ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 24421— 2025

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Минимальные требования к измерению оптических сигналов фотометрическими методами для биологических проб

(ISO 24421:2023, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2025

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 22 октября 2025 г. № 1258-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 24421:2023 «Биотехнология. Минимальные требования к измерению оптических сигналов фотометрическими методами для биологических проб» (ISO 24421:2023 «Biotechnology — Minimum requirements for optical signal measurements in photometric methods for biological samples», IDT).

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

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им национальные и межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 Некоторое 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, 2023
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2025

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. 1
4 Принципы 4
5 Минимальные требования к проведению измерений оптических сигналов 6
Приложение A (справочное) Принципы биолюминесценции, хемилюминесценции, флуоресценции и поглощения 10
Приложение B (справочное) Список оптических эталонов, приборов для измерения оптических сигналов и репрезентативных фотометрических методов 12
Приложение C (справочное) Список соответствующих стандартов, описывающих репрезентативные методы с помощью измерений оптических сигналов 13
Приложение D (справочное) Пример квалификации люминометра с использованием эталонного светодиодного источника света 14
Приложение E (справочное) Пример применения эталонного источника света для сравнительных измерений биолюминесцентной пробы с использованием люминометров 15
Приложение F (справочное) Пример определения перекрестного взаимодействия между лунками в многолуночных планшетах 16
Приложение G (справочное) Примеры определения динамического диапазона люминометра 18
Приложение H (справочное) Пример построения калибровочной кривой и определения динамического диапазона спектрофлуориметра 20
Приложение I (справочное) Пример определения динамического диапазона проточного цитометра 22
Приложение J (справочное) Пример калибровки эталонных источников света и люминометров 24
Приложение K (справочное) Примеры спектральных свойств фотодетекторов 26
Библиография 27

Введение

В настоящем стандарте приведены условия и общие рекомендации по точному измерению оптических сигналов, используемых для анализа биологических проб фотометрическими методами. Данные фотометрические методы могут использовать оптические измерения сигнала, включая биолюминесценцию, хемилюминесценцию, флуоресценцию или измерение поглощения, которые могут применяться в областях биотехнологии, естественных наук и медицины. Измеренное значение оптического сигнала применяется для качественной или количественной оценки биологических параметров, включая клеточную и метаболическую активность и экспрессию генов. Фотометрические методы применяют для тестирования токсичности, оценки экологических рисков, биопроизводства, разработки лекарственных средств, регенеративной медицины и биобанкинга.

Как производителям, так и пользователям в производственной отрасли необходимо высококачественное измерение оптического сигнала для фотометрических методов для повышения уверенности в повторяемости, промежуточной точности и воспроизводимости при анализе биологических проб. Хотя повторяемость фотометрического метода уже достаточна для качественной характеристики биологических проб, количественная характеристика требует более точной промежуточной точности и воспроизводимости измерения оптического сигнала. Фотометрический метод требует надлежащих измерений оптического сигнала, а также оценки отклонений от идеальной пропорциональности оптического сигнала и выходного сигнала фотометрического метода. Требования к надлежащему измерению оптического сигнала являются важным компонентом описания конкретных применений фотометрических методов.

Настоящий стандарт предлагает общую структуру для поддержки надлежащего измерения оптического сигнала при использовании фотометрического метода. Особое внимание уделяется использованию оптических эталонов и соответствующим техническим вопросам для измерения оптического сигнала в фотометрических методах, включая процедуры верификации приборов, постоянный мониторинг производительности приборов и валидацию фотометрического метода. Оптические эталоны могут использоваться для верификации приборов с целью повышения уверенности в повторяемости, промежуточной точности и воспроизводимости измерения оптического сигнала. Например, оптический сигнал, излучаемый биологическими образцами, можно сравнивать по общей шкале измерений в лаборатории, между двумя производителями, производителем и пользователем или двумя пользователями.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Минимальные требования к измерению оптических сигналов фотометрическими методами для биологических проб

Biotechnology.
Minimum requirements for optical signal measurements in photometric methods for biological samples

Дата введения — 2026—03—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает минимальные требования для обеспечения точного измерения оптических сигналов в фотометрических методах, используемых для качественной или количественной характеристики биологических проб.

Настоящий стандарт применим к оптическим сигналам, которые генерируются, например, биолюминесценцией, хемилюминесценцией и флуоресценцией, и оптическим сигналам, которые рассматриваются как изменения света из-за поглощения.

Настоящий стандарт содержит положения, связанные с верификацией приборов для измерения оптических сигналов, используемых в фотометрических методах для измерения биологических проб, включая аспекты использования оптических эталонов.

В настоящем стандарте не приводятся критерии производительности для рабочего процесса измерения биологических проб, специфичные для конкретной отрасли или области применения. При необходимости пользователи также могут ознакомиться с существующими отраслевыми и/или прикладными стандартами.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте нормативные ссылки отсутствуют.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

ИСО и МЭК поддерживают терминологические базы данных, используемые в целях стандартизации, по следующим адресам:

- платформа онлайн-просмотра ИСО: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru ;
- Электропедия МЭК: доступна по адресу gost.e-ecolog.ru .

3.1 **точность** (accuracy): Близость, согласованная между значением измеренной величины и истинным значением измеряемой величины.

Примечание 1 — Понятие «точность измерения» не является величиной и не имеет числового значения величины. Измерение называют более точным, если оно обеспечивает меньшую погрешность измерения.

Примечание 2 — Термин «точность измерения» не следует использовать для правильности измерения, а термин «прецизионность измерения» не следует использовать для «точности измерения», которая, однако, связана с обоими этими понятиями.

Издание официальное

Примечание 3 — «Точность измерения» иногда понимается как близость соответствия между значениями измеренной величины, которые приписывают измеряемой величине.

Примечание 4 — ИСО 5725-1:1994 использует другое определение термина «точность».

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 2.13, с изменениями — словосочетания «measurement accuracy» и «accuracy of measurement» («точность измерения») как термины исключены. Добавлено примечание 4 к терминологической статье]

3.2 **биологическая проба** (biological sample): Материал или объект биологического происхождения.

3.3 **динамический диапазон** (dynamic range): Диапазон значений величины *оптического сигнала* (см. 3.6), которые можно измерить количественно.

[ИСО 2041:2018, 3.4.17, с изменениями — к определению добавлены слова «optical signal» («оптический сигнал») и «quantitatively» («количественно»)]

3.4 **источник света** (light source): Оптическое устройство, излучающее соответствующую(ие) длину(ы) волны(волн) в указанной спектральной области.

Примечание 1 — Источник света может быть частью прибора для измерения *оптического сигнала* (см. 3.6).

[ИСО 25178-604:2013, 2.3.1, с изменениями — слова «range of wavelengths» («диапазон длин волн») заменены, на «wavelength(s)» [«длина(ы) волны(волн)»]. Добавлено примечание 1 к терминологической статье]

3.5 **оптический эталон** (optical reference): Материал, *источник света* (см. 3.4) или фотодетектор, обладающий достаточной воспроизводимостью и стабильностью в отношении оптических свойств, который признан пригодным для предполагаемого использования.

Пример — Эталонный источник света (см. 3.11) на основе светодиода, лазер, слайд из флуоресцентного стекла, флуоресцентный краситель в растворе или другой матрице (например, флуоресцентная частица), флуоресцентный материал, встроенный в слайд, эталонный фильтр, эталонная кювета, эталонная пленка, эталонный раствор, измеритель мощности (см. 3.9) (см. приложение В).

Примечание 1 — Термин «оптический эталон» включает как некалиброванные эталоны, так и калиброванные стандарты. Оптические эталоны могут распространяться внутренним подразделением организации или изготавливаться лабораторией (например, внутренний стандарт, внутренний эталонный материал).

Примечание 2 — Оптические эталоны могут использоваться для верификации (см. 3.14) приборов для измерения *оптического сигнала* (см. 3.6) (см. приложения D, E, G, H, I и J).

3.6 **оптический сигнал** (optical signal): Излучаемый свет или изменения света из-за поглощения, вызванного пропусканием света через образцы или хромогенные вещества.

Примечание 1 — Измерение оптического сигнала включает, например, измерения биолюминесценции, хемилюминесценции, флуоресценции и поглощения. В приложении А приведена информация об оптических сигналах.

Примечание 2 — В настоящем стандарте термин «оптический сигнал» рассматривает свет до его детектирования.

3.7 **интенсивность оптического сигнала** (optical signal intensity): Сила *оптического сигнала* (см. 3.6).

Примечание 1 — Интенсивность может быть использована для выражения абсолютной или относительной силы оптического сигнала. Соответствующая единица может быть использована для выражения интенсивности конкретного оптического сигнала.

3.8 **фотометрический метод** (photometric method): Аналитический метод с использованием измерения(й) *оптического сигнала* (см. 3.6) для определения компонентов или биологических параметров *биологических проб* (см. 3.2).

Примечание 1 — Фотометрический метод включает в себя преаналитические, оптические измерения сигналов и процедуры анализа данных.

Примечание 2 — Биологические параметры биологических проб включают, например, клеточную и метаболическую активность, а также экспрессию генов.

Примечание 3 — Примеры репрезентативных фотометрических методов приведены в приложении В.

Примечание 4 — Результаты анализа и количественного определения фотометрических методов могут быть выражены качественно или количественно.

Примечание 5 — Термин «радиометрический» широко используется вместо термина «фотометрический» в области оптической техники (например, МЭК 60050-845).

3.9 **измеритель (оптической) мощности** (power meter; optical power meter): Измерительный прибор для определения мощности излучения света, используемый в качестве *оптического эталона* (см. 3.5).

Примечание 1 — Ватт (Вт) используется как единица для выражения мощности излучения.

3.10 **прецизионность** (precision): Близость соответствия между показателями измерения или значений измеренной величины, полученными путем параллельных измерений одного и того же или схожих объектов в заданных условиях.

Примечание 1 — Прецизионность измерения обычно выражается численно такими мерами непрецизионности, как стандартное (среднеквадратичное) отклонение, дисперсия или коэффициент вариации в заданных условиях измерения.

Примечание 2 — Термин «заданные условия» может, например, означать условия повторяемости измерения, условия промежуточной прецизионности измерения или условия воспроизводимости измерения (см. ИСО 5725-3:1994).

Примечание 3 — Прецизионность измерения используется для определения повторяемости измерения, промежуточной прецизионности измерения и воспроизводимости измерения.

Примечание 4 — Иногда под «прецизионностью измерения» ошибочно подразумевают точность измерений.

Примечание 5 — ИСО 5725-1:1994 использует другое определение термина «прецизионность».

[Руководство ИСО/МЭК 99:2007, 2.15, с изменениями — «measurement precision» исключено в качестве термина. Добавлено примечание 5 к терминологической статье]

3.11 **эталонный источник света** (reference light source): *Источник света* (см. 3.4), используемый в качестве *оптического эталона* (см. 3.5).

Пример — Калиброванные или с установленными характеристиками светодиод и лазер.

3.12 **эталонный материал для калибровочной кривой** (reference material for calibration curve): Материал с известным значением концентрации или количества определенного вещества для предполагаемого использования.

Примечание 1 — Эталонный материал для калибровочной кривой идентичен или взаимозаменяем с объектом измерения *биологической пробы* (см. 3.2).

Примечание 2 — Примерами выражения концентрации и количества являются моль/дм^3 и моль соответственно.

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

Примечание 1 — Объективное свидетельство, необходимое для валидации, является результатом испытания или других форм определения, таких как осуществление альтернативных расчетов или анализ документов.

Примечание 2 — Слово «валидирован» используют для обозначения соответствующего статуса.

Примечание 3 — Условия, применяемые при валидации, могут быть реальными или смоделированными.

Примечание 4 — ИСО/ТС 16393:2019 использует термин «валидация» в другом значении для определения термина «валидированный эксперимент». В Руководстве ИСО/МЭК 99:2007 используют другое определение термина «валидация».

[ИСО 9000:2015, 3.8.13, с изменениями — добавлено примечание 4 к терминологической статье]

3.14 **верификация** (verification): Подтверждение, посредством предоставления объективных свидетельств, того, что установленные требования были выполнены.

Примечание 1 — Объективное свидетельство, необходимое для верификации, может быть результатом контроля или других форм определения, таких как осуществление альтернативных расчетов или анализ документов.

Примечание 2 — Деятельность, выполняемая при верификации, иногда называется квалификационным процессом.

Примечание 3 — Термин «верифицирован» используют для обозначения соответствующего статуса.

Примечание 4 — Руководство ИСО/МЭК 99:2007 использует другое определение термина «верификация».

[ИСО 9000:2015, 3.8.12, с изменениями — добавлено примечание 4 к терминологической статье]

4 Принципы

4.1 Общие положения

Измерения оптического сигнала, включая биолюминесценцию, хемилюминесценцию, флуоресценцию и измерения поглощения, используют в фотометрических методах. Измерения оптического сигнала часто используют для биологических проб с целью качественного и количественного определения разнообразного набора биологических параметров, включая клеточную и метаболическую активность и экспрессию генов (см. приложение А для получения дополнительной информации). В фотометрических методах интенсивность и спектр оптического сигнала биологических образцов измеряют с помощью приборов.

Примечание 1 — Примерами приборов являются люминометры, анализаторы изображений, спектрофотометры для чтения планшетов, проточные цитометры, ридеры микрочипов, спектрофлуориметры, планшетные ридеры, спектрофотометры и ДНК-секвенаторы (см. приложение В).

Точность, прецизионность, повторяемость и воспроизводимость входят в ряд важных метрологических факторов, используемых для оценки эффективности применяемого фотометрического метода.

Фотометрические методы могут быть качественно проверены с использованием положительных и отрицательных контрольных материалов.

Примечание 2 — Характеристики производительности качественных фотометрических методов и их валидация могут быть определены с помощью соответствующих статистических моделей в зависимости от метода, структуры данных и статистического опыта (например, ИСО/ТС 16393).

Точные результаты анализа и оценки получают путем измерения оптического сигнала с соответствующим выбором экспериментальных материалов, включая реагенты, генерирующие оптический сигнал от пробы, а также использования подходящих инструментов для предполагаемой цели.

Подготовка пробы также является важным фактором, определяющим производительность фотометрического метода.

Измерения оптического сигнала выполняют на основе относительных и абсолютных значений оптического сигнала, которые функционально связаны с количеством конкретных характеристик биологических проб или биологических параметров. В спектрально-разрешенных измерениях спектральные характеристики указывают на взаимодействие определенных молекул, структурных элементов молекул или молекулярное взаимодействие с электромагнитным излучением различной энергии.

В некоторых случаях для количественной оценки абсолютного количества биологической пробы требуются калибровочные кривые, построенные с использованием эталонного материала для калибровочной кривой. Калибровочная кривая также может использоваться для определения эффективного количества тестируемого вещества (например, количества, которое вызывает 50 % отклика по калибровочной кривой или ED_{50}).

Примечание 3 — В приложении Н приведен пример построения калибровочной кривой.

Для измерения биологических проб иногда необходимо маркировать или окрашивать биологические образцы, вводить репортерный ген в клетки, ткани и целые организмы или запускать химические реакции.

Примечание 4 — Качество реагента и его фотофизические и химические свойства влияют на оптические сигналы от образца. Иногда на оптические сигналы может влиять активность клеток.

Примечание 5 — Окружающее световое излучение может вызывать ухудшение биолюминесцентных реагентов, хемилюминесцентных реагентов, флуоресцентных материалов и затухание поглощения.

При использовании клеток в фотометрических методах надежность результатов анализа и оценки уменьшается, если клеточная активность нестабильна. В частности, на результаты измерения оптического сигнала напрямую влияет стабильность клеточной активности во время длительного хранения/субкультивирования и стабильность реагирования на целевое биоактивное вещество. Падающий измерительный свет также может влиять на функции и свойства клетки, в частности, если клетки подвергаются воздействию света в течение длительного периода. Соответственно, надежность результатов измерения оптического сигнала может быть повышена за счет поддержания стабильности клеток.

Примечание 6 — Примерами являются анализы для оценки клеточной активности, включая жизнеспособность, токсичность и метаболическую активность, оцениваемую на основе клеточных анализов.

Примечание 7 — Соответствующие стандарты, описывающие репрезентативные методы с помощью измерений оптического сигнала, перечислены в приложении С.

Преаналитические процедуры, применяемые перед выполнением измерений оптического сигнала, включая лизис клеток, реакцию антиген-антитело, маркировку красителем или окрашивание, могут влиять на результаты анализа и оценки.

4.2 Измерительные приборы и измерения

Фотодетекторы, включая фотоумножители, фотодиоды и датчики изображения, имеют определенную спектральную чувствительность. Оптические сигналы, включая биолюминесценцию, хемилюминесценцию, флуоресценцию и поглощение, можно точно измерить, используя спектрально подходящие фотодетекторы и цветные фильтры.

Примечание 1 — В приложении К приведены примеры данных спектральной чувствительности фотодетекторов.

На приборы для измерения оптических сигналов влияют условия окружающей среды, включая температуру в лаборатории и воздействие прямого солнечного света. В зависимости от применения может потребоваться регулировка пространственного разрешения прибора.

Оптические сигналы можно количественно измерить, когда интенсивность сигнала находится в пределах динамического диапазона фотодетектора. Фотодетекторы имеют определенную линейную или нелинейную чувствительность в пределах этого динамического диапазона, которую можно определить с помощью тестовых измерений.

Примечание 2 — Пределы линейности можно определить статистически.

Большинство приборов выполняют относительные измерения оптических сигналов. Поэтому выходные значения зависят от прибора, если только не доступен эталонный материал для построения калибровочной кривой. Только когда приборы абсолютно откалиброваны по радиометрическим значениям, включая число фотонов, измеренные значения оптического сигнала могут быть выражены как абсолютные радиометрические величины.

Фоновые сигналы могут влиять на результаты измерения оптического сигнала. Типичными источниками фоновых сигналов являются электрические шумы (например, темновая скорость счета и шум считывания) и оптические шумы (например, рассеянный свет и внешний свет).

Фоновые сигналы могут существовать даже при отсутствии оптических сигналов. Фоновые сигналы автоматически или вручную вычитаются после измерения оптического сигнала.

4.3 Оптические эталоны

Оптические эталоны допускается использовать для подтверждения производительности приборов для измерения оптических сигналов, включая повторяемость, промежуточную точность, воспроизводимость, динамический диапазон и другие рассматриваемые характеристики прибора.

Соответствие оптических характеристик оптического эталона и биологической пробы повышает уверенность в производительности прибора и результатах анализа и оценки путем измерения оптических сигналов биологических проб.

Примечание — Примерами оптических эталонов являются светодиодный эталонный источник света (см. приложение D для примера квалификации люминометра со светодиодом), лазер, слайд из флуоресцентного стекла, флуоресцентный краситель в растворе или другой матрице (например, флуоресцентная частица), слайд со встроенным флуоресцентным материалом, эталонный фильтр, эталонная кювета, эталонная пленка, эталонный раствор и измеритель мощности (см. приложение В).

Оптические эталоны допускается использовать для квалификации монтажа, квалификации функционирования и квалификации эксплуатации. Оптические эталоны также допускается использовать для сравнения чувствительности фотодетекторов между приборами.

Оптические эталоны могут использоваться для калибровки оптических сигналов по количествам/относительным количествам или уровню активности целевых биологических проб.

5 Минимальные требования к проведению измерений оптических сигналов

5.1 Элементы фотометрических методов

Для обеспечения точных результатов анализа и оценки путем измерения оптического сигнала в фотометрических методах для анализа биологических проб применяют стандартизированные подходы.

Измерительные приборы, реагенты, биологические пробы, включая клетки, и другие экспериментальные материалы, используемые для измерения оптического сигнала в фотометрических методах, должны быть выбраны в соответствии с предполагаемой целью и процедурой. Реагенты и биологические образцы хранят и обслуживают надлежащим образом.

Примечание 1 — Стабильность реагентов и биологических проб может изменяться при длительном хранении и обращении.

Примечание 2 — В клетках, экспрессирующих репортерный(ые) ген(ы), включая биолюминесцентный, хемилюминесцентный, флуоресцентный или колориметрический репортерный ген, уровень экспрессии репортерного(ых) гена(ов) может изменяться при хранении и субкультивировании. Количество копий репортерного(ых) гена(ов) также может изменяться при длительном субкультивировании.

Необходимо соблюдать инструкции производителя при хранении и использовании реагентов и биологических проб.

Оптические компоненты приборов (фотодетекторы, оптика и источники света), используемые для измерения оптического сигнала, должны выбираться в соответствии с оптическими характеристиками, включая спектральные свойства, фотометрических методов и биологической пробы.

Следует учитывать помехи или усиление оптического сигнала используемым оборудованием, реагентами, растворителем и биологической пробой.

Примечание 3 — Некоторые приборы, реагенты и растворы имеют неподходящие характеристики для измерения оптического сигнала, включая ингибирование или усиление реакций, которые создают мешающие сигналы из-за поглощающих/флуоресцентных/гасящих/фосфоресцентных/коррозионных свойств.

Примечание 4 — Вспомогательные материалы, включая феноловый красный (из-за поглощения), могут изменять результаты измерения оптического сигнала.

Примечание 5 — Адгезия к стенкам контейнера может привести к ложной концентрации, особенно для проб с низкой концентрацией. В зависимости от конструкции прибора концентрация также может быть слишком высокой из-за переноса с предыдущего измерения проб с высокой концентрацией.

5.2 Верификация приборов для измерения оптического сигнала

5.2.1 Оптические эталоны

Приборы для измерения оптического сигнала должны быть верифицированы с использованием оптических эталонов.

Примечание 1 — Примеры оптических эталонов и приборов приведены в приложении В.

Оптические эталоны могут использоваться для проверки повторяемости, промежуточной прецизионности и воспроизводимости.

Приборы для измерения оптического сигнала, верифицированные производителем, должны обслуживаться в соответствии с инструкциями производителя.

Эталонные источники света, включая светодиоды (LED) или лазеры, могут использоваться для проверки чувствительности люминометров, спектрофлуориметров, ридеров микрочипов и анализаторов изображений. Импульсные светодиоды могут использоваться в качестве эталонного источника света для фотодетекторов в проточных цитометрах.

Примечание 2 — Приложение Е содержит информацию и пример применения эталонных источников света для сравнительных измерений люминесцентных биологических проб с использованием люминометров.

Эталонные флуоресцентные материалы, включая флуоресцентное вещество, раствор или частицы, могут использоваться для верификации чувствительности анализаторов изображений, проточных цитометров и спектрофлуориметров.

Примечание 3 — Дополнительные указания по характеристике и оценке подходящих эталонных материалов приведены в руководстве ИСО 35:2017.

Измеритель мощности (измеритель оптической мощности) может использоваться для верификации мощности возбуждающего света, Вт, анализаторов изображений, проточных цитометров, спектрофлуориметров, ридеров микрочипов, спектрофотометров и ридеров планшетов.

Эталонную кювету или эталонный материал для измерения поглощения допускается использовать для верификации чувствительности ридеров планшетов, спектрофотометров и анализаторов изображений.

Эталонный источник света, значение оптического сигнала которого калибруется абсолютно по мощности, Вт, или количеству фотонов, допускается применять для калибровки абсолютной чувствительности приборов.

Примечание 4 — В приложении J приведен пример калибровки эталонных источников света и люминометров.

Внутренние стандарты (например, аутентичные материалы) допускается использовать в качестве оптических эталонов, когда подтверждена воспроизводимость или стабильность.

5.2.2 Динамический диапазон

Должен быть определен динамический диапазон фотодетектора в приборе для количественного измерения оптического(их) сигнала(ов) от биологической пробы(проб).

Примечание 1 — Оценку динамического диапазона обычно проводят как квалификацию монтажа и/или квалификацию функционирования приборов для измерения оптического сигнала.

Примечание 2 — Нижний предел динамического диапазона может быть задан пределом количественной оценки, тогда как верхний предел динамического диапазона может быть охарактеризован началом неприемлемых аномалий в чувствительности.

Примечание 3 — Примеры определения динамического диапазона люминометров см. в приложении G. Пример построения калибровочной кривой и определения динамического диапазона спектрофлуориметров см. в приложении H. Пример определения динамического диапазона для проточных цитометров см. в приложении I.

Динамический диапазон можно определить с помощью светодиодного эталонного источника света, серийного разбавления эталонного материала или репортерных белков, включая биолюминесцентные, хемилюминесцентные, флуоресцентные и хромогенные белки, хемилюминесцентные реагенты и эталонные кюветы или эталонные материалы для измерения поглощения.

Эталонные серии флуоресцентных материалов с переменными и ранее определенными относительными плотностями или концентрациями можно использовать для определения, настройки и коррекции динамического диапазона приборов для измерения флуоресценции.

5.2.3 Фоновые сигналы

Фоновые сигналы, связанные с приборами, должны определяться измерениями, проводимыми в условиях без помех со стороны оптических сигналов от аналитов. Вычитание фонового сигнала должно соответствовать предполагаемой цели.

Примечание 1 — Примерами фоновых сигналов являются темновая скорость счета и шум считывания.

Примечание 2 — Фоновые сигналы можно оценить с использованием необработанной пробы или без пробы.

Источники ошибок, связанные с измерениями оптического сигнала, включая рассеянный свет от соседних проб и спектральное перекрытие между несколькими каналами обнаружения, следует оценивать с использованием соответствующих проб или оптических эталонов.

Примечание 3 — Спектральное перекрытие можно определить и компенсировать с помощью одноцветных проб, которые окрашены или помечены тем же флуорофором или люминофором, что и исследуемая проба.

Следует учитывать источники ошибок от биологических проб и контейнеров, включая автофлуоресценцию, фотообесцвечивание, гашение и фототоксичность.

Для снижения фотообесцвечивания и фототоксичности следует контролировать верхний предел возбуждающего света и время экспозиции.

При использовании многолуночных планшетов в качестве измерительного контейнера следует учитывать применимые перекрестные помехи между лунками.

Примечание 4 — Цвет многолуночных планшетов влияет на чувствительность обнаружения и перекрестные взаимодействия между лунками. Дополнительная информация приведена в приложении F.

5.3 Измерение оптического сигнала биологических проб

5.3.1 Измерение оптического сигнала

Измерения оптического сигнала должны выполняться с использованием приборов, верифицированных в соответствии с 5.2.

Для количественной оценки интенсивность оптического сигнала от биологической пробы должна находиться в пределах динамического диапазона используемого прибора, как описано в 5.2.2. Результаты за пределами этого диапазона могут рассматриваться только для качественной оценки.

Примечание 1 — Иногда интенсивность сигнала, обнаруженную приборами, можно привести в пределы динамического диапазона, отрегулировав концентрацию пробы.

Примечание 2 — Падающий свет на некоторые фотодетекторы в конечном итоге можно контролировать в пределах динамического диапазона приборов, отрегулировав мощность источника света.

5.3.2 Калибровочная кривая

Целевые биологические образцы должны быть количественно определены в динамическом диапазоне калибровочной кривой.

Примечание 1 — Калибровочная кривая может быть построена с использованием эталонного материала для калибровочной кривой, где это применимо.

Примечание 2 — Существуют некоторые методы количественной оценки, которые могут быть выполнены без использования методов калибровочной кривой, но только если доступен калиброванный метод измерения оптической плотности (ОП) и предварительно определен молярный коэффициент затухания ε.

Примечание 3 — Пример построения калибровочной кривой см. в приложении Н.

Примечание 4 — Допускается использовать калибровочные кривые для верификации приборов, особенно для определения динамического диапазона.

Примечание 5 — Существуют некоторые методы количественной оценки, которые не требуют построения калибровочных кривых [например, цифровая полимеразная цепная реакция (ПЦР)].

5.3.3 Фотометрические методы

Фотометрические методы, изначально разработанные в той же лаборатории или модифицированные из валидированных методов, должны быть валидированы для каждого указанного предполагаемого использования.

Если для валидации фотометрического метода предусмотрены предопределенные критерии приемлемости, метод должен быть валидирован для лабораторного использования на основе тех же критериев.

Для фотометрических методов, предназначенных для оценки каждой относительной активности целевых биологически активных веществ, данные измерения оптического сигнала, включая значения кратности изменения, должны быть валидированы с помощью сравнительного эксперимента с использованием соответствующих положительных и отрицательных контрольных материалов.

Примечание — Точность результатов анализа и исследований, полученных посредством измерения оптического сигнала, может быть валидирована путем участия во внешней оценке качества (EQA) или проверке квалификации (PT).

5.3.4 Персонал

Измерение оптического сигнала в фотометрических методах выполняет персонал, включая оператора, который прошел соответствующую подготовку и понимает требования 5.2, 5.3.1 и 5.3.2.

Примечание — Конкретные рекомендации для персонала в медицинских лабораториях можно найти в ИСО 15189.

Устройства и приборы, специально спроектированные и разработанные для неподготовленной непрофессиональной работы, следует использовать в соответствии с инструкциями производителя.

5.4 Анализ данных и отчетность

Отчетность должна содержать информацию, позволяющую проводить независимую оценку.

Отчеты должны включать следующие разделы, где это применимо:

а) процедура измерения оптического сигнала:

1) протокол измерения и метод анализа данных;

2) формулы расчета (например, вычитание поглощения на определенных длинах волн, порядок таких вычитаний);

3) время реакции (от добавления реагента до измерения оптического сигнала);

4) условия окружающей среды (например, температура, влажность);

b) приборы для измерения оптического сигнала:

1) элемент прибора (например, фотодетектор, фильтр, спектроскопия);

2) технические характеристики и используемые настройки прибора (например, время затвора или экспозиции для обнаружения оптического сигнала, разрешение по длине волны);

3) соответствие характеристик прибора оптическим свойствам пробы (например, спектральное соответствие);

c) оптические эталоны:

1) тип и наименование;

2) характеристики, если применимо (например, мощность, Вт, или число фотонов для эталонного источника света, спектр и интенсивность для флуоресцентного материала, чувствительность для измерителя мощности, поглощение для эталонной кюветы или материала);

3) условия измерения (например, настройки прибора и оптического эталона);

4) результат измерения оптических эталонов, если применимо;

5) точность при выполнении статистического анализа.

Примечание 1 — Результат измерения может быть выражен в виде относительных или абсолютных значений;

d) биологические пробы:

1) тип и характеристики каждого образца (например, номер партии, источник, число пассажей клеток), если применимо;

2) дата и процедура(ы) отбора проб, если применимо;

3) условия транспортирования и хранения, если применимо;

e) реагенты и вещества:

1) наименование, источник (например, номер партии) и страна происхождения;

2) условия транспортирования и хранения, если применимо;

3) описание эталонного материала для калибровочной кривой и соответствующих положительных и отрицательных контрольных материалов, используемых по мере необходимости;

f) результаты измерения оптического сигнала биологических проб:

1) результат измерения;

2) точность при выполнении статистического анализа;

3) лицо, ответственное за результаты, включая оператора;

4) информация о единицах оптического сигнала; результаты измерений, приведенные на основе относительных или произвольных единиц, должны быть выражены в единицах оптического эталона.

Примечание 2 — Единицы могут быть выражены как относительные или абсолютные значения;

5) дата и время измерения оптического сигнала;

g) непредвиденные наблюдения:

1) любые непредвиденные наблюдения, сделанные во время анализа;

2) подтвержденные изменения из инструкций производителя или применимых стандартных рабочих процедур;

3) наблюдаемые факторы помех.

Примечание 3 — Информация, приведенная выше, может быть включена в отчет о результатах количественной оценки, калибровке, верификации прибора и валидации метода.

Приложение А
(справочное)

Принципы биолюминесценции, хемилюминесценции, флуоресценции и поглощения

А.1 Общие положения

Компоненты биологических проб и биологические параметры, включая клеточную и метаболическую активность, а также экспрессию генов, измеряют и оценивают качественно или количественно фотометрическими методами. В фотометрических методах интенсивность и спектр оптического сигнала от проб, связанные с количеством биологических образцов или изменениями биологических параметров, измеряют с помощью приборов для измерения оптических сигналов. Оптические сигналы, которые необходимо измерить, возникают из биолюминесценции, хемилюминесценции, флуоресценции, поглощения и других связанных оптических сигналов. В этом приложении описаны репрезентативные принципы измерения оптических сигналов в фотометрических методах.

Примечание 1 — В настоящем стандарте приведены измерения биолюминесценции, хемилюминесценции, флуоресценции и поглощения, поскольку они широко используются в фотометрических методах. Однако существуют некоторые другие возможные оптические сигналы, которые можно измерить, включая фосфоресценцию, электролюминесценцию и комбинационное рассеяние. Существуют также некоторые методы, связанные с флуоресценцией, включая перенос энергии Ферстера, продолжительность жизни флуоресценции, поляризацию флуоресценции и многофотонное возбуждение. Нефелометрическое измерение мутности также связано с измерением оптического сигнала.

Примечание 2 — В области фотометрии и радиометрии интенсивность света (в единицах канделы) и интенсивность излучения (в единицах Вт/ср) строго определены для точечного источника. Однако термин «интенсивность», включая «интенсивность оптического сигнала», в настоящем стандарте указывает лишь на силу оптического сигнала и не используется только для точечного источника.

А.2 Биолюминесценция и хемилюминесценция

Световое излучение, возникающее в результате химических реакций определенных химических веществ, включая люминол, определяют как «хемилюминесценцию», а ответная химическая реакция часто называется «реакцией хемилюминесценции». В реакции хемилюминесценции ферменты, включая пероксидазу и фосфатазу, часто используются в качестве катализатора, который широко применяется в фотометрических методах, таких как иммуноферментный анализ. В случаях, когда ферментом является люцифераза или фотопротеин, реакция называется «реакцией биолюминесценции». Поскольку реакционный субстрат, используемый для реакции биолюминесценции, называется «люциферин», реакция биолюминесценции называется «реакцией люциферин-люцифераза». Термин «биолюминесценция» охватывает производство и излучение света живым организмом или излучение света лабораторной биохимической системой. Поэтому реакцию биолюминесценции можно рассматривать как форму реакции хемилюминесценции.

Репортерные гены биолюминесценции широко используют для анализа репортерных генов с целью оценки экспрессии генов, взаимодействия белок — белок и биологической активности веществ. Биолюминесцентные ферменты также используются для количественной оценки количества клеточного аденозинтрифосфата (АТФ) и ферментативной активности.

В клеточных анализах с помощью методов измерения биолюминесценции клетки обычно обрабатываются целевым биоактивным веществом и инкубируются в течение определенного периода. После этого клетки лизируют, и сигнал биолюминесценции измеряют путем добавления биолюминесцентного реагента в раствор.

Примечание 1 — Биолюминесцентный реагент обычно содержит люциферин и несколько химических веществ для усиления и стабилизации реакции люциферин—люцифераза.

Биологическую активность вещества можно также оценить количественно или качественно, не разрушая клетки, с помощью мониторинга биолюминесценции в реальном времени или биолюминесцентной визуализации.

Реакции биолюминесценции и хемилюминесценции испускают свет в разных спектрах в зависимости от реагента.

В реакциях биолюминесценции и хемилюминесценции интенсивность оптического сигнала изменяется со временем после инициирования реакции путем добавления биолюминесцентного реагента или хемилюминесцентного субстрата соответственно.

Степень зависящих от времени изменений интенсивности оптического сигнала (т. е. кинетики реакции) в значительной степени зависит от комбинаций фермента и субстрата. Эти изменения интенсивности оптического сигнала дополнительно зависят от условий окружающей среды, включая температуру.

Примечание 2 — Когда измеренное значение биолюминесценции или хемилюминесценции выражается как абсолютная мощность (в единицах Вт) или как число фотонов — это абсолютное значение, а в других случаях значение относительно.

Примечание 3 — Абсолютное значение сигнала биолюминесценции или хемилюминесценции можно измерить с помощью оптического измерительного прибора с фотодетектором, который откалиброван на абсолютную чувствительность.

А.3 Флуоресценция

Процесс испускания света, при котором поглощение света заданной длины волны веществом сопровождается испусканием света на более длинной длине волны, называется флуоресценцией. «Фосфоресценция» также известна как испускание света после поглощения света, несмотря на то, что испускание значительно задерживается после возбуждения поглощением света. Таким образом, и флуоресценция, и фосфоресценция классифицируются как «фотолюминесценция» в широких научных областях. С научной точки зрения флуоресценцию и фосфоресценцию описывают как испускание из возбужденного синглетного или триплетного состояния молекулы соответственно.

Примечание 1 — В ИСО 9555-4:1992, 3.1, флуоресценцию описывают следующим образом: «Испускание электромагнитных волн характеристической энергии, когда атомы или молекулы распадаются из возбужденного состояния в состояние с более низкой энергией. Возбуждение может быть вызвано путем воздействия на вещество излучения с немного более высокой энергией (более короткой длиной волны), чем у характеристического испускания, и оно прекращается, как только внешний источник удаляется».

Примечание 2 — В МЭК 60050-845:2020 флуоресценцию описывают следующим образом: «Излучение оптического излучения, когда вещество подвергается воздействию любого типа электромагнитного излучения, где испускаемое излучение обычно появляется в течение 10 наносекунд после возбуждения».

Флуоресцентные материалы в биологических образцах, включая флуоресцентные красители, флуоресцентные белки и биологические образцы, испускают сигналы флуоресценции, производимые облучением возбуждающим светом. Флуоресцентные красители и репортерные гены используются в биопробах путем маркировки/окрашивания или присоединения к целевым объектам соответственно.

Примечание 3 — Абсолютная мощность (в единицах Вт) флуоресцентного излучения может быть измерена с помощью оптического измерительного прибора с калиброванной абсолютной чувствительностью, включая квантовую эффективность фотодетектора.

Примечание 4 — Используют некоторые хромотропные соединения, которые, например, изготавливаются для изменения спектра флуоресценции и для перехода от нефлуоресцентного к флуоресцентному состоянию во время процедуры анализа.

Флуоресцентные материалы связываются с определенными биологическими компонентами (белками, нуклеиновыми кислотами и молекулами) и/или специфически локализуются внутри или снаружи клеток в зависимости от времени.

Флуоресцентные красители, флуоресцентные белки и биологические образцы обладают определенными спектральными свойствами возбуждения и испускания.

Интенсивность сигнала флуоресценции от образцов обычно пропорциональна облучению возбуждающим светом.

Интенсивность сигнала флуоресценции можно уменьшить путем облучения возбуждающим светом, известным как «фотообесцвечивание».

А.4 Поглощение

Красители и хромогенные субстраты обнаруживают путем измерения поглощения. Кроме того, для спектрометрических измерений используются абсорбционные свойства биологических образцов. Методы измерения поглощения, включая иммуноферментный анализ, спектрофотометрический анализ и анализы репортерных генов, используют для количественной оценки биологических образцов или оценки клеточной функции.

Примечание 1 — Поглощение вызывается пропусканием света через пробы или хромогенные вещества. Пропускание учитывает экстинкцию, которая также включает вклады преломления и рассеяния.

Примечание 2 — Некоторые хромотропные соединения изменяют поглощение или спектры поглощения во время процедуры анализа.

Примечание 3 — Клеточные функции включают ферментативную активность, клеточное поглощение и активность органелл.

Хромогенные реагенты связываются с определенными биологическими пробами и локализуются внутри или снаружи клеток в зависимости от времени.

Примечание 4 — Качественная оценка хромогенных анализов иногда основана на визуальном осмотре цвета. Количественная оценка использует измерение поглощения на разной длине волны.

Интенсивность оптического сигнала от хромогенных реакций зависит от времени реакции и факторов окружающей среды, включая температуру.

Приложение В
(справочное)

Список оптических эталонов, приборов для измерения оптических сигналов и репрезентативных фотометрических методов

Примеры оптических эталонов, приборов для измерения оптического сигнала и репрезентативных методов измерения для фотометрических методов приведены в таблице В.1.

Примечание — Допускается применять эталонную пластину в качестве оптического эталона для количественной ПЦР в реальном времени.

Таблица В.1 — Список оптических эталонов, приборов для измерения оптических сигналов и репрезентативных фотометрических методов

Оптический сигнал	Оптический эталон	Прибор измерения оптического сигнала	Репрезентативный фотометрический метод
Биолюминесценция	Светодиод	Люминометр трубчатого или микропланшетного типа	Анализ гена-репортера Анализ АТФ Иммуноанализ
		Анализатор изображений	Биолюминесцентная визуализация
Хемилюминесценция	Светодиод	Люминометр трубчатого или микропланшетного типа	Иммуноанализ Анализ гена-репортера
		Анализатор изображений	Вестерн-блоттинг
Флуоресценция	Флуоресцентное стекло Флуоресцентный раствор	Ридер микропланшетов Спектрофлюориметр	Иммуноанализ Анализ гена-репортера
	Флуоресцентный краситель Флуоресцентная частица Импульсный светодиод Лазер	Проточный цитометр	Проточная цитометрия Иммуноанализ
		ДНК-секвенсор	Анализ секвенирования
	Стеклянный слайд, встроенный флуоресцентный материал Лазер	Анализатор изображений	Флуоресцентная визуализация Высококонтентный анализ
		Ридер микрочипов	Транскриптомный анализ
	Измеритель мощности	Источник возбуждающего света	
Поглощение	Фильтр сравнения Кювета сравнения Пленка сравнения Эталонный раствор	Спектрофотометр	Иммуноанализ Измерение оптической плотности
	Фильтр сравнения Пленка сравнения Эталонный раствор	Ридер микропланшетов	Иммуноанализ Измерение оптической плотности Анализ гена-репортера
	Тестовая мишень	Анализатор изображений	Электрофорез
	Измеритель мощности	Источник света	

Приложение С
(справочное)

Список соответствующих стандартов, описывающих репрезентативные методы с помощью измерений оптических сигналов

В настоящем стандарте в основном описаны процедуры верификации приборов для измерения оптического сигнала с использованием оптических эталонов. Преаналитические процедуры, включая подготовку проб, также являются важными компонентами для точности измерения оптического сигнала. Настоящий стандарт может дополнять соответствующие стандарты, описывающие различные аналитические и оценочные методы с помощью измерения оптического сигнала. Примеры соответствующих стандартов и публикаций следующие:

a) методы характеристики клеток: см. ИСО 23033;

b) анализ гена-репортера (измерение биолюминесценции): см. ИСО 19040-1, ИСО 19040-3 и [25], [27], [28] и [31];

c) анализ гена-репортера (измерение поглощения): см. ИСО 19040-1 и ИСО 19040-2;

d) проточная цитометрия: см. ИСО 19344, ISO/TS 19006, ИСО 20391-1, ИСО 20391-2 и [26] и [28];

e жизнеспособность клеток (измерение биолюминесценции, анализ АТФ): см. ИСО 13629-1;

f) жизнеспособность клеток (измерение поглощения): см. ИСО 10993-5, ИСО 19007 и [29] и [30];

g) иммуноанализ (измерение поглощения): см. ИСО 15089 и [26];

h) спектрофотометрия: см. [24].

Приложение D
(справочное)

Пример квалификации люминометра с использованием эталонного светодиодного источника света

D.1 Общие положения

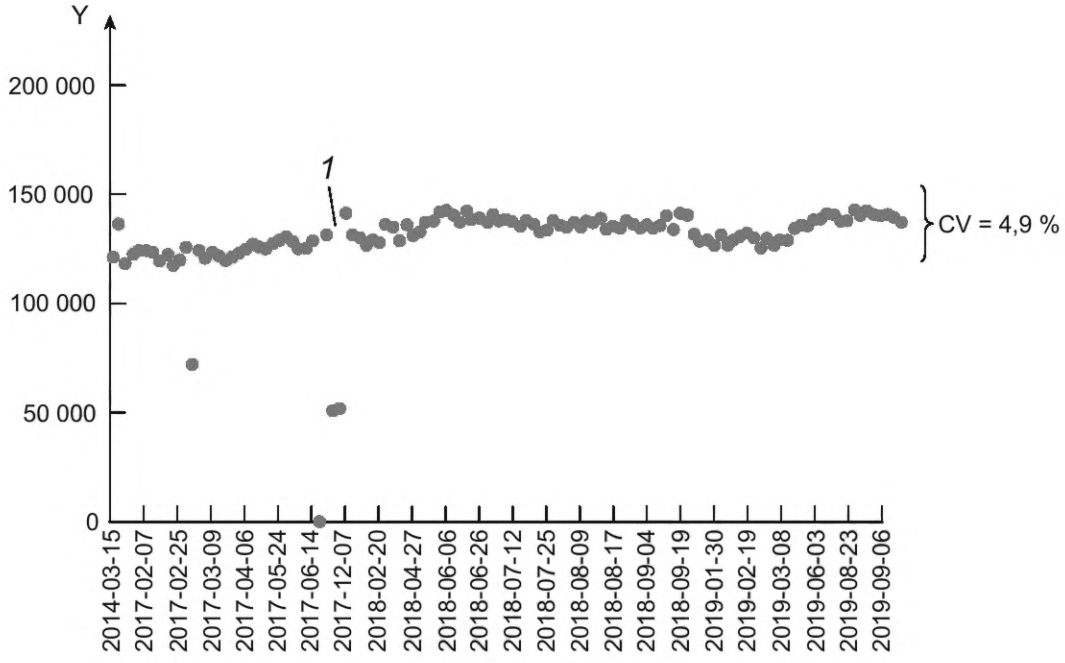
Для квалификации люминометра в испытательных лабораториях допускается использовать эталонный источник света, включая эталонный светодиодный источник света, стабильность и воспроизводимость которого верифицированы. Регистрируя данные, измеренные с помощью эталонного светодиодного источника света, оценивают воспроизводимость люминометра (ежедневная и от эксперимента к эксперименту).

D.2 Оценка воспроизводимости с использованием эталонного светодиодного источника света

На рисунке D.1 приведен пример оценки воспроизводимости люминометра с использованием светодиодного эталонного источника света. Светодиодный эталонный источник света пластинчатого типа, излучающий зеленый свет (λ_{max} = 527 нм), был установлен на микропланшетном люминометре. Выходное значение измерялось в течение 5 с при комнатной температуре. Результаты измерений регулярно регистрировали.

Повторные измерения с использованием эталонного светодиодного источника света проводили в течение пяти лет. Результаты показывают, что чувствительность люминометра стабильна, а именно, коэффициент вариации CV, %, составляет менее 5 %, за исключением нерегулярных значений, зарегистрированных до ремонта. Была обеспечена промежуточная точность измерений оптического сигнала, выполненных с помощью этого люминометра в течение экспериментального периода (см., например, [32]).

Примечание — В июне 2017 г. интенсивность сигнала от светодиодного эталонного источника света постоянно показывала нерегулярные значения из-за неисправности люминометра (см. рисунок D.1). После ремонта интенсивность сигнала снова демонстрировала регулярные значения.



Y — скорость счета детектора, 1/с; *1* — ремонт люминометра

Рисунок D.1 — Повторные измерения с помощью люминометра с использованием эталонного светодиодного источника света

Приложение Е
(справочное)

Пример применения эталонного источника света для сравнительных измерений биолюминесцентной пробы с использованием люминометров

Е.1 Общие положения

В настоящем приложении приведен пример сравнения данных, полученных при измерениях с помощью разных люминометров с использованием эталонного источника света. При измерении биолюминесцентных проб, таких как биолюминесцентные клетки, с помощью люминометра выходное значение выражается как относительное значение счета. Поэтому невозможно напрямую сравнивать данные, когда измерения проводятся с помощью разных люминометров. Сравнение данных также затруднено, даже когда измерения проводят с помощью люминометров, изготовленных одним и тем же производителем, из-за различий в фотодетекторе от партии к партии, что указывает на сложность сравнения данных между объектами. Однако данные можно сравнивать по общей шкале измерений, оценивая разницу в чувствительности между люминометрами с использованием эталонного источника света, включая эталонный светодиодный источник света.

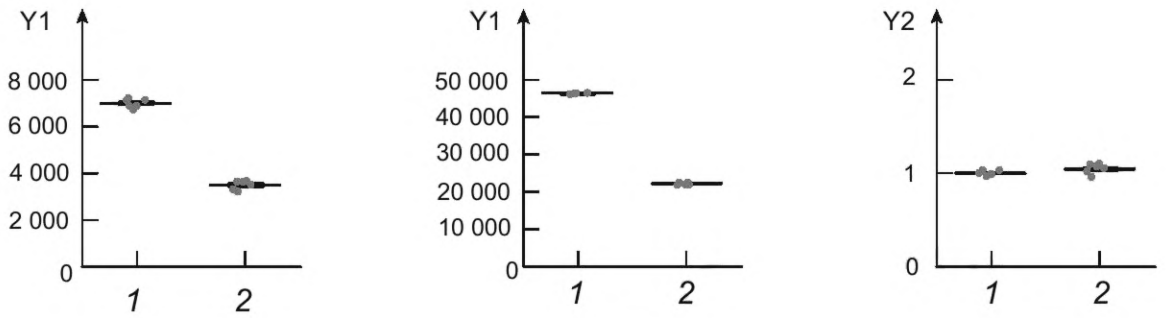
Е.2 Сравнение данных между объектами

Рисунок Е.1 a) показывает интенсивность оптического сигнала люминесцентных клеток, экспрессирующих люциферазу жука красного излучения (λ_{max} = 620 нм), предоставленную лабораторией А лаборатории В, измеренную независимо обеими лабораториями. При измерениях использовали обычные коммерчески доступные биолюминесцентные реагенты и многолуночные планшеты, но применяли люминометры, изготовленные разными производителями. В результате интенсивность оптического сигнала, выраженная как относительное количество в лаборатории В, была примерно вдвое меньше, чем в лаборатории А.

Рисунок Е.1 b) показывает интенсивность оптического сигнала от эталонного светодиодного источника света (λ_{max} = 624 нм), предоставленную лабораторией А лаборатории В, измеренную в обеих лабораториях. Интенсивность оптического сигнала в лаборатории В была примерно вдвое меньше, чем в лаборатории А, аналогично рисунку Е.1 a).

Как показано на рисунке Е.1 c), примерно такие же значения были получены, когда интенсивность оптического сигнала от биолюминесцентных клеток [см. рисунок Е.1 a)] была нормализована по интенсивности от эталонного светодиодного источника света [см. рисунок Е.1 b)], где относительное значение в лаборатории А установлено равным 1. Таким образом, стало возможным сравнивать данные, измеренные с помощью разных люминометров (разных установок) на общей шкале измерений, используя эталонный источник света.

Данный метод полезен при сравнении результатов измерений для обеспечения производительности биолюминесцентной пробы в лаборатории, между производителями, производителем и пользователем или пользователями.



a) Биолюминесцентные клетки

b) Эталонный светодиодный источник света

c) Нормализованная интенсивность

Y1 — скорость счета детектора, 1/с; Y2 — нормализованная интенсивность; *1* — лаборатория А; *2* — лаборатория В

Рисунок Е.1 — Сравнение интенсивности света

Приложение F
(справочное)

Пример определения перекрестного взаимодействия между лунками в многолуночных планшетах

F.1 Общие положения

В настоящем приложении описан и приведен пример определения перекрестного взаимодействия между лунками, когда многолуночные планшеты используют в качестве измерительных контейнеров, в основном при измерениях биолюминесценции и хемилюминесценции.

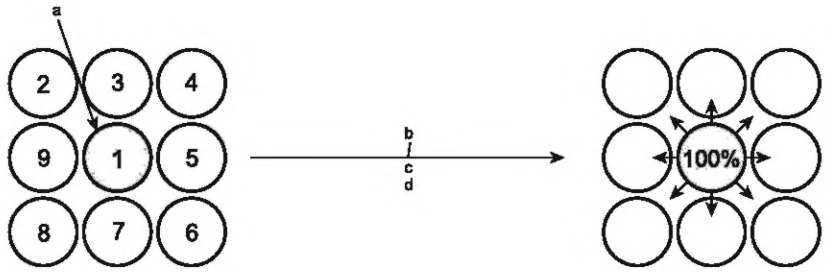
Перекрестное взаимодействие между лунками возникает, когда рассеянный свет попадает в соседние лунки, что снижает точность результатов измерений.

Перекрестное взаимодействие между лунками сильно зависит от прибора и типа многолуночного планшета (прозрачный, черный, серый или белый). Как правило, значение перекрестного взаимодействия является самым высоким для прозрачных планшетов. Значение для черных многолуночных планшетов ниже, чем для белых многолуночных планшетов, хотя более высокую интенсивность сигнала можно получить с белыми многолуночными планшетами. Таким образом, черные многолуночные планшеты показывают самое низкое значение перекрестного взаимодействия, но из-за их низкой эффективности сигнала черные многолуночные планшеты можно использовать только тогда, когда интенсивность сигнала образца достаточно высока.

F.2 Определение перекрестного взаимодействия между лунками

На рисунке F.1 приведена схема определения перекрестного взаимодействия от лунки к лунке в многолуночных планшетах. Светоизлучающая проба, включая раствор люциферазы, хемилюминесцентный реагент или другой источник света, если применимо, добавляют в лунку, и измеряют интенсивность сигнала лунки и окружающих ее лунок. В общем случае значения перекрестного взаимодействия для окружающих лунок выражают в %, когда интенсивность лунки, содержащей пробу, устанавливают на 100 %.

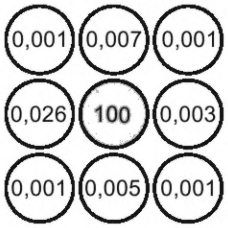
Примечание — На рисунке F.1 приведен пример определения значения перекрестного взаимодействия для конкретной лунки. Значения перекрестного взаимодействия иногда различаются в зависимости от расположения лунки. Поэтому можно измерить несколько лунок, чтобы определить значения перекрестного взаимодействия для всего планшета.



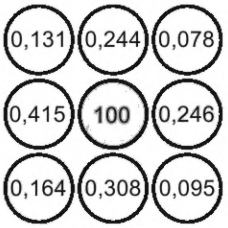
[a] Образец (например, клетки или лизаты, экспрессирующие люциферазу, фермент люцифераза, хемилюминесцентный реагент или другой источник света).
[b] Измерение интенсивности.
[c] Лунка для пробы (1).
[d] Окружающие лунки (приблизительно 2—9).

Рисунок F.1 — Схема определения перекрестного взаимодействия помех между лунками в многолуночных планшетах

На рисунке F.2 приведен пример определения перекрестного взаимодействия между лунками с использованием клеток, экспрессирующих люциферазу. Клетки были посеяны в 96-луночные черно-белые планшеты с прозрачным дном. После инкубации в течение одного дня клетки были обработаны коммерчески доступным биолюминесцентным реагентом в соответствии с инструкциями производителя, и были измерены интенсивности сигнала лунки и окружающих ее лунок (без клеток). После вычитания фонового значения (темновая скорость счета) из значений измерений интенсивность сигнала клеток была установлена на уровне 100 % и были оценены значения перекрестного взаимодействия для окружающих лунок.



a) Черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном



b) Белые 96-луночные планшеты с прозрачным дном

Примечание — Значения в белых кружках указывают значения перекрестного взаимодействия между лунками, %.

Рисунок F.2 — Определение перекрестного взаимодействия между лунками с использованием клеток, экспрессирующих люциферазу

Приложение G
(справочное)

Примеры определения динамического диапазона люминометра

G.1 Общие положения

В настоящем приложении описывается пример определения динамического диапазона люминометра с использованием ферментов люциферазы (см. раздел G.2) и эталонного светодиодного источника света (см. раздел G.3). Оценка динамического диапазона обычно проводится в качестве квалификации монтажа и/или квалификации функционирования люминометра.

G.2 Определение динамического диапазона с использованием фермента люциферазы

Для определения динамического диапазона люминометра допускается использовать серийное разбавление раствора фермента люциферазы. Фермент люциферазы разбавляют соответствующим буфером и используют для приготовления серийного разведения. Затем раствор для разведения распределяют в измерительный контейнер, включающий многолуночные планшеты. Соответствующий объем люциферина (биолюминесцентного реагента) добавляют к раствору фермента люциферазы и полученный сигнал измеряют с помощью люминометра.

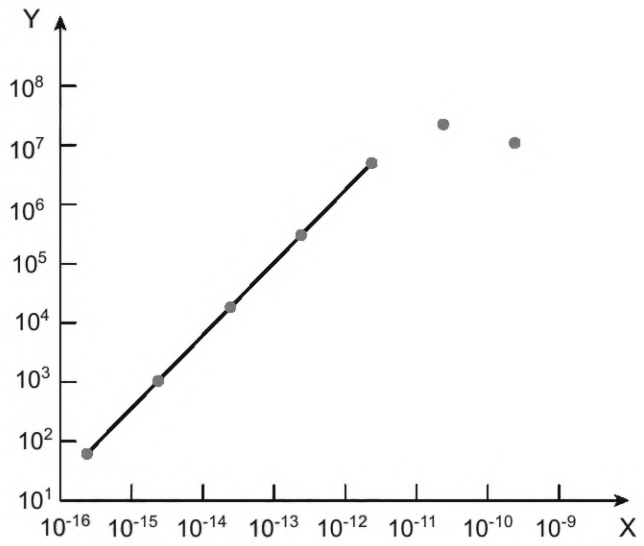
Примечание 1 — Очищенный или неочищенный (например, лизат клеток, экспрессирующих люциферазу) фермент люциферазы допускается использовать для определения динамического диапазона.

Примечание 2 — При приготовлении раствора для разведения температура и состав буфера могут влиять на активность фермента люциферазы из-за агрегации или дезактивации.

Примечание 3 — Время измерения после добавления биолюминесцентного реагента контролируют для обеспечения воспроизводимости.

На рисунке G.1 приведен пример определения динамического диапазона микропланшетного люминометра. Очищенные ферменты люциферазы зеленого жука разбавляют 100 мМ Трис-HCl (pH = 8,0) с добавлением 100 мМ NaCl и 8 % (м/о) глицерина, и используют для приготовления серийного разведения с использованием того же буфера. 10 мм^3 аликвоты раствора фермента распределяют в каждую лунку 96-луночного черного планшета с прозрачным дном и смешивают с 90 мм^3 коммерчески доступного биолюминесцентного реагента. Согласно инструкциям производителя, сигнал измеряют в течение 10 с при комнатной температуре.

Примечание 4 — В целом биолюминесцентные реагенты содержат избыточное количество люциферина по отношению к люциферазе.



X — люцифераза, моль; Y — скорость счета детектора, 1/с

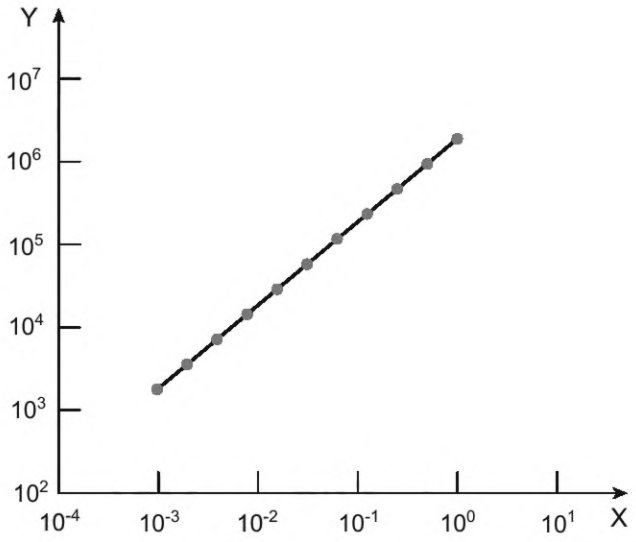
Рисунок G.1 — Определение динамического диапазона микропланшетного люминометра с использованием очищенной люциферазы жука, излучающей зеленый свет

G.3 Определение динамического диапазона с использованием эталонного светодиодного источника света

Эталонный светодиодный источник света, световой поток которого является переменным, допускается использовать для определения динамического диапазона люминометра. Выбирают соответствующую форму эталонного светодиодного источника света, поскольку доступны различные формы, включая форму кнопки, трубки или пластины.

На рисунке G.2 приведен пример определения динамического диапазона микропланшетного люминометра с использованием эталонного светодиодного источника света пластинчатого типа. Эталонный светодиодный источник света, который излучает зеленый свет (λ_{max} = 527 нм), был установлен на микропланшетном люминометре, и сигналы измеряли в течение 3 с при комнатной температуре. Выходная мощность света изменялась последовательно (11 шагов).

Рекомендуется, чтобы температура эталонного светодиодного источника света в люминометре поддерживалась постоянной во время измерения, поскольку интенсивность сигнала от светодиодного эталонного источника света сильно зависит от температуры.



X — интенсивность [светодиод, произвольная единица (произв.ед.)]; Y — скорость счета детектора, 1/с

Рисунок G.2 — Определение динамического диапазона микропланшетного люминометра с использованием эталонного светодиодного источника света

Приложение Н
(справочное)

Пример построения калибровочной кривой и определения динамического диапазона спектрофлуориметра

Н.1 Общие положения

В настоящем приложении приведен пример определения динамического диапазона спектрофлуориметра, который может быть полезен для испытательных лабораторий.

Спектрофлуориметр измеряет сигнал флуоресценции, испускаемый флуоресцентными веществами, возбуждаемыми источником света в приборе. Фильтры возбуждения и испускания используют для разделения света с длиной волны, предназначенной для использования. Сигнал флуоресценции обнаруживают фотодетектором и выражают в условных единицах. Для коррекции фона буферный раствор, не содержащий флуоресцентных молекул, измеряют как холостую пробу, и полученное значение фона вычитают из каждого измеренного значения сигнала флуоресцентной пробы.

Н.2 Построение калибровочной кривой

Калибровочную кривую можно построить, измеряя серийное разбавление эталонных флуоресцентных молекул, которые имеют те же свойства флуоресценции, что и измеряемая проба (см. рисунок Н.1). Для построения калибровочной кривой подходят стандартные материалы. Количество измеряемой пробы можно определить, сравнив показания флуоресценции и калибровочную кривую.

Примечание — При проведении флуоресцентного окрашивания нуклеиновых кислот или белков можно наблюдать вариации от пробы к пробе из-за различий в типах молекул-мишеней, даже если используют один и тот же реагент для флуоресцентного окрашивания.

Н.3 Определение динамического диапазона

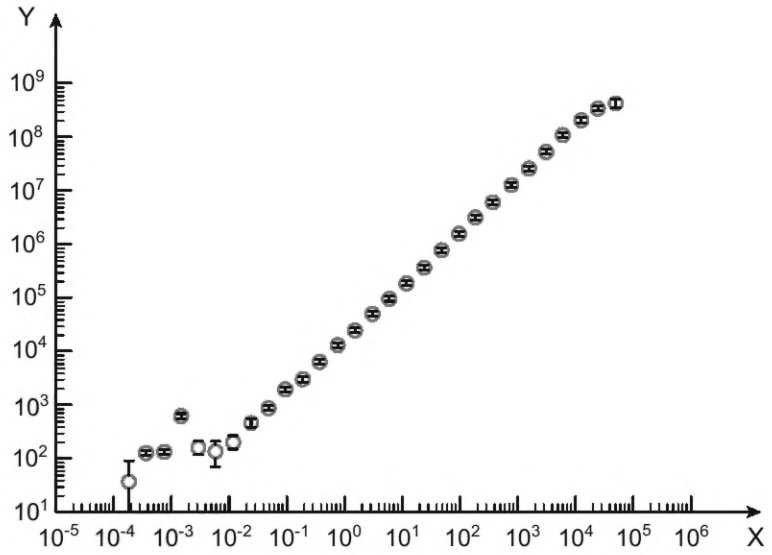
Динамический диапазон спектрофлуориметра можно определить с помощью калибровочной кривой, построенной на основе эталонного материала для калибровочной кривой (см. рисунок Н.1). Настройки фотодетектора, включая напряжение усиления и время экспозиции, можно отрегулировать для управления динамическим диапазоном.

Примечание 1 — При флуоресцентных измерениях мощность излучения возбуждающего света и ее стабильность также влияют на показания измерения.

Примечание 2 — Для определения динамического диапазона блока обнаружения в спектрофлуориметре можно использовать эталонный светодиодный источник света.

Примечание 3 — В пробах флуоресцентных измерений с высокой концентрацией линейное увеличение показаний флуоресценции может быть подавлено, поскольку большая часть возбуждающего света поглощается поверхностью и не может достичь раствора пробы.

Примечание 4 — Свойства флуоресцентных проб, такие как гашение и/или изменение спектра флуоресценции из-за условий растворителя, могут влиять на показания измерения.



X — концентрация красителя, нМ; Y — показания детектора, произв. ед.

Рисунок Н.1 — Определение динамического диапазона спектрафлуориметра с помощью калибровочной кривой, построенной путем измерения серийного разбавления раствора флуоресцеина

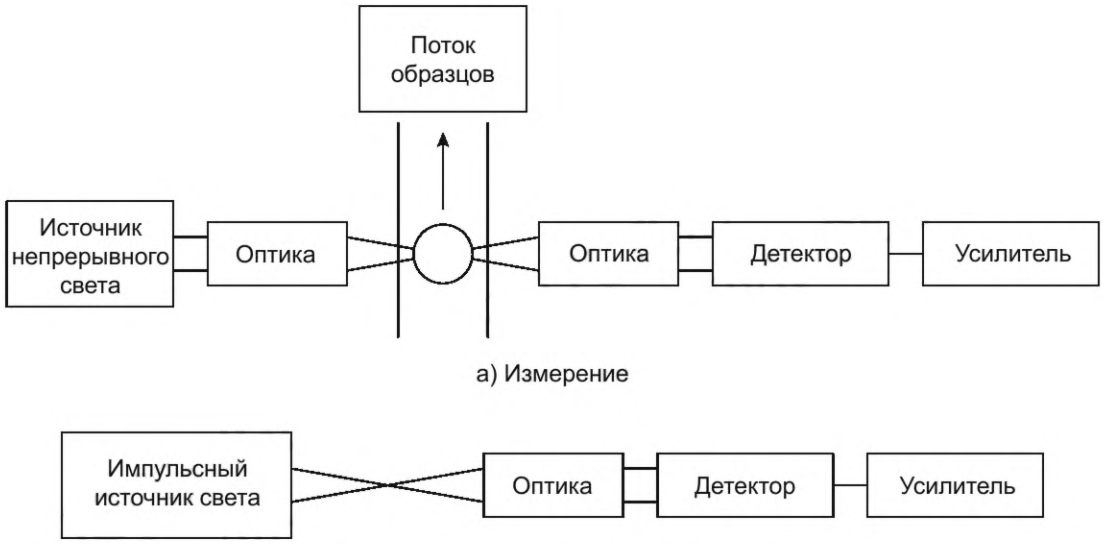
Приложение I
(справочное)

Пример определения динамического диапазона проточного цитометра

I.1 Общие положения

Проточные цитометры и капельные цифровые ПЦР-ридеры используют фотодетекторы для измерения флуоресценции, испускаемой частицами, которые протекают через оптическую зону обнаружения [см. рисунок I.1 a)]. Зону обнаружения освещают непрерывным источником света. Проходящая частица вызывает импульс флуоресцентного света, который обнаруживается и усиливается. Усилитель может быть линейным или нелинейным в зависимости от применения или желаемого динамического диапазона, который необходимо охватить. Электрический выходной сигнал оцифровывается для определения высоты импульса или других параметров, характеризующих анализируемую частицу.

Пример — Площадь под импульсом можно использовать для повышения чувствительности при низкой скорости счета.



a) Измерение

b) Определение динамического диапазона

Рисунок I.1 — Оптическая конфигурация

I.2 Измерение динамического диапазона

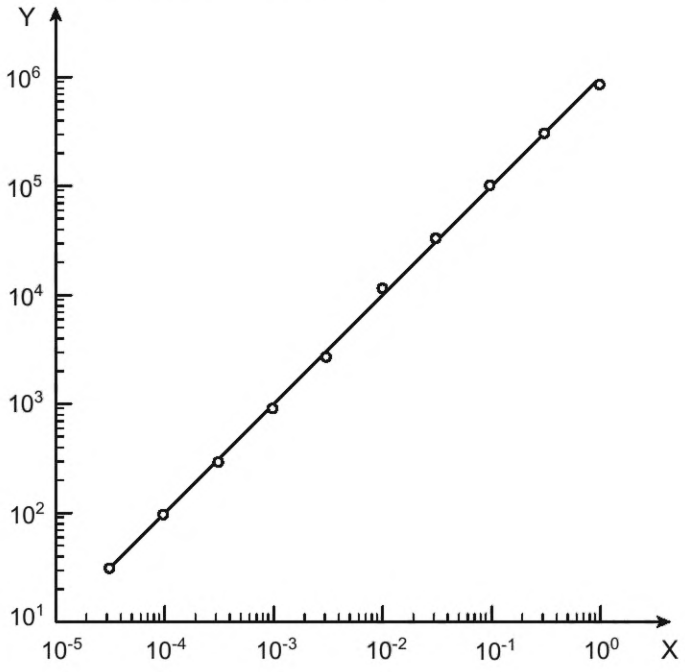
Динамический диапазон детектора можно определить, заменив поток пробы импульсным источником света [см. рисунок I.1 b)]. Импульсный источник света может быть основан на одном или нескольких светодиодах с контролируемыми характеристиками излучения. Аналитические приборы обычно имеют два или более каналов обнаружения флуоресценции, которые используют различные спектральные фильтры в соответствующей оптике детектора. Следует рассмотреть возможность удаления спектрального фильтра для определения динамического диапазона с импульсным источником света, поскольку спектральный диапазон излучения светодиода может быть ограничен. Длительность импульса, высота импульса и скорость повторения импульсов оптического сигнала должны регулироваться в диапазоне, необходимом для испытания.

Примечание 1 — Ожидаемые значения длительности импульса находятся в диапазоне от 0,5 мкс до 50 мкс при измерении с помощью проточных цитометров. Ожидаемые частоты повторения импульсов находятся в диапазоне от 0,1 кГц до 20 кГц.

Высота импульса импульсного источника света должна изменяться регулярными шагами в линейном или логарифмическом масштабе в зависимости от применения. На рисунке I.2 показан пример вариации в логарифмическом масштабе. Линейная регрессия должна быть проведена по логарифмическим значениям показаний детектора и амплитуды импульса источника импульсного света, если динамический диапазон оценивается в логарифмическом масштабе. Если динамический диапазон оценивается в линейном масштабе, линейная регрессия должна быть проведена для показаний детектора в зависимости от высоты импульса.

Примечание 2 — Примером использования логарифмической шкалы является иммунофенотипирование клеток в проточной цитометрии. Линейная шкала используется в считывании капельной цифровой ПЦР.

Принятие линейного отклика в динамическом диапазоне может быть основано на предопределенных значениях параметров качества линейной регрессии. Например, может потребоваться коэффициент детерминации $R^2 > 0,998$ (для других параметров качества см. ИСО 20391-2).



X — высота импульса (источник света, произв. ед.); Y — показание детектора, произв. ед.

Рисунок I.2 — Измерение динамического диапазона по логарифмической шкале

I.3 Квалификация

Для поддержания прослеживаемости и сопоставимости следует применять стандартное обеспечение качества динамического диапазона. Для этой цели можно использовать повторное измерение калибровочных частиц в установке на рисунке I.1 a) (см., например, [33]). Это может включать количественную оценку измеренной высоты сигнала флуоресценции [34].

Приложение J
(справочное)

Пример калибровки эталонных источников света и люминометров

J.1 Общие положения

В настоящем приложении приведен пример калибровки эталонных источников света, который может быть полезен для производителей.

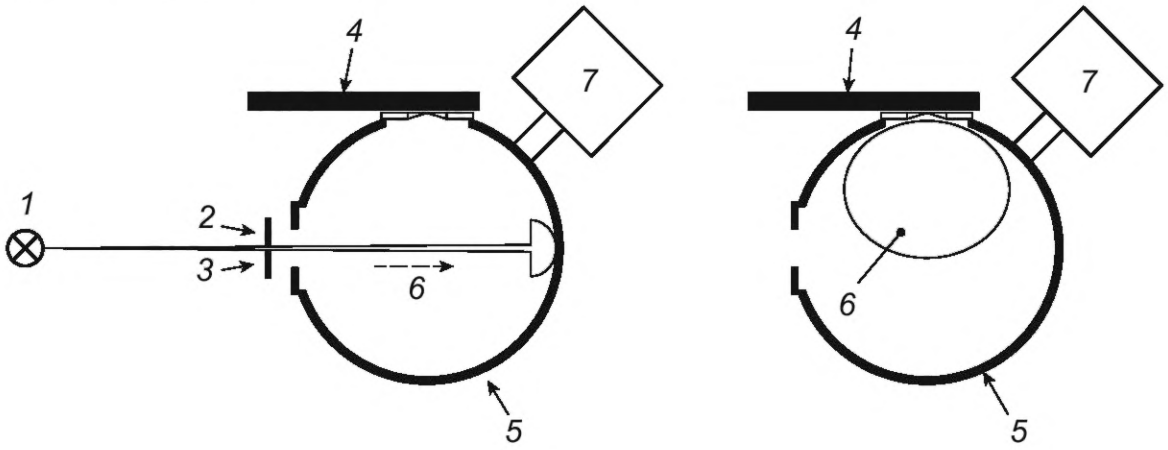
Когда оптические эталоны полностью откалиброваны по радиометрическим значениям, приборы для измерения оптических сигналов могут быть откалиброваны на основе абсолютных радиометрических величин. Абсолютными оптическими значениями для эталонных источников света являются, например, полный поток излучения, Вт, или полный поток фотонов (фотоны $с^{-1}$). С использованием эталонных источников света с абсолютными значениями калибровка люминометров может быть выполнена на основе абсолютных значений, так что результаты калибровки будут сопоставимы, даже если типы или производители источников света различны.

Абсолютная чувствительность люминометра зависит от спектра исследуемой биологической пробы, а также от профилей пространственного углового распределения светового излучения. Поэтому абсолютную чувствительность люминометра калибруют относительно каждой пробы — с учетом заданного объема и типа используемой емкости, например держателя пробы, пробирки или микропланшета.

Абсолютная чувствительность люминометра определяется с использованием абсолютно калиброванного эталонного источника света. Эталонный источник света, который будет использоваться, должен иметь уровень мощности в пределах диапазона обнаружения целевого люминометра, а также спектральные и угловые профили распределения, аналогичные профилям исследуемого люминесцентного раствора. Спектральное соответствие имеет важное значение, поскольку люминометр не является спектрометрическим и его чувствительность сильно зависит от измеряемого спектра.

J.2 Абсолютная калибровка эталонных источников света

Абсолютная калибровка эталонных источников света может быть выполнена с помощью измерительной аппаратуры, абсолютная чувствительность которой определяется с помощью соответствующего радиометрического стандарта. Например, интегрирующая сфера, оснащенная спектрометром, может использоваться для измерения полного потока излучения, Вт, в котором абсолютная чувствительность калибруется с помощью стандартной лампы спектральной освещенности, мкВт·$см^{-2}$·$нм^{-1}$ (см. рисунок J.1).



a) Калибровка абсолютной чувствительности прибора осуществляется на основе эталонной лампы, спектральная плотность излучения которой (мкВт·$см^{-2}$·$нм^{-1}$) и площадь апертуры ($см^2$) известны

b) Измерение спектрального потока излучения (мкВт·$нм^{-1}$) эталонного светодиодного источника света, где интегрирование длины волны спектрального потока излучения (мкВт·$нм^{-1}$) дает поток излучения (мкВт)

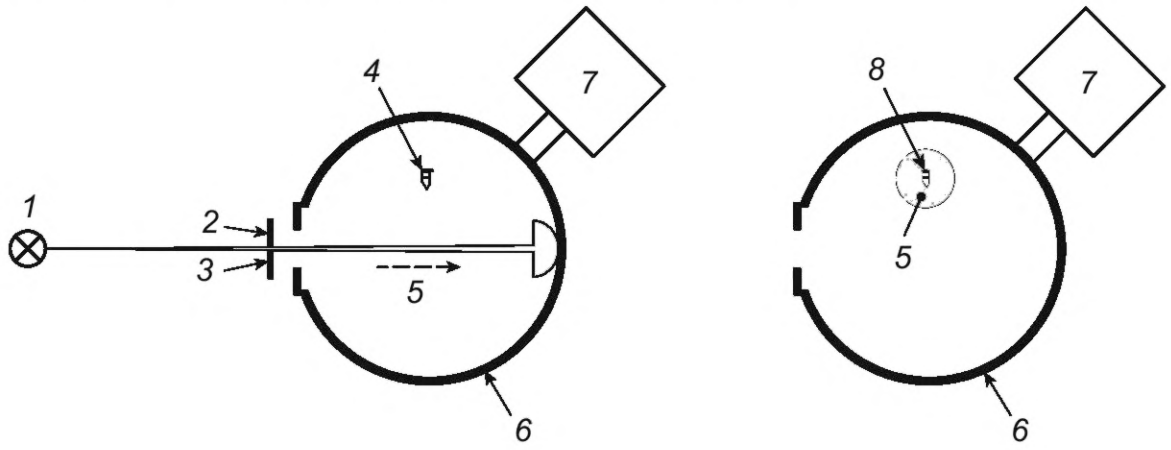
1 — стандартная лампа спектрального излучения; *2* — спектральное излучение, мкВт·$см^{-2}$·$нм^{-1}$; *3* — апертура с известной площадью, $см^2$; *4* — светодиод (эталонный источник света) как тестируемое устройство; *5* — интегрирующая сфера; *6* — спектральный поток излучения, мкВт·$нм^{-1}$; *7* — спектрометр

Рисунок J.1 — Интегрирующая сфера, оснащенная спектрометром

J.3 Абсолютная калибровка приборов измерения оптических сигналов, используемых для фотометрических методов

Лучшим эталонным источником света для абсолютной калибровки люминометра является тот же биолюминесцентный или хемилюминесцентный раствор, который необходимо протестировать с известным калиброванным значением, который называется «эталонный раствор». Абсолютное эталонное значение, то есть полный поток излучения, Вт, или полный поток фотонов (фотоны $с^{-1}$), эталонного раствора можно откалибровать как показано на рисунке J.2.

Идеальный эталонный раствор имеет долгосрочное стабильное свойство интенсивности оптического сигнала. Однако интенсивность оптического сигнала от эталонного раствора, как правило, зависит от качества реагентов и, следовательно, имеет плохую воспроизводимость. Чтобы избежать этого недостатка, эталонный раствор просто дублируют, разделяя гомогенный реакционный раствор на две пробирки. Одна из них устанавливается в системе интегрирующей сферы, а другая — в калибруемом люминометре. При одновременных измерениях образцов гомогенных эталонных растворов в интегрирующей сфере и люминометре абсолютный полный поток излучения, мкВт, определяемый интегрирующей сферой, и значение счета, определяемое люминометром, дают абсолютное значение чувствительности (мкВт·$счет^{-1}$) люминометра (см., например, [35]).



a) Калибровка абсолютной чувствительности прибора в присутствии эталонного раствора осуществляется на основе эталонной лампы, спектральная плотность излучения которой (мкВт·$см^{-2}$·$нм^{-1}$) и площадь апертуры ($см^2$) известны

b) Измерение спектрального потока излучения (мкВт·$нм^{-1}$) эталонного раствора, где интегрирование длины волны спектрального потока излучения (мкВт·$нм^{-1}$) дает поток излучения (мкВт), который используется для калибровки абсолютной чувствительности люминометров

1 — стандартная лампа спектрального излучения; *2* — спектральное излучение, мкВт·$см^{-2}$·$нм^{-1}$; *3* — апертура с известной площадью, $см^2$; *4* — эталонный раствор без излучения света; *5* — спектральный поток излучения, мкВт·$нм^{-1}$; *6* — интегрирующая сфера; *7* — спектрометр; *8* — эталонный раствор

Рисунок J.2 — Интегрирующая сфера, оснащенная спектрометром

Приложение К
(справочное)

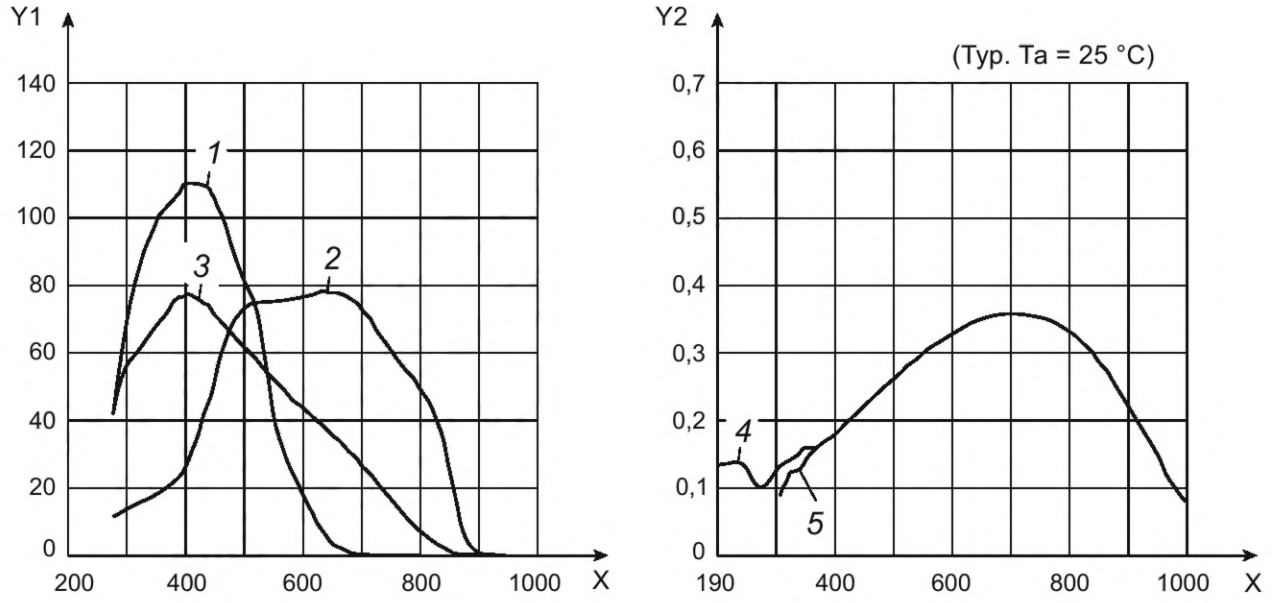
Примеры спектральных свойств фотодетекторов

К.1 Общие положения

Приборы, реагенты и другие экспериментальные материалы, используемые для измерения оптического сигнала, выбирают в соответствии с предполагаемой целью и процедурами аналитических и пробирных методов. Фотодетекторы, включая фотоэлектронные умножители (ФЭУ) и кремниевые фотодиоды (SiPD), обладают определенными свойствами спектральной чувствительности. Спектральное свойство существует также в других оптических компонентах, включая источники света. Инструменты для измерения оптического сигнала состоят из соответствующих фотодетекторов, оптики и источников света в соответствии со спектральными свойствами.

К.2 Спектральная чувствительность фотоэлектронных умножителей и кремниевых фотодиодов

Спектральная чувствительность фотодетектора — это отношение выходного сигнала к свету, падающему на фотодетектор на каждой длине волны. Каждый детектор имеет свое собственное свойство спектральной чувствительности. Спектральная чувствительность ФЭУ зависит от материала фотокатода. ФЭУ с супербищелочным фотокатодом обладает высокой чувствительностью в видимом диапазоне, тогда как в более длинноволновом диапазоне он менее чувствителен. ФЭУ с многощелочным фотокатодом обладают большей чувствительностью в более длинноволновой области [см. рисунок К.1 a)]. Диапазон длин волн чувствительности SiPD шире, чем у ФЭУ [см. рисунок К.1 b)].



a) Фотоэлектронные умножители

b) Кремниевые фотодиодные детекторы

X — длина волны, нм; *Y*1 — чувствительность катода к излучению, мА/Вт; *Y*2 — фоточувствительность, А/Вт; *1* — бищелочной фотокатод; *2* — расширенный красный многощелочной фотокатод; *3* — многощелочной фотокатод; *4* — окно из кварцевого стекла; *5* — окно из боросиликатного стекла

Рисунок К.1 — Примеры спектральной чувствительности

Фотодетекторы в приборах выбирают так, чтобы они были достаточно чувствительными на длине волны целевых оптических сигналов. Другим важным фактором выбора фотодетекторов является уровень фонового сигнала. В общем, чем выше чувствительность детектора, тем он будет более чувствительным. Однако чувствительность также зависит от уровня фонового сигнала, включая темп темнового счета и шум считывания. Интенсивность оптического сигнала можно измерить, если она выше фонового сигнала и находится в динамическом диапазоне детекторов. Правильный выбор фотодетекторов, оптики и условий эксплуатации имеет решающее значение для обнаружения и измерения оптического сигнала.

Библиография

[1]	ISO 2041:2018	Mechanical vibration, shock and condition monitoring — Vocabulary
[2]	ISO 5725-1:1994	Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions
[3]	ISO 5725-3:1994	Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 3:Intermediate measures of the precision of a standard measurement method
[4]	ISO 9000:2015	Quality management systems — Fundamentals and vocabulary
[5]	ISO 9555-4:1992	Measurement of liquid flow in open channels — Tracer dilution methods for the measurement of steady flow — Part 4: Fluorescent tracers
[6]	ISO 10993-5	Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
[7]	ISO 13629-1	Textiles — Determination of antifungal activity of textile products — Part 1: Luminescence method
[8]	ISO 15089	Water quality — Guidelines for selective immunoassays for the determination of plant treatment and pesticide agents
[9]	ISO 15189	Medical laboratories — Requirements for quality and competence
[10]	ISO/TS 16393:2019	Molecular biomarker analysis — Determination of the performance characteristics of qualitative measurement methods and validation of methods
[11]	ISO/TS 19006	Nanotechnologies — 5-(and 6)-Chloromethyl-2',7' Dichloro-dihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCF-DA) assay for evaluating nanoparticle-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) production in RAW 264.7 macrophage cell line
[12]	ISO 19007	Nanotechnologies — In vitro MTS assay for measuring the cytotoxic effect of Nanoparticles
[13]	ISO 19040-1	Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 1: Yeast estrogen screen (Saccharomyces cerevisiae)
[14]	ISO 19040-2	Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 2: Yeast estrogen screen (A-YES, Arxula adeninivorans)
[15]	ISO 19040-3	Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 3: In vitro human cell-based reporter gene assay
[16]	ISO 19344	Milk and milk products — Starter cultures, probiotics and fermented products — Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry
[17]	ISO 20391-1	Biotechnology — Cell counting — Part 1: General guidance on cell counting methods
[18]	ISO 20391-2	Biotechnology — Cell counting — Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance
[19]	ISO 23033	Biotechnology — Analytical methods — General requirements and considerations for the testing and characterization of cellular therapeutic products
[20]	ISO 25178-604:2013	Geometrical product specifications (GPS) — Surface texture: Areal — Part 604: Nominal characteristics of non-contact (coherence scanning interferometry) instruments
[21]	ISO Guide 35:2017	Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability
[22]	ISO/IEC Guide 99:2007, Guide 99:2007	International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)
[23]	IEC 60050-845	International Electrotechnical Vocabulary (IEV) — Part 845: Lighting
[24]	OIML R135:2004	Spectrophotometers for medical laboratories

[25] OECD (2021), Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, gost.e-ecolog.ru

[26] OECD (2018), Test No. 442B: Skin Sensitization, Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or —FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, gost.e-ecolog.ru

[27] OECD (2022), Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, gost.e-ecolog.ru

[28] OECD (2022), Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, gost.e-ecolog.ru

[29] OECD (2019), Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, gost.e-ecolog.ru org/10.1787/9789264264618-en

[30] OECD (2019), Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, gost.e-ecolog.ru

[31] Hazardous Waste Test Methods / SW-846 Test Method 4435 (2014): Screening For Dioxin-Like Chemical Activity In Soils And Sediments Using The Calux Bioassay And Toxic Equivalents (TEQs) Determinations

[32] YASUNAGA M., FUJITA Y., SAITO R., OSHIMURA M., NAKAJIMA Y. Continuous long-term cytotoxicity monitoring in 3D spheroids of beetle luciferase-expressing hepatocytes by nondestructive bioluminescence measurement. BMC Biotechnol. 2017, 17 стр. 54

[33] PERFETTO S.P., ARMBROZAK D., NGUYEN R., CHATTOPADHYAY P.K., ROEDER M. Quality assurance for polychromatic flow cytometry using a suite of calibration beads. Nat. Protoc. 2012, 7 стр. 2067—2079

[34] SCHWARTZ A., GAIGALAS A.K., WANG L., MARTI G.E., VOGT R.F., FERNANDEZ-REPOLLET E. Formalization of the MESF Unit of Fluorescence Intensity. Cytometry B Clin. Cytom. 2004, 57 стр. 1—6

[35] NIWA K., ICHINO Y., OHMIYA Y. Quantum yield measurements of firefly bioluminescence reactions using a commercial luminometer. Chem. Lett. 2010, 39 стр. 291—293

УДК 615.07:006.354 ОКС 07.080

Ключевые слова: биотехнология, биологические пробы, оптические сигналы, фотометрические методы, источник света, оптический эталон

Редактор *М.В. Митрофанова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 23.10.2025. Подписано в печать 10.11.2025. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 3,16.

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