во время приготовления индивидуальных реплицированных испытательных образцов. Далее для анализа *PI* использовали измеренную долю разбавления, как указано в А.2 и приложении В. См. рисунок D.1.

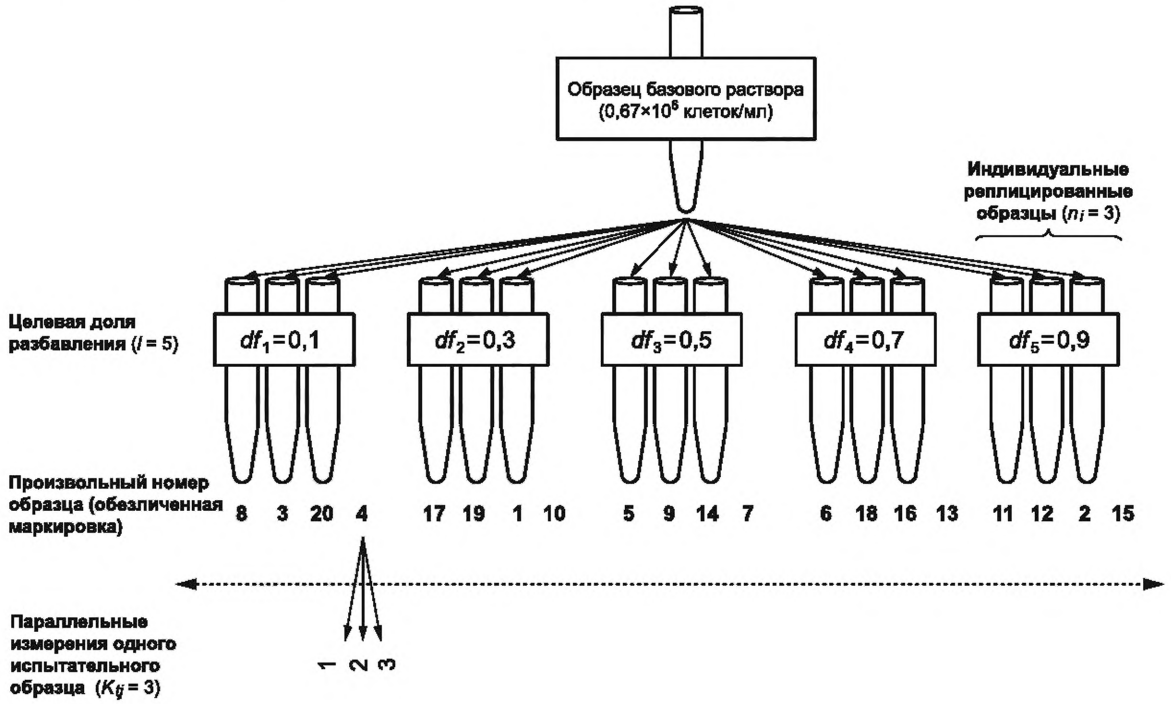


Рисунок D.1 — Схематическое отображение плана эксперимента для примера 1 с подсчетом клеток по методу 2; подсчет общего количества клеток типа А

Общее количество клеток было смоделировано с использованием квазипуассоновского допущения (среднее значение пропорциональное отклонению) для соотношения средних значений отклонения. 95 %-ные интервалы доверительности CI были определены расчетным путем с использованием непараметрического бутстрэп-анализа с 200 итерациями.

D.3 Исходные данные и анализ данных для сценария 1

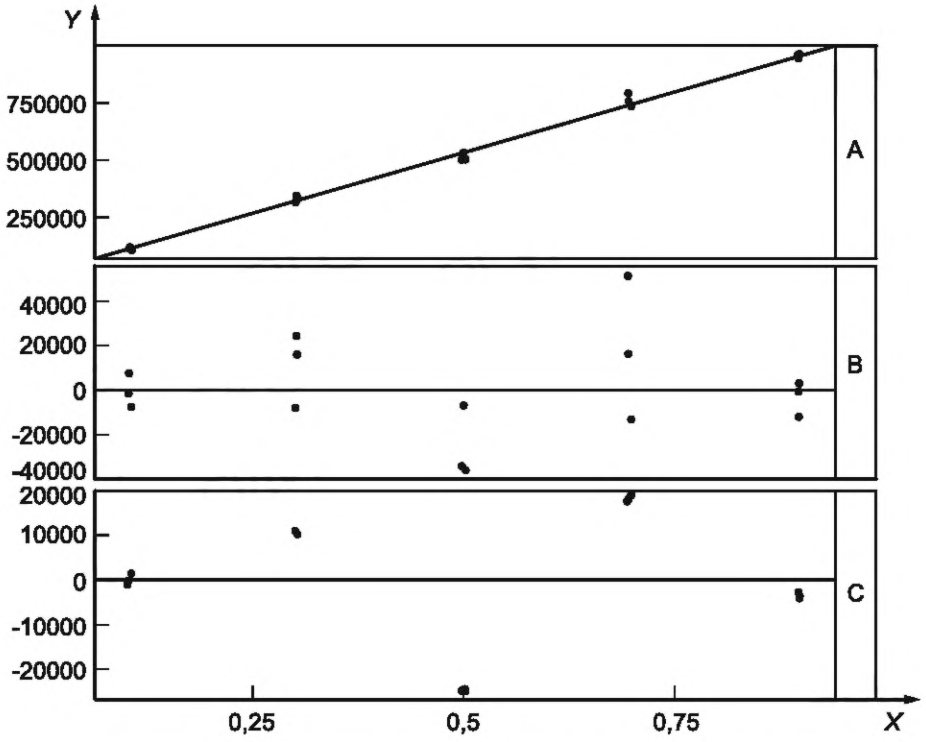
Таблица исходных данных для сценария 1 приведена по интернет адресу: gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru оедставление о данных и остаточных погрешностях из сглаженной модели пропорциональности дано на рисунке D.2.

D.4 Примерный протокол эксперимента для сценария 1

D.4.1 Показатели качества (элементы отчетности — см. 7.1):

а) Среднее значение концентрации $\overline{Y}_{dfi}$ для каждой df_i [см. 7.1а)] приведено в таблице D.1.



X — доля разбавления; *Y* — общая концентрация клеток (клеток/мл) типа A; A — сглаженная модель пропорциональности после усреднения результатов всех параллельных наблюдений; B — исходные значения остаточных погрешностей из сглаженной модели пропорциональности; C — сглаженные значения остаточных погрешностей $e_{ij}^{smoothed}$ подогнанной модели пропорциональности

Рисунок D.2 — Подгонка модели пропорциональности под данные серии разбавлений с использованием измеренной доли разбавления

Таблица D.1 — Значение $\overline{Y}_{df_i}$ для каждой целевой доли разбавления df_i

Метод подсчета	Целевая доля разбавления df_i	$\overline{Y}_{df_i}$, клеток/мл	Стандартное отклонение для $\overline{Y}_{df_i}$, клеток/мл
Метод 2	0,1	108 333	6 300
Метод 2	0,3	329 983	17 536
Метод 2	0,5	504 705	16 297
Метод 2	0,7	757 462	30 249
Метод 2	0,9	949 571	7 874

b) Среднее процентное значение *CV* ($\%\overline{CV}_{df_i}$) для каждой df_i [см. 71 b)] приведено в таблице D.2.

Таблица D.2 — Значение $\%\overline{CV}_{df_i}$ для каждой df_i

Метод подсчета	Целевая доля разбавления df_i	$\%\overline{CV}_{df_i}$	Стандартное отклонение для $\%\overline{CV}_{df_i}$
Метод 2	0,1	5,6 %	4,6 %
Метод 2	0,3	7,7 %	5,2 %
Метод 2	0,5	4,9 %	3,9 %
Метод 2	0,7	3,8 %	1,0 %
Метод 2	0,9	3,9 %	0,5 %

c) Значение R^2 для сглаженной модели пропорциональности [см. 7.1c)] приведено в таблице D.3.

Таблица D.3 — Значение R^2 для сглаженной модели пропорциональности

Метод подсчета	R^2	Ниже 95 % CI (клеток/мл) на основании непараметрического бутстрэп-анализа	Выше 95 % CI (клеток/мл) на основании непараметрического бутстрэп-анализа
Метод 2	0,998 4	0,996 7	0,998 9

d) Индекс пропорциональности *PI* [см. 7.1, d)], представляющий систематическое отклонение от сглаженной модели пропорциональности, дан в таблице D.4.

Таблица D.4 — Индекс пропорциональности *PI*

Метод подсчета	PI_{AbsSSR}	Ниже 95 % CI (на основании непараметрического бутстрэп-анализа)	Выше 95 % CI (на основании непараметрического бутстрэп-анализа)
Метод 2	0,346 5	0,210 0	0,687 5

D.4.2 Документация по параметрам плана эксперимента и методу статистического анализа (элементы отчетности для 7.2):

a) описание исследованной системы подсчета клеток:

1) тип клеток в исследовании: клетки типа A;

2) оцениваемые методы подсчета клеток: метод 2 (общая концентрация клеток);

3) исследованный диапазон концентраций: приблизительно от 108 000 клеток/мл до 950 000 клеток/мл согласно оценки по методу 2;

b) описание элементов плана эксперимента с долями разбавления

1) набор уникальных целевых долей разбавления ($DF = \{df\}_{i=1}^{I}$): DF = {0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9};

2) количество *n* реплицированных испытательных образцов *j* при каждой *dfj* (см. таблицу D.5);

3) количество K_{ij} параллельных наблюдений (*k*) для каждого реплицированного испытательного образца *j* при каждой df_i (см. таблицу D.6);

Таблица D.5 — Количество *n* реплицированных испытательных образцов *j* при каждой *dfj*

n_i	Метод 2
n_1	3
n_2	3
n_3	3
n_4	3
n_5	3

Таблица D.6 — Количество K_{ij} параллельных наблюдений *k* для каждого реплицированного испытательного образца *j* при каждой df_i

K_{ij}	Метод 2
K_{11}	3
K_{12}	3
K_{13}	3
K_{21}	3
K_{22}	3
K_{23}	3
K_{31}	3
K_{32}	3
K_{33}	3
K_{41}	3
K_{42}	3

Окончание таблицы D.6

K_{ij}	Метод 2
K_{43}	3
K_{51}	3
K_{52}	3
K_{53}	3

c) описание метода оценки вкладов погрешности пипетирования в надежность разбавления:

1) измеренную долю разбавления df_{ij} получили для каждого испытательного образца, подготовленного в соответствии с А.2 (см. таблицу D.7);

2) для получения результатов измерения массы использовали градуированную шкалу с чувствительностью до 0,0001 г;

3) значение *PI* вычислили на основании df_{ij} и e_{ij}^{smoothed} в соответствии с приложением В и С.1;

Таблица D.7 — Измеренная доля разбавления для каждого испытательного образца

Реплицированный испытательный образец	Целевая доля разбавления df_i	Измеренная доля разбавления
1	0,1	0,102 0
2	0,1	0,101 3
3	0,1	0,104 7
1	0,3	0,301 3
2	0,3	0,302 2
3	0,3	0,300 3
1	0,5	0,502 4
2	0,5	0,498 6
3	0,5	0,500 5
1	0,7	0,700 3
2	0,7	0,696 3
3	0,7	0,696 9
1	0,9	0,900 4
2	0,9	0,899 1
3	0,9	0,899 3

d) описание допущения, использованного для моделирования отношения средних значений отклонения в сглаженной модели пропорциональности: допущение для соотношения средних значений отклонения: вариативность пропорциональна среднему значению;

e) описание формулы для подгонки модели пропорциональности: ($\lambda_{ij}^{\text{proportional}} = \beta_1 \cdot df_{ij}$) с коэффициентами из таблицы D.8;

Таблица D.8 — Формула для подгонки модели пропорциональности

Метод подсчета	Тип клеток	Тип концентрации	Константа пропорциональности β_1 (клеток/мл)	Ниже 95 % CI (клеток/мл) на основании непараметрического бутстрэп-анализа	Выше 95 % CI (клеток/мл) на основании непараметрического бутстрэп-анализа
Метод 2	A	Общая концентрация клеток	1 059 214	1 040 052	1 080 296

f) Описание метода, использованного для вычисления *PI*:

1) первичный метод вычисления *PI*: сумма абсолютных значений масштабированных сглаженных остаточных погрешностей PI_{AbsSSR},

2) метод сглаживания: сглаживание на основании измеренной доли разбавления $e_{ij}^{smoothed}$,

3) формула для вычисления PI_{AbsSSR}: $PI_{AbsSSR} = \sum_i \sum_j \left| \frac{e_{ij}^{smoothed}}{\lambda_{df_{ij}}^{proportional}} \right|$.

D.4.3 Дополнительные элементы отчетности согласно 7.2 и 7.3 по плану эксперимента, методу статистического анализа и процедуре подсчета клеток:

a) описание базового клеточного раствора:

1) базовый раствор: базовый раствор 1,

2) суспендирующая среда: полная среда MEM с 10 % FBS,

3) концентрация базового раствора (клеток/мл): приблизительно 923 700,

4) метод оценки концентрации базового раствора: метод 2;

b) описание способа разбавления:

1) разбавитель: полная среда MEM с 10 % FBS,

2) индивидуальные разбавления в произвольном порядке экстракции из базового раствора,

3) измеренные доли разбавления, полученные во время приготовления образца;

c) описание типа клеток и концентрации клеток:

1) тип клеток: клетки типа A, перенос 3,

2) метод подсчета: метод 2, полная концентрация клеток;

d) описание получения испытательного образца и порядка измерений:

1) порядок экстракции из базы (порядок получения): 2; 1; 3; 6; 4; 5; 8; 9; 7; 11; 12; 10; 14; 15; 13,

2) случайный номер образца (порядок измерений): 3; 6; 15; 1; 12; 14; 7; 10; 4; 13; 11; 5; 9; 2; 8;

e) описание установок непараметрического бутстрэп-анализа:

1) количество выполненных итераций бутстрэп-анализа: 200,

2) уровень доверительности для бутстрэп-анализа: 0,95;

f) описание дополнительных параметров для оценки пропорциональности приведено в таблице D.9.

Таблица D.9 — Дополнительные параметры для оценки пропорциональности

PI-метод	*PI* (для метода 2, тип клеток A)	Ниже 95 % CI (на основании непараметрического бутстрэп-анализа)	Выше 95 % CI (на основании непараметрического бутстрэп-анализа)
PI_{R^2SR}	0,999 3	0,997 7	0,999 8
PI_{AbsSR}	1,592 1	0,772 2	3,177 9
PI_{SqSSR}	0,011 6	0,004 1	0,041 9

D.5 Интерпретация

Метод 2, для типа клеток A, в диапазоне концентраций приблизительно от 108 000 клеток/мл до 950 000 клеток/мл имеет значение *PI* (на основании суммы абсолютных значений масштабированных сглаженных остаточных погрешностей) 0,346 5 с CI [0,210 0, 0,687 5]. Предполагают, что при повторных измерениях *PI* для данного метода и типа клеток в данном диапазоне концентраций клеток значение *PI* должно иметь CI, перекрывающееся с данным CI. Если *PI* отклоняется от этого диапазона во времени или в зависимости, например от прибора, оператора, местоположения и так далее, это будет показателем изменения в систематическом поведении общего процесса измерений, которое необходимо исследовать. R^2 и $\%\overline{CV}_{df_i}$ интерпретируют аналогичным образом.

Приложение Е
(справочное)

Сценарий 2. Сопоставление качества нескольких процессов подсчета клеток

Е.1 Общие положения

В данном случае параллельно сравнивают четыре процесса подсчета клеток. По плану эксперимента клеточные суспензии от каждого репрезентативного испытательного образца оценивают в трех повторностях по четырем разным процессам подсчета клеток. В этом сценарии целесообразно сравнивать параметры, описанные в стандарте ($\%\overline{CV}_{df_i}$, $\overline{Y}_{df_i}$, R^2 и PI), между процессами измерений. Результаты этих сравнений помогут сделать выбор процесса подсчета клеток, соответствующий заданной цели.

Е.2 Описание плана эксперимента и статистического анализа

В данном сценарии были смоделированы четыре процесса подсчета клеток в силиконовом растворе для демонстрации пропорциональных/непропорциональных ответных реакций, а также прецизионных/непрецизионных ответных реакций. Всего были смоделированы пять целевых долей разбавления и по три индивидуальных реплицированных репрезентативных испытательных образца на каждую долю разбавления. Результаты этих моделированных подсчетов общего количества клеток были собраны с использованием следующих методов моделирования: метода 5, метода 6, метода 7 и метода 8, для моделированного типа клеток каждого реплицированного репрезентативного испытательного образца. Также были смоделированы погрешность пипетирования и сделана предварительная оценка доли разбавления. Согласно этой предварительной оценке доля разбавления отвечала критериям, установленным пользователем, а при определении качественных показателей использовали значение целевой доли разбавления.

Данные по общему подсчитанному количеству клеток моделировали с использованием квазипуассоновского допущения (среднее значение пропорциональное отклонению) для соотношения средних значений отклонения. 95 %-ные интервалы доверительности были определены расчетным путем с использованием непараметрического бутстрэп-анализа с 200 итерациями. См. рисунок Е.1.

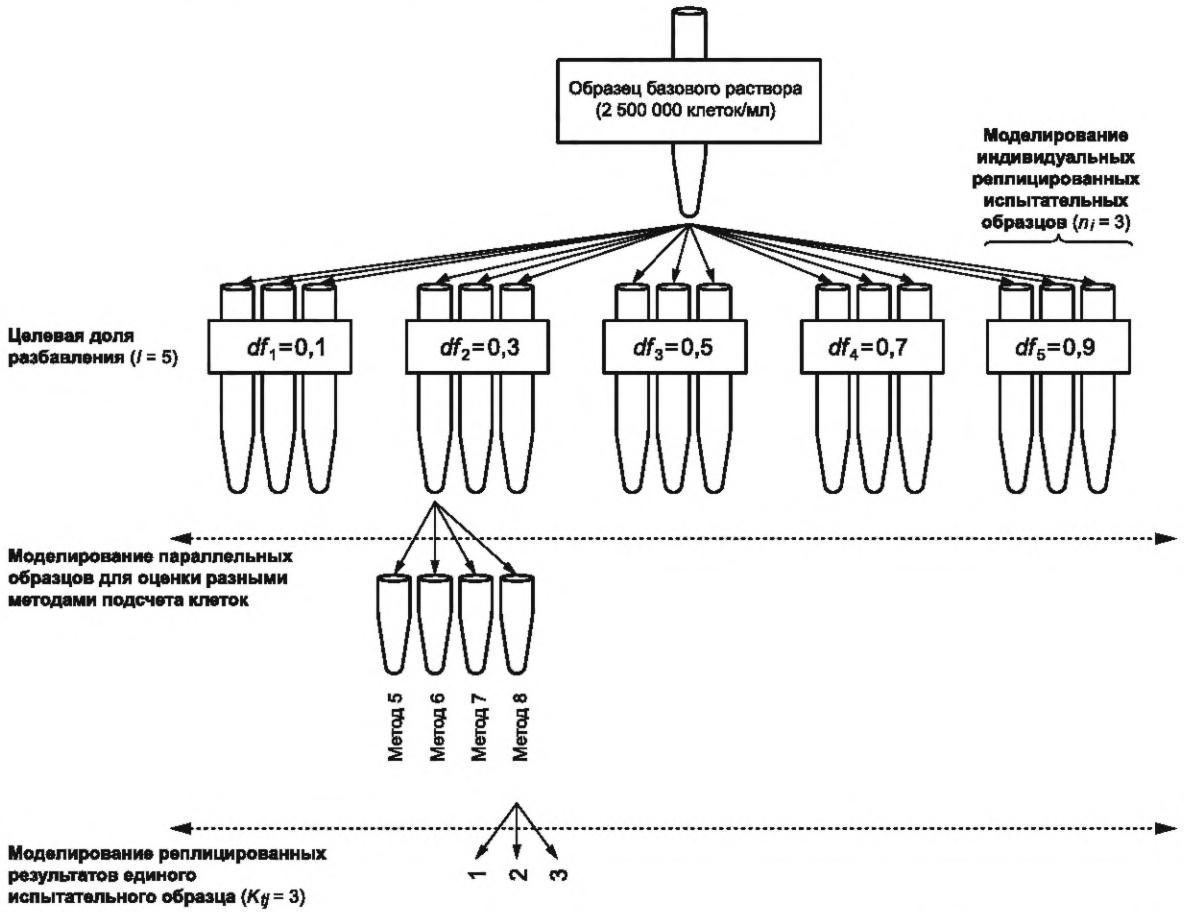


Рисунок Е.1 — Схематическое отображение плана эксперимента для сценария 2 сопоставления моделированных методов общего подсчета моделированного типа клеток

Е.3 Исходные данные и анализ данных для сценария 2

Таблица исходных данных для сценария 2 приведена по интернет адресу: gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru

Предварительную оценку вкладов погрешности пипетирования в надежность разбавления выполняли в соответствии с А.1 (см. таблицу Е.1). Определенные пользователем критерии надежности разбавления были установлены на уровне $R^2_{\text{Dilution}} \geq 0{,}980$.

Таблица Е.1 — Исходные данные для предварительной оценки вкладов погрешности пипетирования в надежность разбавления с подгонкой модели пропорциональности и коэффициентом детерминации для надежности разбавления

Целевая доля разбавления df_i	Предварительная оценка доли разбавления $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$
0,1	0,100 4
0,1	0,098 9
0,1	0,101 8
0,3	0,303 6
0,3	0,31
0,3	0,304 2
0,5	0,487 4
0,5	0,497 9
0,5	0,519 3
0,7	0,725 3
0,7	0,708
0,7	0,700 2
0,9	0,906 9
0,9	0,899 2
0,9	0,900 6

Строят график зависимости $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$ от df_i и вычерчивают линию, проходящую через начало координат (0,0) (то есть, сглаживают модель пропорциональности), в соответствии с данными (см. рисунок Е.2):

$$df_{ij}^{\text{pre-evaluated}} = \beta^{\text{pipetting}} df_i + m_i,$$

где $\beta^{\text{pipetting}} = 1{,}008$;

с $R^2_{\text{Dilution}} = 0{,}999\ 1$.

Обзор данных и значений остаточной погрешности из сглаженной модели пропорциональности приведен на рисунке Е.3.

Е.4 Примерный протокол эксперимента для сценария 2

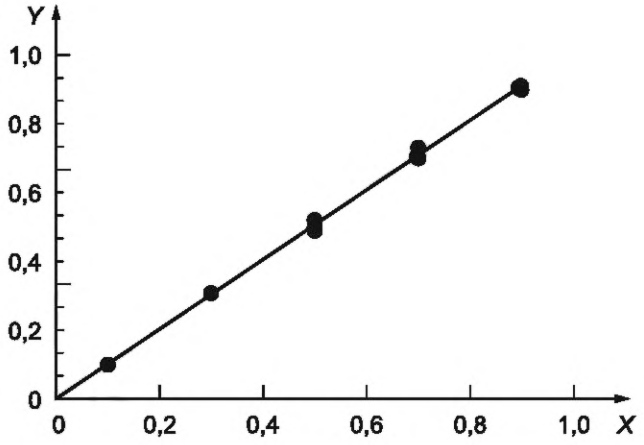
Е.4.1 Показатели качества (элементы отчетности из 7.1):

a) среднее значение концентрации $\overline{Y}_{df_i}$ для каждой df_i [см. 7.1a)] приведено на рисунке Е.4 и в таблице Е.2:

b) среднее процентное значение CV ($\%\overline{CV}_{df_i}$) для каждой df_i [см. 7.1b)] приведено на рисунке Е.5 и в таблице Е.3;

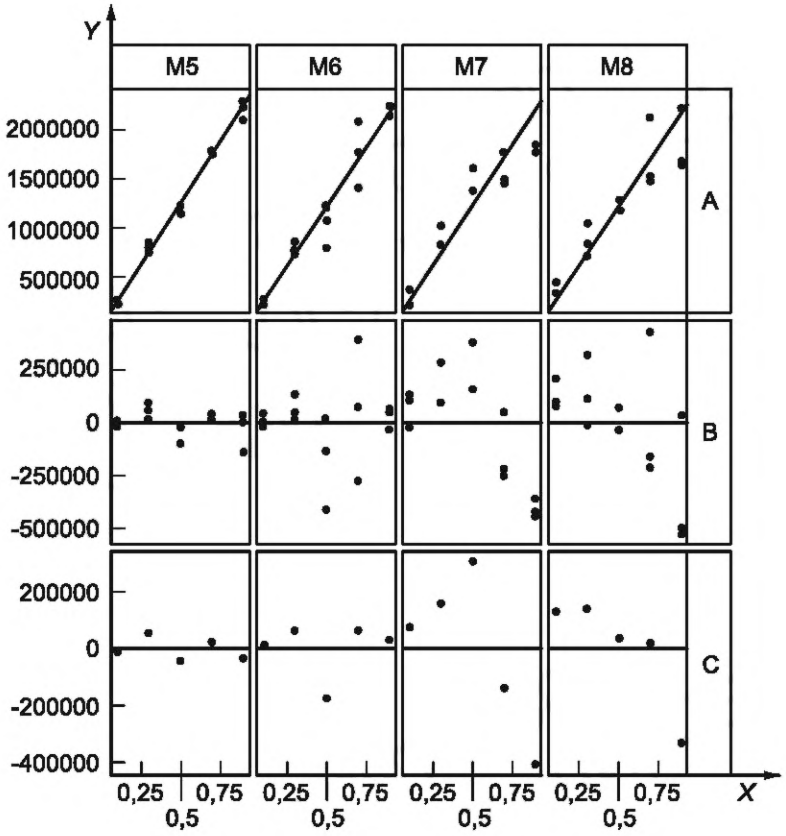
c) Значение R^2 для сглаживания модели пропорциональности [см. 7.1c)] приведено на рисунке Е.6 и в таблице Е.4;

d) индекс пропорциональности PI [см. 7.1d)], представляющий систематическое отклонение от сглаженной модели пропорциональности, приведен на рисунке Е.7 и в таблице Е.5.



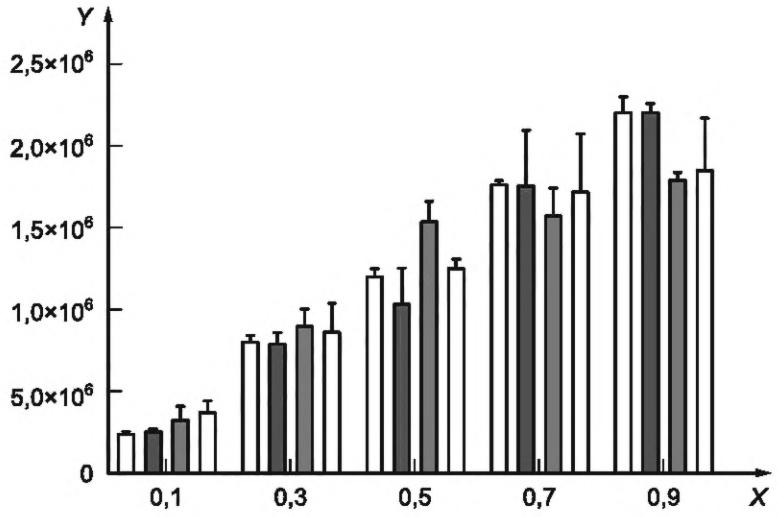
X — $df_{\text{pre-evaluated}}$; Y — целевая доля разбавления df_i

Рисунок Е.2 — График зависимости $df_{\text{pre-evaluated}}$ от целевой доли разбавления df_i с подгонкой модели пропорциональности для оценки вкладов погрешности пипетирования в надежность разбавления



X — доля разбавления; Y — концентрация клеток (клеток/мл); A — сглаженная модель пропорциональности после усреднения результатов параллельных наблюдений (клеток/мл); B — исходные значения остаточных погрешностей из модели пропорциональности (клеток/мл); C — сглаженные остаточные погрешности из модели пропорциональности (клеток/мл)

Рисунок Е.3 — Сглаживание модели пропорциональности по данным серии разбавлений для каждого метода в сценарии 2

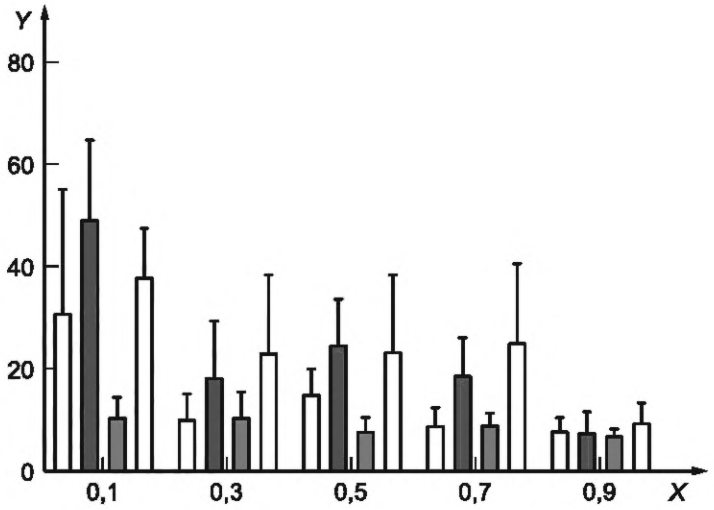


X — коэффициент целевого разбавления df_i; *Y* — средняя концентрация клеток $\overline{Y}_{df_i}$ (клеток/мл) с планками погрешности, представляющими значение стандартного отклонения; ▭ — метод 5; ▭ — метод 6; ▭ — метод 7; ▭ — метод 8

Рисунок Е.4 — Средняя концентрация клеток $\overline{Y}_{df_i}$ моделированного типа клеток по всем репрезентативным испытательным образцам при каждой целевой доле разбавления df_i для каждого метода подсчета

Таблица Е.2 — Значение $\overline{Y}_{df_i}$ для каждой целевой доли разбавления df_i для каждого метода

Метод подсчета	Целевая доля разбавления df_i	$\overline{Y}_{df_i}$, клеток/мл	Стандартное отклонение для $\overline{Y}_{df_i}$, клеток/мл
Метод 5	0,1	244 498	12 612
Метод 5	0,3	804 353	39 527
Метод 5	0,5	1 203 474	46 994
Метод 5	0,7	1 769 138	13 062
Метод 5	0,9	2 209 022	92 759
Метод 6	0,1	252 670	32 013
Метод 6	0,3	790 678	65 099
Метод 6	0,5	1 033 595	217 992
Метод 6	0,7	1 755 531	335 989
Метод 6	0,9	2 205 380	52 234
Метод 7	0,1	321 385	87 008
Метод 7	0,3	894 437	111 825
Метод 7	0,5	1 531 075	127 905
Метод 7	0,7	1 574 980	166 916
Метод 7	0,9	1 796 086	40 930
Метод 8	0,1	372 990	68 611
Метод 8	0,3	869 230	167 854
Метод 8	0,5	1 248 944	60 959
Метод 8	0,7	1 716 857	356 504
Метод 8	0,9	1 847 770	319 374

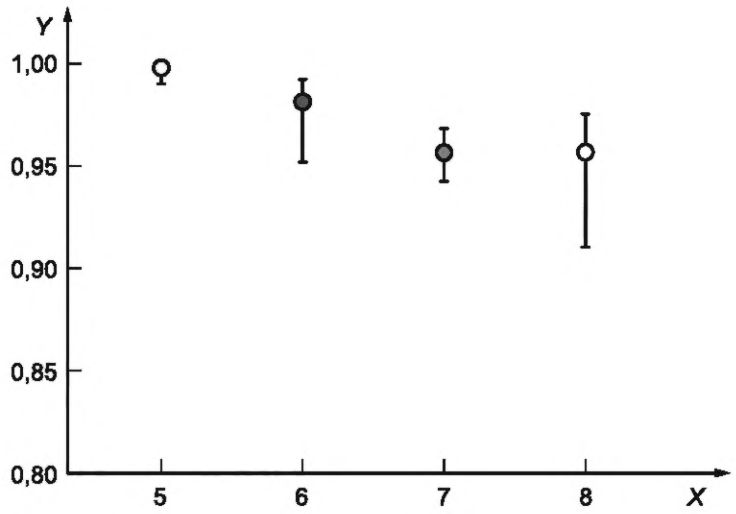


X — коэффициент целевого разбавления df_i; *Y* — среднее значение % *CV* ($\%\overline{CV}_{df_i}$) с планками погрешности, представляющими значение стандартного отклонения; — метод 5; — метод 6; — метод 7; — метод 8

Рисунок Е.5 — График, отображающий среднее процентное значение % *CV* ($\%\overline{CV}_{df_i}$) для результатов параллельных подсчетов концентраций клеток при каждой целевой доле разбавления df_i для каждого метода подсчета

Таблица Е.3 — Значение $\overline{CV}_{df_i}$ для каждой df_i

Метод подсчета	Целевая доля разбавления df_i	$\%\overline{CV}_{df_i}$	Стандартное отклонение для $\%\overline{CV}_{df_i}$
Метод 5	0,1	30,7 %	24,5 %
Метод 5	0,3	9,9 %	5,3 %
Метод 5	0,5	15,2 %	4,9 %
Метод 5	0,7	8,9 %	3,5 %
Метод 5	0,9	7,5 %	3,0 %
Метод 6	0,1	49,0 %	15,7 %
Метод 6	0,3	18,1 %	11,3 %
Метод 6	0,5	24,7 %	9,0 %
Метод 6	0,7	18,7 %	7,4 %
Метод 6	0,9	7,3 %	4,2 %
Метод 7	0,1	10,6 %	3,9 %
Метод 7	0,3	10,4 %	5,2 %
Метод 7	0,5	7,7 %	2,8 %
Метод 7	0,7	8,8 %	2,6 %
Метод 7	0,9	6,9 %	1,4 %
Метод 8	0,1	37,7 %	9,8 %
Метод 8	0,3	23,1 %	15,4 %
Метод 8	0,5	23,2 %	14,9 %
Метод 8	0,7	25,1 %	15,5 %
Метод 8	0,9	9,2 %	4,2 %



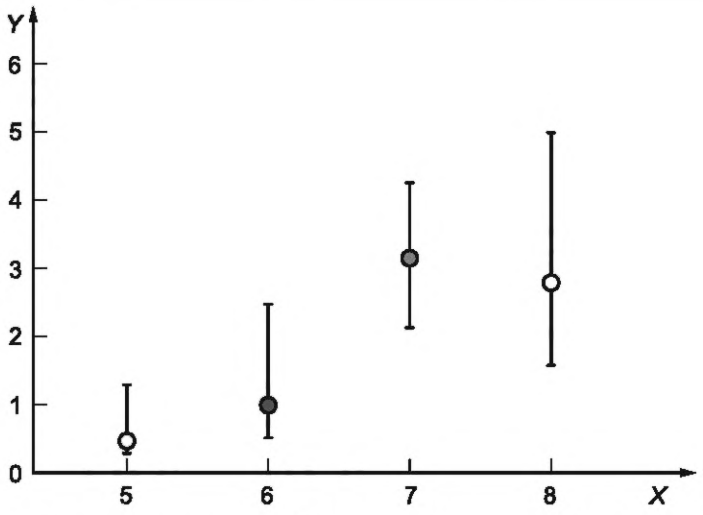
X — метод подсчета клеток; *Y* — R^2; ○ — метод 5; ● — метод 6; ● — метод 7; ○ — метод 8

Примечание — Планки погрешности представляют 95 % CI по результатам непараметрического бутстрэп-анализа для моделированных методов подсчета клеток.

Рисунок Е.6 — Значение R^2 для сглаживания модели пропорциональности по четырем методам подсчета для моделированного типа клеток и общей концентрации клеток

Таблица Е.4 — Значение R^2 для сглаживания модели пропорциональности

Метод подсчета	R^2	Ниже 95 % CI (клеток/мл) на основании результатов непараметрического бутстрэп-анализа	Выше 95 % CI (клеток/мл) на основании результатов непараметрического бутстрэп-анализа
Метод 5	0,998 0	0,990 6	0,997 7
Метод 6	0,981 6	0,952 1	0,992 4
Метод 7	0,957 0	0,942 6	0,968 8
Метод 8	0,956 9	0,910 7	0,975 6



X — метод подсчета клеток; *Y* — PI_{AbsSSR}; ○ — метод 5; ● — метод 6; ● — метод 7; ○ — метод 8

Примечание — Планки погрешности представляют 95 % CI по результатам непараметрического бутстрэп-анализа для моделированных методов подсчета клеток.

Рисунок Е.7 — Индекс пропорциональности (*PI*) на основании суммы абсолютных значений масштабированных сглаженных остаточных погрешностей для моделированного типа клеток и общей концентрации клеток

Таблица Е.5 — Индекс пропорциональности

Метод подсчета	PI (PI_{AbsSSR})	Ниже 95 % CI (клеток/мл) на основании результатов непараметрического бутстрэп-анализа	Выше 95 % CI (клеток/мл) на основании результатов непараметрического бутстрэп-анализа
Метод 5	0,474 7	0,298 6	1,289 4
Метод 6	1,003 7	0,517 5	2,468 3
Метод 7	3,144 0	2,126 7	4,253 9
Метод 8	2,796 3	1,573 4	5,002 2

Е.4.2 Документация по параметрам плана эксперимента и метода статистического анализа (элементы отчетности для 7.2):

a) описание исследуемых систем подсчета клеток, включая:

1) типы клеток, использованных в исследовании: моделированный тип клеток,

2) оцениваемые методы подсчета клеток: метод 5, метод 6, метод 7, метод 8 (общая концентрация клеток),

3) исследуемые диапазоны концентраций: приблизительно от 240 000 клеток/мл до 2 200 000 клеток/мл в соответствии с оценкой по методу 5;

b) описание элементов плана эксперимента с долями разбавления:

1) набор уникальных целевых долей разбавления ($DF = \{df_i\}_{i=1}^{I}$): DF = {0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9};

2) количество n реплицированных испытательных образцов j при каждой df_j (см. таблицу Е.6);

3) количество K_{ij} параллельных наблюдений k для каждого реплицированного испытательного образца j при каждой df_i (см. таблицу Е.7).

Таблица Е.6 — Количество n_i реплицированных испытательных образцов j при каждой dfj

n_i	Метод 5	Метод 6	Метод 7	Метод 8
n_1	3	3	3	3
n_2	3	3	3	3
n_3	3	3	3	3
n_4	3	3	3	3
n_5	3	3	3	3

Таблица Е.7 — Количество K_{ij} параллельных наблюдений k по каждому реплицированному испытательному образцу j при каждой df_i

K_{ij}	Метод 5	Метод 6	Метод 7	Метод 8
K_{11}	3	3	3	3
K_{12}	3	3	3	3
K_{13}	3	3	3	3
K_{21}	3	3	3	3
K_{22}	3	3	3	3
K_{23}	3	3	3	3
K_{31}	3	3	3	3
K_{32}	3	3	3	3
K_{33}	3	3	3	3
K_{41}	3	3	3	3
K_{42}	3	3	3	3
K_{43}	3	3	3	3

Окончание таблицы Е.7

K_{ij}	Метод 5	Метод 6	Метод 7	Метод 8
K_{51}	3	3	3	3
K_{52}	3	3	3	3
K_{53}	3	3	3	3

c) описание метода оценки вкладов погрешностей пипетирования в надежность разбавления:

1) вклады погрешности пипетирования в надежность разбавления предварительно оценивают в соответствии с А.1 (моделирование);

2) использованная суспензия для представления клеточного образца не применима (моделирование);

3) использованная суспензия для представления клеточного образца не применима (моделирование);

4) градуированную шкалу с чувствительностью до 0,000 1 г используют для получения результатов измерений массы при приготовлении испытательных образцов при $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$ (моделирование);

5) значение R^2_{Dilution} вычисляют на основании подгонки модели пропорциональности для соотношения $df_{ij}^{\text{pre-evaluated}}$ против df_i (в соответствии с А.2);

6) установленный пользователем критерий надежности разбавления равен $R^2_{\text{Dilution}} \geq 0{,}980$;

7) результаты предварительной оценки надежности разбавления даны в таблице Е.8:

Таблица Е.8 — Установленные пользователем критерии допустимости вклада погрешности пипетирования в надежность разбавления

Критерий допустимости для надежности разбавления	Предварительно оцененная надежность разбавления	Метод вычисления сглаженных остаточных погрешностей
$R^2_{\text{Dilution}} \geq 0{,}980$	$R^2_{\text{Dilution}} = 0{,}990$	e_i^{smoothed}

d) описание допущения, использованного для моделирования соотношения средних значений отклонения при подгонке модели пропорциональности; предположение для соотношения среднего значения и значения вариативности пропорционально среднему значению;

e) описание формулы для подгонки модели пропорциональности ($\lambda_{ij}^{\text{proportional}} = \beta_1 \cdot df_{ij}$) с коэффициентами, приведенными в таблице Е.9:

Таблица Е.9 — Формула для подгонки модели пропорциональности $\lambda_{ij}^{\text{proportional}} = \beta_1 \cdot df_{ij}$

Метод подсчета	Тип клеток	Тип концентрации	Константа пропорциональности β_1 (клеток/мл)	Ниже 95 % CI (клеток/мл) на основании результатов непараметрического бутстрэп-анализа	Выше 95 % CI (клеток/мл) на основании результатов непараметрического бутстрэп-анализа
Метод 5	Моделированный	Общая клеточная концентрация	2 492 194	2 413 060	2 566 922
Метод 6	Моделированный	Общая клеточная концентрация	2 415 142	2 231 756	2 598 597
Метод 7	Моделированный	Общая клеточная концентрация	2 447 185	2 340 644	2 558 819
Метод 8	Моделированный	Общая клеточная концентрация	2 422 316	2 203 090	2 625 971

f) описание метода вычисления *PI:*

1) основной метод вычисления *PI*: сумма абсолютных значений масштабированных сглаженных остаточных погрешностей PI_{AbsSSR},

2) метод сглаживания: сглаживание на основании измеренной доли разбавления e_{ij}^{smoothed};

3) формула для вычисления PI_{AbsSSR}: $PI_{\text{AbsSSR}} = \sum_i \sum_j \left| \frac{e_{ij}^{\text{smoothed}}}{\lambda_{df_{ij}}^{\text{proportional}}} \right|$.

Е.4.3 Дополнительные элементы отчетности из 7.2 и 7.3 по плану эксперимента, методу статистического анализа и процессу подсчета клеток:

a) описание базового клеточного раствора:
   1) базовый раствор не применим (смоделирован);
   2) суспендирующая среда не применима (смоделирована);
   3) концентрация базового раствора (клеток/мл): приблизительно 2 500 000;
   4) метод оценки концентрации клеточного раствора: метод 5;
b) описание метода разбавления:
   1) разбавитель не применим (смоделирован);
   2) индивидуальные разбавления (смоделированы);
c) тип клеток и тип концентрации:
   1) тип клеток: смоделированный тип клеток,
   2) тип концентрации: общая концентрация клеток;
d) получение испытательных образцов и порядок измерений:
   1) порядок экстрагирования базового раствора (порядок получения образцов) не применим (смоделирован);
   2) нумерация образцов в случайном порядке (порядок нумерации) не применима (смоделирована);
e) настройки непараметрического бутстрэп-анализа:
   1) количество выполненных бутстрэп-итераций: 200;
   2) уровень доверительности бутстрэп-анализа: 0,95.

Е.5 Сопоставление методов подсчета клеток в сценарии 2

Е.5.1 Сопоставление показателей качества методов подсчета клеток

Когда аналогичные планы эксперимента с серией разбавлений используют для оценки нескольких методов подсчета, выполняют сопоставление показателей качества (т.е. *PI* и R^2); сопоставляют между методами. Методы сопоставляют между собой путем оценки числовых значений показателей качества двух методов. Например, сопоставление значений *PI* выполняют методом определения соотношения значений *PI* двух методов по формуле

$$Ratio_{PI_{\text{SAbsSR}}} = \frac{PI_{\text{AbsSSR}}^{\text{Method A}}}{PI_{\text{AbsSSr}}^{\text{Method B}}}, \quad \text{(E.1)}$$

где $PI_{\text{AbsSSR}}^{\text{Method A}}$ и $PI_{\text{AbsSSr}}^{\text{Method B}}$ — значения *PI* на основании *AbsSSR* [см. формулу (С.1)] двух методов подсчета.

В этом случае оба метода подсчета имеют одно и то же *PI*-значение, а $Ratio_{PI_{\text{AbsSSR}}}$ равно 1, означающее отсутствие разницы между PI_{AbsSSR} двух методов. Коэффициент соотношения выше 1 означает, что метод А имеет более высокое значение PI_{AbsSSR} (и более низкую степень пропорциональности), чем метод В, а коэффициент соотношения ниже 1 означает, что метод А имеет более низкое значение PI_{AbsSSR} (и более высокую степень пропорциональности), чем метод В. Аналогичное сопоставление выполняют между другими значениями *PI* и показателями качества.

Для оценки значимости разницы между показателями качества, вычисленными для разных методов подсчета клеток, был выполнен непараметрический бутстрэп-анализ (200 итераций), по результатам которого получены 95 %-ные уровни доверительности CI для каждого показателя каждого метода. Существенную разницу между показателями качества наблюдают, когда 95 %-ный уровень доверительности CI для соотношения между числовыми значениями показателей качества (например, $Ratio_{PI_{\text{AbsSSR}}}$) исключает значение 1 (то есть, значение 1 для коэффициента соотношения означает отсутствие разницы между показателями качества разных методов) (см. таблицу Е.10). Аналогичный подход применяют для R^2 (см. таблицу Е.11).

Таблица Е.10 — Оценка существенной разницы между значениями R^2 методов подсчета клеток

Уровень 1	Уровень 2	$Ratio_{R^2}$	Ниже 95 % CI для $Ratio_{R^2}$ на основании непараметрического бутстрэп-анализа	Выше 95 % CI для $Ratio_{R^2}$ на основании непараметрического бутстрэп-анализа	Выявлена ли существенная разница между методами? (Включает ли 95 % CI значение 1)
Метод 5	Метод 6	1,017	1,005	1,043	Да
Метод 5	Метод 7	1,043	1,027	1,055	Да

Окончание таблицы Е.10

Уровень 1	Уровень 2	$Ratio_{R^2}$	Ниже 95 % CI для $Ratio_{R^2}$ на основании непараметрического бутстрэп-анализа	Выше 95 % CI для $Ratio_{R^2}$ на основании непараметрического бутстрэп-анализа	Выявлена ли существенная разница между методами? (Включает ли 95 % CI значение 1)
Метод 5	Метод 8	1,043	1,022	1,085	Да
Метод 6	Метод 7	1,026	0,994	1,045	Нет
Метод 6	Метод 8	1,026	0,994	1,073	Нет
Метод 7	Метод 8	1,000	0,981	1,043	Нет

Таблица Е.11 — Оценка существенной разницы между значениями PI_{AbsSSR} методов подсчета клеток

Уровень 1	Уровень 2	$Ratio_{PI_{AbsSSR}}$	Ниже 95 % CI для $Ratio_{PI_{AbsSSR}}$ на основании непараметрического бутстрэп-анализа	Выше 95 % CI для $Ratio_{PI_{AbsSSR}}$ на основании непараметрического бутстрэп-анализа	Выявлена ли существенная разница между методами? (Включает ли 95 % CI значение 1)
Метод 5	Метод 6	0,473	0,216	1,246	Нет
Метод 5	Метод 7	0,151	0,089	0,451	Да
Метод 5	Метод 8	0,170	0,098	0,483	Да
Метод 6	Метод 7	0,319	0,193	0,831	Да
Метод 6	Метод 8	0,359	0,197	0,957	Да
Метод 7	Метод 8	1,124	0,624	1,815	Нет

Е.6 Интерпретация

Каждый метод в сценарии 2 можно оценивать индивидуально согласно описанию в D.4.

Сопоставления методов подсчета клеток — метода 5 и метода 6 показали существенную разницу в степени их соответствия модели пропорциональности, основанной на R^2, однако, оценка отклонения от пропорциональности, обозначенная как PI_{AbsSSR}, предполагает, что вероятной причиной различий, наблюдаемых в значениях R^2, могут быть не только существенные различия в пропорциональности. Оценка $\%\overline{CV}_{df_i}$ предполагает, что на различия между методом 5 и методом 6 в большей степени оказали различия в значениях прецизионности между этими двумя методами.

Методы 7 и 8 продемонстрировали значительно более высокое значение отклонения от пропорциональности, чем методы 5 и 6.

Хотя индивидуальные результаты метода 6 и метода 8 имеют аналогичную степень соответствия сглаженной модели пропорциональности (на основании значений R^2), дополнительная оценка пропорциональности с использованием параметров *PI* и непараметрического бутстрэп-анализа показала существование значительных различий в систематическом отклонении от пропорциональности между методом 6 и методом 8. Расхождение результатов этих двух методов (на основании $\%\overline{CV}_{df_i}$) могло скрывать различия в пропорциональности между двумя методами в анализе R^2.

Е.7 Согласованность результатов с основополагающей имитационной моделью

Моделированные в сценарии 2 методы подсчета клеток имеют параметры основополагающей модели, приведенные в таблице Е.12 и на рисунке Е.8.

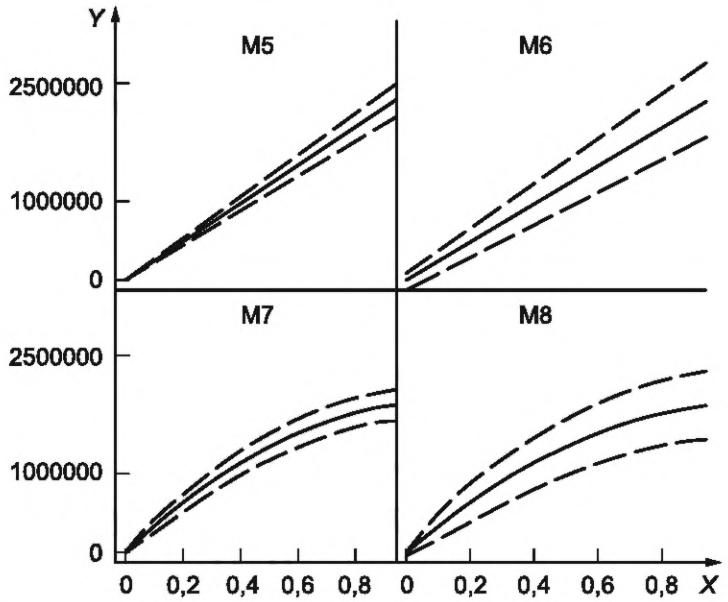
План эксперимента по подсчету клеток был смоделирован на основании методов подсчета, описанных в таблице Е.12. Анализ пропорциональности для набора моделированных данных в общих чертах согласован с ожидаемым откликом смоделированных методов подсчета. Оба метода, метод 6 и метод 8, были смоделированы как обладающие недостаточной прецизионностью. Явное различие в значениях $\%\overline{CV}_{df_i}$, вероятно, является случайным явлением, исчезающим по мере получения дополнительных результатов по каждому методу.

Таблица Е.12 — Параметры моделированных методов подсчета моделированного типа клеток в варианте использования 2

Параметры модели для имитированных методов подсчета клеток	Метод 5	Метод 6	Метод 7	Метод 8
Пропорциональность	+[a]	+	–	–
Прецизионность	+	–	+	–

Окончание таблицы Е.12

Параметры модели для имитированных методов подсчета клеток	Метод 5	Метод 6	Метод 7	Метод 8
Точность отсечения	0	0	0	0
Точный уклон β_1	2 460 669	2 460 669	3 448 563	3 448 563
Точный квадратичный коэффициент	0	0	−1 550 000	−1 550 000
Точное отклонение/среднее отношение	4 900	24 806	4 900	24 806
[a] "+" указывает на высокую пропорциональность или прецизионность; "–" означает низкую пропорциональность или прецизионность.				



X — доля разбавления; *Y* — концентрация клеток (клеток на мл); М5 — метод 5; М6 — метод 6; М7 — метод 7; М8 — метод 8

Примечание — Пунктирные линии обозначают доверительный интервал 95 %.

Рисунок Е.8 — Графическое отображение основополагающих моделей для имитированных методов подсчета клеток в сценарии 2

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочного международного стандарта национальному стандарту

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ISO 20391-1	IDT	ГОСТ Р ИСО 20391-1—2023 «Биотехнология. Подсчет клеток. Часть 1. Общее руководство по методам подсчета клеток»

Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта:

- IDT — идентичный стандарт.

Библиография

[1] ISO 3534-1 *Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: General statistical terms and terms used in probability (Статистика. Словарь и условные обозначения. Часть 1. Общие статистические термины и термины, используемые в теории вероятностей)*

[2] ISO 5725-1:1994 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)*

[3] ISO 5725-2:1994 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения)*

[4] ISO 8655-1:2002 *Piston-operated volumetric apparatus — Part 1: Terminology, general requirements and user recommendations (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 1. Терминология, общие требования и рекомендации пользователю)*

[5] ISO 8655-2:2002 *Piston-operated volumetric apparatus — Part 2: Piston pipettes (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 2. Пипетки, приводимые в действие поршнем)*

[6] ISO 8655-6:2002 *Piston-operated volumetric apparatus — Part 6: Gravimetric methods for the determination of measurement error (Устройства мерные, приводимые в действие поршнем. Часть 6. Гравиметрические методы для определения погрешности измерения)*

[7] ISO 9000:2015 *Quality management systems — Fundamentals and vocabulary (Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь)*

[8] ISO 15198:2004 *Clinical laboratory medicine — In vitro diagnostic medical devices — Validation of user quality control procedures by the manufacturer (Клиническая лабораторная медицина. Медицинские приборы для диагностики in vitro. Валидация пользовательских процедур контроля качества изготовителем)*

[9] ISO 16732-1:2012 *Fire safety engineering — Fire risk assessment — Part 1: General (Техника пожарной безопасности. Оценка риска возникновения пожаров. Часть 1. Общие положения)*

[10] Blues J., Bayliss DJ, Buckley M *The calibration and use of piston pipettes. Measurement Good Practice Guide No. 69 2004, NPL*

[11] ISO/IEC 25062 *Software engineering — Software product Quality Requirements and Evaluation (SQuaRE) — Common Industry Format (CIF) for usability test reports (Программная инженерия. Требования и оценка качества программного продукта (SQuaRE). Общий промышленный формат (CIF) отчетов о тестировании удобства использования)*

[12] ISO/IEC Guide 98-3:2008 *Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM: 1995) (Неопределенность измерения. Часть 3. Руководство по выражению неопределенности измерения (GUM:1995))*

[13] ISO/IEC Guide 99:2007 *International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM) (Международный словарь по метрологии. Основные и общие понятия и соответствующие термины (VIM))*

[14] *ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)* (1994)

[15] Lin-Gibson S., Sarkar S., Elliott J.T.J.C. *Summary of the National Institute of Standards and Technology and US Food And Drug Administration cell counting workshop: Sharing practices in cell counting measurements. 2018*

[16] Sarkar S. et al. Evaluating the quality of a cell counting measurement process via a dilution series experimental design. *Cytotherapy*, 2017. 19(12): p. 1509—1521

[17] CLSI *H20-A2* *Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods, 2nd Edition. 2007*

[18] DIN 58932-1 *Haematology — Determination of the concentration of blood corpuscles in blood — Part 1: Blood collection, sample preparation, biological influence factors, interference factors (Гематология. Определение концентрации форменных элементов в крови. Часть 1. Забор крови, приготовление проб, биологические факторы влияния и помех)*

[19] Roussel M. et al. Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: comparison of three flow cytometric candidate methods. Cytometry A, 2012. 81(11): p. 973—82

[20] Briggs C. et al. ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting. Int J Lab Hematol, 2014. 36(6): p. 613—27

[21] Bourner G. et al. ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids. *Int J Lab Hematol*, 2014. 36(6): p. 598—612

[22] Berndtson W.E. A simple, rapid and reliable method for selecting or assessing the number of replicates for animal experiments. Journal of animal science 1991. 69(1): p. 67—76

УДК 615.07:006.354 ОКС 07.080

Ключевые слова: биотехнология, подсчет клеток, планирование эксперимента, статистический анализ, количественная оценка

Редактор *Н.А. Аргунова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 14.08.2023. Подписано в печать 28.08.2023. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 4,74.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
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