ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 8.1039— 2024

Государственная система обеспечения единства измерений

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ СВОЙСТВ ОРГАНИЗМОВ, СОЗДАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Общие требования

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2024

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГБУ «ВНИИМС»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 053 «Основные нормы и правила по обеспечению единства измерений»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 14 мая 2024 г. № 600-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2024

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 и определения 2
4 Общие положения 6
5 Общие требования к методам измерений свойств организмов, созданных с применением генной инженерии 8
Библиография 13

Введение

Настоящий стандарт разработан в целях реализации требований к методам (методикам) измерений свойств организмов, созданных с применением генной инженерии, с целью обеспечения защиты прав и законных интересов граждан, общества и государства от отрицательных последствий недостоверных результатов измерений в соответствии со статьей 5 Федерального закона [1], охраны здоровья человека в соответствии со статьей 2 Федерального закона [2], со статьей 1 Федерального закона [3] и другими нормативными документами, указанными в разделе 2.

В ГОСТ Р ИСО 5725-1, ГОСТ ISO/IEC 17025 и настоящем стандарте понятие «метод измерений» («measurement method») включает совокупность операций и правил, выполнение которых обеспечивает получение результатов с известной точностью. Таким образом, понятие «метод измерений» по ГОСТ Р ИСО 5725-1, ГОСТ ISO/IEC 17025 и настоящему стандарту эквивалентно понятию «методика (метод) измерений» по ГОСТ Р 8.563—2009 (пункт 3.1) и, соответственно, значительно шире по смыслу, чем определение термина «метод измерений» в рекомендациях ([4], пункт 4.11).

Под методами измерений в настоящем стандарте понимают и так называемые аналитические методы, применяемые для количественных и качественных оценок компонентов в пробе, и оценки активности исследуемых объектов. К рассматриваемым методам также относятся методы идентификации ГМО.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Государственная система обеспечения единства измерений

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЙ СВОЙСТВ ОРГАНИЗМОВ, СОЗДАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Общие требования

State system for ensuring the uniformity of measurements. Methods for measuring the properties of organisms created using genetic engineering. General requirements

Дата введения — 2024—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к методам (методикам) измерений, применяемым для измерений свойств организмов, созданных с применением генной инженерии, кроме осуществления генно-инженерной деятельности и применения ее методов к человеку, тканям и клеткам в составе его организма, включая генодиагностику и генную терапию (генотерапию).

Настоящий стандарт распространяется на организмы, содержащие модифицированный генетический материал, вакцины, разработка и производство которых основано на получении вирусоподобных частиц и обычных рекомбинантных антигенов, а также на вирусы, полученные и/или модифицированные с применением методов генной инженерии.

Настоящий стандарт необходим при разработке, аттестации и применении методов (методик) измерений свойств организмов, созданных с применением генной инженерии.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ ISO/IEC 17025—2019 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 8.563—2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

ГОСТ Р ИСО 5725-1 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

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

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1

аналитический метод (analytical method): Исследовательская процедура для качественного или количественного измерения, или оценки присутствия, количества или функциональной активности целевого объекта (аналита).

[[5], статья 3.3]

3.2

неопределенность (измерений): Неотрицательный параметр, характеризующий рассеяние значений величины, приписываемых измеряемой величине на основании измерительной информации.

Примечание — Неопределенность измерений включает составляющие, обусловленные систематическими эффектами, в том числе составляющие, связанные с поправками и приписанными значениями эталонов, а также дефиниципальную неопределенность. Иногда поправки на оцененные систематические эффекты не вводят, а вместо этого их рассматривают как составляющие неопределенности измерений.

[[4], статья 5.34]

3.3

биомаркер, молекулярный биомаркер (biomarker, molecular marker): Детектируемая и/или количественно определенная молекула или группа молекул, используемая для индикации биологического статуса, состояния, идентичности или свойства или организма.

Пример — Последовательность нуклеотидов нуклеиновых кислот, белки, небольшие молекулы, такие как метаболиты, другие молекулы, такие как жиры и полисахариды.

[[6], статья 3.4.28]

3.4

валидация (validation): Верификация, при которой установленные требования связаны с предполагаемым использованием.

Пример — Методика измерений, обычно используемая для измерения массовой концентрации азота в воде, может быть валидирована также и для измерений в сыворотке крови человека.

[[7], статья 2.45]

3.5

верификация (verification): Предоставление объективных свидетельств того, что данный объект полностью удовлетворяет установленным требованиям.

Примеры

1 Подтверждение того, что данный стандартный образец, как заявлено, является однородным для значения величины и соответствующей методики измерений вплоть до образца массой 10 мг.

2 Подтверждение того, что технические характеристики или законодательные требования к измерительной системе соблюдены.

3 Подтверждение того, что целевая неопределенность может быть достигнута.

Примечания

1 Там, где это уместно, следует принимать во внимание неопределенность измерений.

2 Объектом может быть, например процесс, методика измерений, материал, вещество или измерительная система.

3 Установленными требованиями могут быть, например такие, которые удовлетворяют спецификации изготовителя.

4 В законодательной метрологии, как это определено в VIML, и в общем при оценке соответствия, верификация относится к исследованиям и клеймению и/или выдаче свидетельства о поверке измерительной системы.

5 Поверку не следует путать с калибровкой. Не всякая верификация является валидацией.

6 В химии верификация идентичности объекта или реакции требует описания структуры или свойств такого объекта или реакции.

[[7], статья 2.44]

3.6

генетическая детерминанта трансгенности: Генетические элементы, используемые в конструкциях, применяемых при создании ГМО (промоторы, терминаторы, репортерные гены и др.).

[ГОСТ 34150—2017, пункт 3.1.10]

3.7

генетически модифицированный организм; ГМО (genetically modified organism): организм и его пропагулы (например, семена, споры, клубни, яйца, репродуктивные клетки), содержащие генетический материал, который был модифицирован в результате любого изменения его генетического состава.

Примечание 1 к записи: Термин «ГМО» может использоваться для обозначения генно-инженерного организма.

[[6], статья 3.5.15]

3.8

генная инженерия; биоинженерия (genetic engineering, bioengineering): Совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с генами и введению их в другие организмы.

Примечания

1 Современная биотехнология включает технологию рекомбинантной ДНК.

2 Определение адаптировано из ГОСТ 34150—2017 (пункт 3.1.4) и [6] (статья 3.5.10).

3.9

генно-инженерная деятельность: Деятельность, осуществляемая с использованием методов генной инженерии в целях создания генно-инженерно-модифицированных организмов.

[Адаптировано из [2], статья 2]

3.10

генно-инженерно-модифицированный организм: Организм или несколько организмов, любое неклеточное, одноклеточное или многоклеточное образование, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинации генов.

[Адаптировано из [2], статья 2]

3.11

гибридизационная картина: Результат идентификации содержания генетических элементов обычных для генно-модифицированных организмов (ГМО) или полученных из них продуктов.

[ГОСТ 34150—2017, пункт 3.1.11]

3.12 **динамический диапазон:** Диапазон концентраций, в котором метод обеспечивает линейную корреляцию между результатом измерений и содержанием целевой ДНК с приемлемым уровнем правильности и точности.

3.13

качественное свойство (nominal property): Свойство материального объекта или явления, которое не имеет размера.

Примеры

1 Пол человека.

2 Цвет образца краски.

3 Цвет капельной пробы в химии.

4 Двухбуквенный код страны по ИСО.

5 Последовательность аминокислот в полипептиде.

Примечание — Качественное свойство имеет значение, которое может быть выражено словами, буквенно-числовым кодом или другим способом.

[Адаптировано из [4], статья 3.34]].

3.14 **значение качественного свойства** (nominal property value): Признак, общий для эквивалентных индивидуальных качественных свойств.

Примеры

1 «*1/*3» представляет собой значение качественного свойства «вариации последовательности нуклеотидов» гена CYP2D6 в данной ДНК. Аллель «*1» относится к нормальной активности фермента, а аллель «*3» — к сниженной активности фермента.

2 Вид Mycobacterium tuberculosis является значением качественного свойства — таксон.

3 Овал является значением качественного свойства — форма клетки.

3.15 **коэффициент R^2:** Коэффициент детерминации, который рассчитывают как квадрат коэффициента корреляции (между измеренным значением C_q и десятичным логарифмом концентрации) стандартной кривой, полученной с помощью линейного регрессионного анализа.

3.16

матрица аналитического метода (analytical method matrix): Набор из двух или более взаимодополняющих аналитических методов для измерения различных качественных свойств.

[[5], пункт 3.7].

3.17 **метод идентификации:** Метод установления тождества неизвестного соединения или вещества с известным.

3.18

метод измерений (measurement method): Прием или совокупность приемов сравнения измеряемой величины с ее единицей или соотнесения со шкалой в соответствии с реализованным принципом измерений.

[[4], статья 4.5].

Примечание — Определение этого понятия аналогично термину метод количественного определения.

3.19 **метод исследования:** Прием или совокупность приемов сравнения исследуемого качественного свойства с основной для сравнения того же вида качественных свойств.

Примеры

1 Полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов.

2 Инфракрасная спектрометрия.

Примечание — Лаконичного описания метода исследования недостаточно для проведения исследования с заданной неопределенностью, но оно помогает сформулировать одну или несколько методик исследования.

3.20

методика (выполнения) измерений: Установленная логическая последовательность операций и правил при измерении, выполнение которых обеспечивает получение результатов измерений в соответствии с принятым методом измерений.

Примечание — Обычно методика измерений регламентируется каким-либо нормативным документом.

[[4], статья 4.11].

3.21 **методика исследований:** Установленная логическая последовательность операций в соответствии с принципом исследований и принятым методом исследований, а также алгоритмом принятия решения, необходимым для получения результата исследования качественного свойства.

3.22 **мультиплексная полимеразная цепная реакция;** мультиплексная ПЦР: Метод ПЦР, в котором используется несколько пар праймеров, объединенных в одной реакционной смеси для получения нескольких ампликонов.

3.23 **надежность метода:** Мера его способности оставаться незатронутым малыми, но преднамеренными отклонениями от экспериментальных условий, описанных в процедуре.

3.24

организмы, созданные с применением генной инженерии (genetically engineered organism): Организм и его пропагулы (например, семена, споры, клубни, яйца, репродуктивные клетки), содержащие генетический материал, который был модифицирован с помощью методов рекомбинантной ДНК *in vitro*.

[[6], статья 3.5.13]

3.25

полимеразная цепная реакция; ПЦР: Ферментативный метод для увеличения количества копий специфического фрагмента ДНК на несколько порядков *in vitro*.

[[6], статья 3.6.47]

3.26

правильность (trueness): Степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений (или результатов испытаний), к принятому опорному значению.

Примечания

3 Показателем правильности обычно является значение систематической погрешности.

4 Правильность понимают иногда как «точность среднего значения». Однако такое употребление не рекомендуется.

[ГОСТ Р ИСО 5725-1—2002, статья 3.7]

3.27 **предел количественного определения LOQ:** Наименьшее количество или концентрация аналита в образце, которая может быть достоверно количественно измерена с приемлемым уровнем точности и правильности.

3.28 **предел обнаружения LOD:** Наименьшее количество или концентрация аналита в образце, которая может быть надежно обнаружена, но не обязательно определена количественно.

3.29 **принцип исследований:** Явление материального мира, служащее основой исследования.

Примеры

1 Селективная амплификация последовательности ДНК для сравнения ее эквивалентности с целевой последовательностью.

2 Сравнение спектральных свойств компонента со свойствами известных веществ.

Примечание — Явление может иметь физическую, химическую или биологическую природу.

3.30 **последовательность нуклеотидов:** Определяется как

$$Seq = (n;Y),$$

где n — порядковый номер нуклеотида в последовательности, натуральное число от 1 до N (N — размер фрагмента специфической последовательности одноцепочечной нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, двуцепочечной ДНК);

Y — обозначение нуклеотида, который принимает четыре значения A, G, C, $T(U)$;

Seq — порядок нуклеотидов, определяющий их специфическую последовательность в составе ДНК или РНК.

3.31 **практический предел обнаружения;** практический LOD: Наименьшее количество ГМО, выраженное в виде массовой доли или отношения числа копий ДНК, которое может быть надежно обнаружено в образце, когда известное число определено или оценено количество копий генома таксона (ингредиента).

3.32

прецизионность (измерений): Близость между показаниями или измеренными значениями величины, полученными при повторных измерениях.

Примечания

1 «Заданные условия» могут быть, например условиями повторяемости измерений, условиями промежуточной прецизионности измерений или условиями воспроизводимости измерений.

2 Понятие прецизионность измерений используется для определения понятий повторяемости измерений, промежуточной прецизионности измерений и воспроизводимости измерений.

3 Прецизионность измерений характеризует близость к нулю случайной погрешности измерений.

[[4], пункт 5.9]

3.33 **рабочая концентрация ДНК:** Самая высокая концентрация ДНК, предназначенная для использования в ПЦР-анализе.

3.34 **содержание аналита в образце:** Измеренная массовая или молярная концентрация, или массовая или молярная доля генно-модифицированного организма в анализируемом образце.

3.35 **специфичность:** Свойство метода реагировать исключительно на свойство или интересующий аналит.

3.36

стандартный образец; СО: 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.

[Адаптировано из [4], статья 8.19].

3.37

аттестованный стандартный образец; АСО: Сертифицированный стандартный образец ССО: Стандартный образец с сопроводительной документацией, выданной авторитетным органом, в которой указано одно или более значений определенного свойства с соответствующими показателями точности (неопределенностями) измерений и прослеживаемостью, которые установлены с использованием обоснованных процедур.

[Адаптировано из [4], статья 8.20].

3.38 **цикл количественного определения C_q:** Номер цикла, при котором флуоресценция, генерируемая амплификацией целевой ДНК при проведении ПЦР в реальном времени, достигает фиксированного порога и, таким образом, позволяет определить количество ДНК-мишени.

3.39 **число копий [пар копий] специфического фрагмента нуклеиновой кислоты, РНК, ДНК в единице объема** (base pair concentration): Концентрация или количество копий последовательностей нуклеотидов нуклеиновой кислоты, РНК, ДНК в единице объема анализируемой субстанции.

3.40 **эффективность амплификации:** Скорость амплификации, рассчитанная по наклону стандартной кривой после значения C_q в зависимости от числа/количества копий ДНК.

3.41 **неопределенность (исследований) качественного свойства:** Доля значений качественного свойства, которая отличается от опорного значения среди всех исследованных значений.

Примеры

1 Опорное значение качественного свойства равно «В». Одно из исследованных 10 значений отличается от «В». Таким образом, неопределенность исследования качественного свойства составляет 0,1 (10 %).

2 Пациент страдает инфекцией мочевыводящих путей. Результатом исследования по методике исследования является рост бактерий вида E. coli в образце мочи с неопределенностью 20 %. Имея знания и опыт применения методики исследования, можно сделать вывод, что существует некоторая вероятность того, что истинный вид бактерий может быть видом Salmonella или Shigella, но она не больше 20 %.

Примечания

1 Неопределенность исследования является частью результата исследования.

2 За исключением ситуации, когда неопределенность исследования равна нулю, исследуемые значения отличаются от опорного значения качественного свойства. В комментарии к результату исследования лаборатория может предоставить информацию о других возможных значениях качественных свойств, исходя из имеющейся информации.

3 Определение этого понятия не аналогично определению «неопределенности измерения» в статье 5.34 [4] и статье 2.26 [7].

4 Общие положения

4.1 Измерения, осуществляемые в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, должны выполняться по аттестованным методикам измерений (см. [1], статья 5), с применением стандартных образцов утвержденных типов (см. [1], статья 8) или аттестованных стандартных образцов, с применением средств измерений утвержденных типов и поверенных (см. [1], статья 9). Измерения, осуществляемые вне сферы государственного регулирования обеспечения единства измерений, могут выполняться с применением средств измерений и стандартных образцов, тип которых может быть утвержден в добровольном порядке (см. [1], статья 12).

4.2 Методы измерений, рассматриваемые в стандарте

Под методами измерений свойств организмов, созданных с применением генной инженерии, в данном стандарте понимают методы идентификации и количественного определения содержания генетических элементов или белков обычных для генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Основными методами, рассматриваемыми в данном стандарте, являются методы, основанные на полимеразной цепной реакции и определении содержания ДНК в анализируемой пробе, и методы определения содержания белков.

Идентификацию и количественное определение ингредиентов генетически модифицированного происхождения осуществляют посредством следующих последовательных (или одновременных) стадий. Из анализируемой пробы экстрагируют нуклеиновые кислоты или белки. Экстрагированный материал может далее очищаться в процессе экстракции или после нее. Далее проводят измерение его содержания, проводят аналитические процедуры, такие как ПЦР, или измерение с помощью твердофазного иммуносорбентного анализа (ELISA). Затем проводят секвенирование белков или нуклеиновых кислот с целью получения последовательности мономеров, из которых они состоят. Результатом секвенирования становится последовательность нуклеотидов в случае нуклеиновых кислот или аминокислот в случае секвенирования белков.

4.3 Методы измерений количественного содержания белка

Иммунохимические методы используют для идентификации и измерения содержания белка, определяющего заданный в ходе генетической трансформации признак. Идентификацию белка осуществляют с применением специфичных антител. Степень сродства антител к белку зависит от конформации белка после экстракции. Специфичность используемого антитела должна быть продемонстрирована (например, не должно быть перекрестной реактивности).

Определение содержания ГМО в различных матрицах может быть осуществлено с помощью методов, основанных на определении белка, например, таких как ELISA. При том метод должен быть валидирован для матрицы, которую предстоит анализировать, и должны быть доступны образцы для построения калибровочной кривой, по которой осуществляют расчет концентрации белка в анализируемых пробах.

Спектрофотометрические методы также применяют для измерений содержания белка.

4.4 Методы измерений количественного содержания ДНК

Методы измерений количественного содержания ДНК включают в себя, но не ограничиваются следующими:

- методы ПЦР в реальном времени;
- методы ассиметричной мультиплексной ПЦР с последующей гибридизацией продуктов этой ПЦР на биологическом микрочипе;
- методы измерений содержания ДНК биомаркеров и др.

Метод, как правило, состоит:

- из определения специфической целевой последовательности;
- амплификации одной или большего числа специфических целевых последовательностей нуклеотидов нуклеиновых кислот. Амплифицируют молекулы нуклеиновых кислот посредством ПЦР. В качестве матрицы может выступать как ДНК, так и РНК, но РНК превращают в реакции обратной транскрипции в комплементарную ДНК и далее амплифицируют уже одноцепочечную молекулу ДНК, используя традиционную ПЦР;
- обнаружения и подтверждения специфичности продукта(ов) ПЦР;
- количественного определения амплифицированных фрагментов относительно стандартного образца или образца для калибровки.

4.5 Обеспечение метрологической прослеживаемости результатов измерений содержания белков или нуклеиновых кислот

Метрологическую прослеживаемость результатов измерений содержания белков или нуклеиновых кислот осуществляют путем применения аттестованных стандартных образцов, которые применяют для построения калибровочной кривой, в качестве основы для сравнения (опорного значения), для контроля точности результатов измерений, выполняемых по аттестованным методикам измерений.

Метрологическую прослеживаемость осуществляют до наивысшего доступного уровня иерархии метрологической прослеживаемости.

В случае отсутствия доступных аттестованных стандартных образцов, прослеживаемых к государственным первичным эталонам или государственным первичным референтным методикам измерений, необходимо использовать образцы, соответствующие не менее чем одному из нижеперечисленных требований. Они должны быть:

- прослеживаемы к зарубежным первичным эталонам или первичным референтным методикам,
- выбраны на основании международного консенсуса,
- содержаться в международных базах данных,
- иметь ранг стандартных или рекомендованных справочных данных и аттестованы ГСССД,
- их последовательность нуклеотидов должна находиться в известных библиотеках данных – геномных библиотеках, библиотеках ДНК, РНК, например GenBank, GISAID и др.

Методики измерений, применяемые для выполнения измерений концентрации, должны быть аттестованы и валидированы для анализируемых матриц.

4.6 Обеспечение прослеживаемости результатов исследований качественных свойств белков и нуклеиновых кислот

Прослеживаемость результатов исследований качественных свойств белков и нуклеиновых кислот также, как и метрологическую прослеживаемость осуществляют в соответствии с цепью непрерывных калибровок, каждая из которых вносит свой вклад в неопределенность. В построении иерархии прослеживаемости качественных свойств также участвуют эталоны и стандартные образцы качественных свойств. Неопределенность может быть выражена как вероятность промаха порядкового номера основания (например, нуклеотида) в последовательности ДНК в мишени.

К стандартным образцам качественных свойств применяют дополнительно следующие требования:

- для подтверждения идентичности АСО (например, нуклеиновой кислоты, РНК, ДНК) при рассмотрении качественного свойства «последовательность нуклеотидов» следует применять двунаправленное секвенирование в качестве логической процедуры для обеспечения прослеживаемости;
- в идеальном случае проверку следует осуществлять путем применения альтернативных анализов последовательности, межлабораторных исследований (для валидации использования стандартного образца).

При выполнении вышеуказанных условий АСО считается прослеживаемым до основания (например, базового нуклеотида).

5 Общие требования к методам измерений свойств организмов, созданных с применением генной инженерии

5.1 Методы извлечения и очистки ДНК

5.1.1 Оценка методов выделения ДНК является важным шагом, поскольку качество и количество извлеченной ДНК могут существенно повлиять на результат измерений. Метод выделения ДНК следует оценивать на ряде репрезентативных материалов и обеспечивать ДНК подходящего качества и количества для последующего анализа.

5.1.2 Требования к методам

Метод выделения ДНК следует применять к тому же материалу, который применялся при валидации, а также к образцам, которые будут проанализированы. Если метод выделения ДНК был ранее валидирован на определенной матрице, выделение ДНК следует проводить в условиях воспроизводимости или внутрилабораторной прецизионности — не менее двух раз на двух независимых пробах, по возможности в разные дни и разными операторами. Экстрагированная ДНК должна соответствовать критериям приемлемости в отношении концентрации и качества ДНК (например, путем контроля эффективности амплификации и наличия ингибиторов с помощью ПЦР в реальном времени).

Процедуры измерений следует выполнять для разных матриц, если существует возможность использования разных матриц. Для проверки метода выделения ДНК тестируемая матрица не обязательно должна содержать ГМО.

5.2 Методы измерений концентрации ДНК

Концентрацию ДНК можно измерить с помощью флуориметрических или спектрофотометрических методов. В предварительном исследовании рекомендуется использовать тот же метод, что и для анализа образцов, поскольку используемый метод может повлиять на количественный анализ ДНК.

Метод может быть применим в случае, если он подходит для получения ДНК с конечной концентрацией, подходящей для предполагаемого анализа (по крайней мере, достаточной, чтобы соответствовать желаемому практическому LOD/LOQ). Там, где это применимо, концентрация должна быть сопоставима с результатами, полученными при валидации.

Если метод выделения ДНК не дает надлежащей концентрации для предполагаемого анализа на конкретной матрице, это повлияет на практический LOD.

5.3 Методы измерений чистоты экстрактов ДНК

5.3.1 Выделение ДНК может привести к совместной очистке веществ, ингибирующих реакцию ПЦР, что приведет к отсутствию или более низкой скорости амплификации. В первом случае могут быть получены ложноотрицательные результаты или, как во втором случае, количественное содержание аналита может быть занижено.

Поэтому необходимо убедиться, что процедура выделения ДНК гарантирует отсутствие таких ингибиторов.

5.3.2 Требования к методам

Наличие или отсутствие ингибиторов ПЦР можно проверить путем измерений различных значений концентрации растворов, приготовленных из раствора ДНК, поэтому чем сильнее разбавлен раствор ДНК, тем меньше концентрация ингибиторов.

Должны быть измерены концентрации не менее двух растворов, отличающихся в два раза по концентрациям, с помощью соответствующего индикатора, специфичного для таксона (например, лектин для ДНК сои), причем первое значение концентрации представляет собой «рабочую концентрацию ДНК», т. е. общее количество ДНК на реакцию, предназначенное для использования.

После завершения амплификации значение C_q из более концентрированного раствора ДНК сравнивают со значениями C_q для других значений концентрации и с теоретическим значением, рассчитанным при допущении отсутствия ингибиторов ПЦР.

Например, каждую репликацию экстракции ДНК разбавляют по меньшей мере до двух различных значений концентрации и анализируют с использованием таксон-специфического анализа. Затем рассчитывают разницу между средним значением C_q из наиболее разбавленной и более концентрированной порций (ΔC_q) и сравнивают с теоретическим ΔC_q.

Если экстрагированная ДНК содержит ингибиторы, ДНК необходимо дополнительно очистить или разбавить до концентрации, при которой не наблюдается ингибирования реакции ПЦР, прежде чем ее использовать для ПЦР в реальном времени.

5.4 Методы определения специфичности

Специфичность конкретного анализа исследуют при валидации метода.

Если условия анализа (например, концентрация праймеров/зонда, температура отжига, флуоресцентный краситель) не изменились, то необходимости повторно исследовать специфичность нет.

Данные о специфичности получают из отчета о валидации или рецензируемых статей, или из баз данных [2]—[5]. Если эти данные недоступны или не могут быть получены, метод должен быть протестирован.

Метод следует протестировать в отношении реакции на новые ГМО, содержащие целевую последовательность.

5.5 Методы определения динамического диапазона, коэффициента R^2 и определения эффективности амплификации

5.5.1 Динамический диапазон должен охватывать значения, ожидаемые для конкретного применения. В пределах динамического диапазона стандартные кривые должны соответствовать критериям приемлемости для эффективности амплификации и R^2.

5.5.2 Требования к методам

Динамический диапазон, коэффициент R^2 и эффективность амплификации определяют одновременно по стандартным кривым при проверке других параметров, таких как правильность и точность. Должны быть взяты средние значения по крайней мере двух стандартных кривых.

Эффективность амплификации приемлема, если среднее значение наклона стандартной кривой находится в диапазоне от (–3,6) до (–3,1), что соответствует эффективности амплификации (90—110) %.

Коэффициент R^2 должен быть больше или равен 0,981.

5.6 Методы определения правильности

Правильность следует определять на уровне содержания, близком к уровню, установленному законодательством, или в соответствии с предполагаемым использованием метода, и при необходимости дополнительно на уровне, близком к LOQ. Достоверность можно оценить с помощью АСО. Обычно требуется исследовать две концентрации (например, 0,1 % и 1 % массовой доли) и, если возможно, третью концентрацию в верхней части динамического диапазона (например, 5 % массовой доли). В качестве альтернативы может быть приготовлен образец, предпочтительно из АСО с более высокой концентрацией.

Используемая аналитическая процедура, включая реакционный объем, средство измерений для ПЦР и так далее, должна быть такой же, как и при обычном тестировании образцов. Следует оценивать результаты не менее 16 повторов ПЦР.

Если АСО для оценки правильности недоступны, можно использовать достаточно охарактеризованный материал для проверки квалификации (ПК). Однако приписанное значение материала для ПК должно быть значением, установленным независимо от прохождения ПК, то есть содержание ГМО, установленное на основе «консенсусного значения по результатам участников», не подходит для оценки правильности.

Лабораторный результат проверки квалификации также может быть использован при условии, что был использован достаточно охарактеризованный материал для проверки квалификации (см. ранее) и правильно выбрано стандартное отклонение для оценки ПК.

5.7 Методы определения относительного стандартного отклонения повторяемости (RSD_r)

Повторяемость можно определить аналогично тому, как это описано в предыдущем разделе о правильности. Ее рассчитывают на основе результатов, полученных в повторах ПЦР в условиях повторяемости. Повторяемость должна быть доступна для всех протестированных уровней содержания ГМ.

Используемая аналитическая процедура должна быть такой же, как и при обычном тестировании образцов. Необходимо оценить не менее 16 результатов отдельных испытаний.

Метод приемлем, если $RSD_r \leq 25$ %.

5.8 Методы определения предела количественного измерения (LOQ)

5.8.1 LOQ может быть определен для отношения, т. е. массовой доли или отношения количества копий ДНК, а также для количества измеримых копий ДНК.

5.8.2 Требования к методу определения относительного LOQ (LOQ_{rel})

Метод должен позволять производить измерения содержания образца массовой концентрации 0,1 %, соответствующей минимальному уровню концентрации, протестированному при валидации.

5.8.3 Требования к методу определения абсолютного LOQ (LOQ_{abs})

Серию растворов известных количеств копий на реакцию измеряют как минимум в 10 повторах ПЦР (например, 80, 60, 40, 20, 10, 5 копий и 1 копия на реакцию). Затем рассчитывают RSD_r для каждого уровня разбавления. LOQ_{abs} оценивают как последний уровень разбавления, при котором RSD_r измерений ниже 25 %. При этом, стандартная кривая метода должна включать LOQ_{abs}.

Распределение вероятностей предполагает, что анализ одной копии на реакцию должен давать примерно 30 % отрицательных результатов. Для проверки того, что целевые копии на реакцию в серии растворов являются приблизительно правильными, по крайней мере 1/10 повторов должны давать отрицательные результаты анализа при одной копии на реакцию.

Предел количественного измерения LOQ должен быть меньше или равен наименьшему количеству копий на реакцию.

5.9 Методы определения предела обнаружения (LOD)

5.9.1 LOD можно определить для соотношения, т. е. массовой доли или отношения количества копий ДНК, а также для количества измеряемых копий ДНК.

Для оценки LOD метода измерений с достоверностью 95 % необходимо проанализировать не менее 60 повторов ПЦР для каждой измеряемой концентрации. Поскольку это может оказаться невыполнимым, для проверки LOD можно использовать прагматический подход, основанный на меньшем количестве повторов. Этот подход позволяет приблизительно оценить LOD.

5.9.2 Процедура определения относительного LOD (LOD_{rel})

Стандартный образец с низким содержанием ГМО может быть измерен, например в десяти повторах ПЦР, и если все повторы положительны, это означает, что LOD_{rel} ниже или равен этому уровню содержания. При необходимости может быть использован материал определенного уровня, соответствующий требованиям 4.4.

Значение относительного предела обнаружения LOD_{rel} должно соответствовать данным валидации.

5.9.3 Процедура определения абсолютного LOD (LOD_{abs})

Концентрации серий растворов, представляющих диапазон выше и ниже ожидаемых значений LOD_{abs}, основанных на предварительном знании характеристик LOD_{abs} этого метода, измеряют, например в десяти повторах ПЦР для каждого уровня концентрации. Наименьшая концентрация, при которой все повторы положительны, представляет собой предполагаемое значение LOD_{abs}. Что касается LOQ_{abs}, правильность испытанной серии растворов может быть подтверждена результатами, наблюдаемыми для анализа образца с одной копией на реакцию (см. ранее LOQ_{abs}). Значение LOD_{abs} не должно быть меньше трех копий на реакцию.

Значение абсолютного предела обнаружения LOD должно соответствовать данным валидации.

5.10 Надежность

Надежность должна быть исследована во время разработки/оптимизации метода измерений, прежде чем метод будет подвергнут испытаниям.

Для обеспечения получения надежных результатов измерений лаборатории следует разработать собственные критерии надежности метода.

Учитывая возможность вариаций метода в части малых запланированных отклонений от экспериментальных условий, при реализации каждого метода измерений лаборатория должна определять надежность метода каждый раз при возникновении запланированных отклонений. В случае значительных отклонений экспериментальных условий от указанных в методе лаборатории следует в обязательном порядке проверять соответствие критериям надежности метода.

При реализации метода, надежность которого была определена ранее и подтверждена исследованиями, опубликованными в авторитетных источниках, лаборатория может принять критерии надежности указанного метода.

5.11 Методы идентификации

5.11.1 Требования к методам

При оценке того, подходит ли метод для цели идентификации последовательности, следует учитывать следующие аспекты, касающиеся природы участка генома, подлежащего секвенированию:

- клеточное и геномное расположение последовательности, т. е. клеточное: ядерное или митохондриальное, или геномное: аллельное или геноспецифичное;
- длину последовательности, которая будет определена;
- типы и дизайн последовательностей праймеров, используемых для подготовки и секвенирования образцов и библиотек ([8], пункт 4.5.3).

Прочтения последовательностей, полученные с помощью секвенирования по Сэнгеру или методов NGS, биоинформатически сравниваются с ранее определенными и идентифицированными «эталонными» последовательностями из баз данных ДНК. Рассчитывается процентное сходство между образцом и «эталонными» последовательностями. Две последовательности гомологичны, если они имеют большее сходство, чем можно было бы ожидать случайно ($p \leq 0{,}01$).

Процент сходства более 98 % обычно достаточен для идентификации последовательностей как одного и того же вида. Идентификационные данные должны быть представлены как качественный ре-

зультат в виде списка соответствующих таксонов, их соответствующего процента сходства и, при необходимости, ожидаемого значения ([8], пункт 4.4).

5.12 Требования к лабораториям, применяющим методы измерений

Лаборатории, применяющей методы (методики) измерений, следует иметь систему качества, обеспечивающую объективные доказательства того, что персонал имеет достаточную квалификацию и регулярно проходит обучение для выполнения анализа (см. ГОСТ ISO/IEC 17025—2019, пункт 5.2). Кроме того, лаборатория должна обеспечивать периодическую калибровку используемого оборудования (см. ГОСТ ISO/IEC 17025—2019, пункт 5.5).

Валидация методов (методик) измерений должна быть регламентирована системой качества. Лаборатория должна задокументировать применяемую методику, полученные результаты и заключение о том, подходит ли методика для предполагаемого применения, т. е.:

- описание методики;
- критерии приемлемости и требования к характеристикам, установленные лабораторией;
- протоколы измерений;
- заключение о применимости методики.

Принципиально метод следует применять в том виде, в котором он прошел валидацию без внесения модификаций. Если отдельные элементы, например марка готовой к использованию реакционной смеси или Taq-полимеразы, реакционный объем ПЦР, концентрации праймеров и зондов и/или параметры цикла ПЦР должны быть изменены, дополнительные рабочие параметры должны быть экспериментально оценены (например, специфичность и надежность). Процесс проверки следует проводить с применением АСО. Если АСО недоступны, можно использовать другие ГМ-положительные материалы, такие как образцы для проверки квалификации или стандартные образцы. Стандартный образец утвержденного типа с аттестованными метрологическими характеристиками можно использовать для верификации метода, специфичного для элемента или структуры организма, если организм содержит элемент или конструкцию, даже если АСО не сертифицирован для элемента или конструкции.

Библиография

[1] Федеральный закон от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений»

[2] Федеральный закон от 5 июля 1996 г. № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности»

[3] Федеральный закон от 29 декабря 2022 г. № 643-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности»

[4] РМГ 29—2013 Государственная система обеспечения единства измерений. Метрология. Основные термины и определения

[5] ИСО 23033:2021 Биотехнология. Аналитические методы. Общие требования и соображения для тестирования и характеристики клеточных терапевтических продуктов (Biotechnology — Analytical methods — General requirements and considerations for the testing and characterization of cellular therapeutic products)

[6] ИСО 16577:2022 Молекулярный анализ биомаркеров. Словарь методов анализа молекулярных биомаркеров в сельском хозяйстве и производстве продуктов питания (Molecular biomarker analysis — Vocabulary for molecular biomarker analytical methods in agriculture and food production)

[7] Руководство ИСО/МЭК 99:2007 Международный словарь по метрологии. Основные и общие понятия и соответствующие термины (International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM))

[8] ИСО 22949-1:2021 Анализ молекулярных биомаркеров. Методы анализа для обнаружения и идентификации видов животных в продуктах питания и кормах (методы, основанные на нуклеотидном секвенировании). Часть 1. Общие требования (Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in food and feed products (nucleotide sequencing-based methods) — Part 1: General requirements)

УДК 389.14:006.354 ОКС 17.020

Ключевые слова: генная инженерия, генетически модифицированный организм (ГМО), методы идентификации ГМО, число копий (число пар копий) специфического фрагмента нуклеиновой кислоты, последовательность нуклеотидов, методы измерений

Редактор *Н.А. Аргунова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 16.05.2024. Подписано в печать 27.05.2024. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,30.

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