ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р ИСО 21474-2— 2026

Изделия медицинские для диагностики *in vitro*

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Часть 2

Валидация и верификация

(ISO 21474-2:2022, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2026

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Ассоциацией специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»), Федеральным государственным бюджетным учреждением «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 380 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы ин витро»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 марта 2026 г. № 272-ст

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 21474-2:2022 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Мультиплексные молекулярные методы для определения содержания нуклеиновых кислот. Часть 2. Валидация и верификация» («In vitro diagnostic medical devices — Multiplex molecular testing for nucleic acids — Part 2: Validation and verification», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ТК 212 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы ин витро» Международной организации по стандартизации (ИСО).

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

5 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

© ISO, 2022
© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2026

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 требования 2
5 Оценка функциональных характеристик исследования 5
Приложение А (справочное) Сертифицированные стандартные образцы (ССО) 10
Приложение В (справочное) Пример стандартных образцов состава генома человека 12
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам 15
Библиография 16

Введение

Первое поколение медицинских изделий для диагностики *in vitro* (ИВД) для молекулярных исследований на основе нуклеиновых кислот было нацелено на обнаружение или количественное определение одной последовательности нуклеиновых кислот (например, вирусной РНК, мРНК или геномной ДНК) в клиническом образце. Для сравнения, мультиплексное молекулярное исследование одновременно измеряет содержание нескольких интересующих последовательностей нуклеиновых кислот в одной реакционной пробирке или системе. Разработка и клиническое использование мультиплексных медицинских изделий ИВД быстро расширяются благодаря технологическому прогрессу и выяснению нового клинического значения для многих биомаркеров.

Конкуренция между реакциями в мультиплексных молекулярных исследованиях может предъявлять более строгие требования к чистоте образца, исходным реагентам и платформам для предотвращения неспецифических реакций и фонового сигнала. По сравнению с исследованием одной мишени мультиплексные молекулярные исследования требуют большего количества контролей, более сложных алгоритмов оценки эффективности/исследования данных и более сложного представления результатов.

Лаборатории могут разрабатывать методику исследования своими силами («исследование, разработанное лабораторией (LDT)», «*in-house test*» или «исследование собственной разработки»)[1)] или использовать коммерчески доступные мультиплексные анализы с использованием различных технологий и приборных платформ. С ростом доступности и использования мультиплексных молекулярных исследований все больше возникает необходимость в руководстве по разработке, валидации, верификации, контролю, анализу данных и применению мультиплексных молекулярных исследований. Для того чтобы мультиплексное молекулярное исследование надежно выполняло свое предназначение, необходимо контролировать процесс от получения образца и подготовки нуклеиновой кислоты к исследованию до оценки данных и представления результатов. Проведение мультиплексного молекулярного исследования ставит перед лабораторией задачи в отношении соответствующей валидации и верификации, получения соответствующих контрольных материалов, анализа данных и отчетности. Сложность анализа данных и представления результатов возрастает по сравнению с монопараметрическими, моноплексными исследованиями. Более того, наличие достаточного количества соответствующих контрольных материалов и стандартных образцов (СО) для надлежащей валидации и верификации мультиплексных молекулярных исследований является серьезной проблемой. Однако использование методов частичного или полного секвенирования может быть полезным для квалификации контрольных материалов. В настоящем стандарте приведены рекомендации по различным аспектам валидации и верификации измерений, выполняемых с помощью мультиплексных молекулярных исследований с целью обеспечения воспроизводимости результатов таких исследований при разработке и внедрении мультиплексных молекулярных исследований нуклеиновых кислот для клинического использования.

[1)] В Российской Федерации указанные исследования относятся в соответствии с Федеральным законом от 21 ноября 2022 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» к незарегистрированным медицинским изделиям для диагностики *in vitro*.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Изделия медицинские для диагностики *in vitro*

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Часть 2

Валидация и верификация

In vitro diagnostic medical devices. Multiplex molecular testing for nucleic acids.
Part 2. Validation and verification

Дата введения — 2026—09—01

1 Область применения

В настоящем стандарте приведены общие требования к валидации и верификации мультиплексных молекулярных исследований, которые одновременно определяют две или более целевых последовательностей нуклеиновых кислот, представляющих интерес. Настоящий стандарт применим ко всем мультиплексным методам, используемым для исследования с помощью медицинских изделий для диагностики *in vitro* (ИВД), и лабораторно разработанным исследованиям (LDT). Он содержит информацию как для качественного выявления, так и для количественного определения содержания целевых последовательностей нуклеиновых кислот.

Настоящий стандарт устанавливает требования к проведению мультиплексных исследований, позволяющих обнаруживать и/или количественно определять целевые последовательности нуклеиновых кислот человека или целевые последовательности нуклеиновых кислот микробных патогенов в клинических образцах биологического материала человека.

Настоящий стандарт применим к любому молекулярному диагностическому исследованию *in vitro*, выполняемому медицинскими лабораториями. Он также предназначен для использования клиентами лабораторий, разработчиками и производителями ИВД, биобанками, учреждениями и коммерческими организациями, проводящими биомедицинские исследования, а также регулирующими органами. Настоящий стандарт не применим к метагеномике.

Примечание — Методику исследования, разработанную для собственного использования лабораторией, часто называют «исследованием, разработанным лабораторией», «LDT».

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты [для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения)]:

ISO 15189, Medical laboratories — Requirements for quality and competence (Медицинские лаборатории. Требования к качеству и компетентности)

ISO 21474-1, In vitro diagnostic medical devices — Multiplex molecular testing for nucleic acids — Part 1: Terminology and general requirements for nucleic acid quality evaluation (Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Мультиплексные молекулярные методы для определения содержания нуклеиновых кислот. Часть 1. Терминология и общие требования к оценке качества нуклеиновых кислот)

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ИСО 21474-1, а также следующие термины с соответствующими определениями.

ИСО и МЭК поддерживают терминологические базы данных для использования в 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 **аналитическая чувствительность** (analytical sensitivity): Отношение изменения показаний измерения к соответствующему изменению значения измеряемой величины.

[ИСО 18113-1:2009, А.3.3, изменено — сноски с 1 по 4 были удалены [1]]

3.2 **диагностическая чувствительность** (diagnostic sensitivity): Способность методики исследования *in vitro* (ИВД) давать положительные результаты, связанные с определенным заболеванием или состоянием.

[ИСО 18113-1:2009, А.3.15, изменено — сноски с 1 по 4 были удалены [1]]

4 Общие требования

4.1 Общие сведения

Мультиплексные молекулярные исследования — это медицинские исследования ИВД, которые обнаруживают и/или измеряют несколько последовательностей нуклеиновых кислот одновременно, например мультиплексная ПЦР, ДНК-микрочипы и методики, основанные на массовом параллельном секвенировании.

В случае мультиплексных молекулярных исследований нуклеиновых кислот конкуренция между отдельными реакциями может предъявлять более строгие требования к чистоте образца, вводу образца, реагентам и платформам, чтобы избежать неспецифических реакций и фонового сигнала. По сравнению с моноплексными, мультиплексные молекулярные исследования могут иметь большее количество контролей, более сложные алгоритмы оценки эффективности/исследования данных и более сложное представление результатов.

Мероприятия по валидации направлены на обеспечение определения аналитических характеристик для исследования, которое осуществляется в процессе разработки либо производителем, либо лабораторией. План проверки и валидации, создаваемый производителями для ИВД и лабораториями для LDT, должен быть направлен на установление таких характеристик, как точность, специфичность, прецизионность, предел обнаружения (LOD)/диапазон исследования и определение перекрестной реактивности/интерферирующих веществ. При планировании разработки исследования должно быть определено предполагаемое использование, включая типы образцов, которые будут использоваться. Производитель медицинского изделия ИВД должен разработать инструкции по процессу исследования, которые должны соблюдаться. При изменении каких-либо процессов или методов при верификации и после внедрения лаборатория должна провести валидацию исследования с новыми медицинскими изделиями. Лаборатория должна провести верификацию, чтобы заранее подтвердить характеристики, необходимые для исследования пациента. Затем лаборатория осуществляет постоянный контроль качества (КК) мультиплексных молекулярных исследований путем документального контроля процедур, обучения операторов, рутинного КК, проверки квалификации, калибровки приборов и соотнесения результатов с клиническими заключениями.

На достоверность и надежность результатов мультиплексных молекулярных исследований могут влиять все этапы лабораторного процесса, включая взятие, транспортирование, хранение и обработку образцов на преаналитическом этапе, а также сам аналитический этап.

Примечание — В [2] приведены рекомендации по различным аспектам верификации и валидации мультиплексного исследования.

4.2 Требования к лаборатории

Требования к качеству и компетентности медицинских лабораторий должны соответствовать требованиям, описанным в ИСО 15189.

Для анализов, которые не полностью интегрированы в одно одноразовое устройство или на одну платформу (от образца до результата), обработку образцов проводят в отдельных рабочих зонах/помещениях (см. [3], раздел 6).

Случайное загрязнение ДНК и РНК может происходить из аэрозолей, содержащих матричные последовательности, такие как ампликоны, полученные из ранее амплифицированных NA (нуклеиновых кислот). Вследствие этого организация рабочей зоны в лаборатории и надлежащая практика должны быть основаны на следующем:

- систематическое соблюдение методологических этапов, связанных с получением результатов исследования;
- соблюдение принципа «прямого потока» для обработки образцов.

Последнее гарантирует, что ДНК и РНК в исследуемом материале остаются физически разделенными с продуктами амплификации. Более подробная информация приведена в [4].

4.3 Необходимые реагенты

Все реагенты и материалы, используемые в исследовании, должны быть идентичны или эквивалентны тем, которые указаны в методе. В противном случае все реактивы и материалы должны быть соответствующего класса для молекулярной биологии, например, вода, не содержащая ДНКазы и РНКазы.

Эти реагенты необходимо хранить и использовать в соответствии с рекомендациями поставщика или согласно спецификациям лабораторного контроля качества.

Необходимо подтвердить/проверить характеристики и качество реагентов [например, флуоресцентного(ых) красителя(ей), буферов] и количество внешнего калибратора, или СО, который добавляют в реакционную смесь.

Все критические реагенты должны быть проверены на функциональность перед включением в официальную оценку эффективности. В мультиплексных молекулярных исследованиях функциональность следует оценивать с помощью синтетических контролей, если невозможно установить ее для всех мишеней с помощью геномных образцов.

Если производитель медицинского изделия ИВД предоставляет инструкции по хранению и использованию коммерческого набора для измерений, они должны соблюдаться. Если производитель медицинского изделия ИВД не предоставляет таких инструкций, они должны быть определены и утверждены лабораторией, и ими следует руководствоваться.

4.4 Оборудование

Лаборатория должна использовать надлежащим образом валидированное (т. е. сертифицированное по установке, эксплуатации и производительности) и обслуживаемое оборудование в соответствии с инструкциями производителей и требованиями, приведенными в ИСО 15189. В дополнение к стандартному лабораторному оборудованию, специализированное оборудование для мультиплексного исследования приведено в соответствующих отдельных стандартах, например, ИСО 16578 для микрочипов [5].

Там, где это применимо, следует регулярно проводить калибровку и вести учет оборудования, работа которого может повлиять на получаемые данные.

4.5 Стандартные образцы и контрольные материалы

4.5.1 Общие сведения

При наличии СО они должны быть отобраны таким образом, чтобы соответствовать своему назначению. При отсутствии СО необходимо спланировать, разработать и задокументировать альтернативные подходы.

СО следует применять для валидации мультиплексного молекулярного исследования нуклеиновой кислоты. СО также допускается использовать для качественных или количественных методов при выполнении множества различных функций, таких как калибровка и оценка методики исследования. Особенно при геномном анализе с использованием методов массового параллельного секвенирования геномные СО могут включать различные последовательности в зависимости от выбранного материала (см. приложения А и В); поэтому СО для таких методов необходимо рассматривать на предмет соответствия предполагаемому использованию.

Лаборатория должна использовать контрольные материалы, которые проявляют себя при исследованиях как можно более сходным образом с образцом пациента, как указано в ИСО 15189. Если такие контрольные материалы недоступны, невозможно исследовать все зонды, присутствующие в панели, для определения приемлемости реагентов или контроля достоверности. Лаборатория адаптирует свои методы работы, принимая во внимание, в частности, клиническое предназначение исследования.

Результаты исследования должны быть оценены для подтверждения того, что качество образца соответствует предполагаемому использованию. При проведении оценки должно быть предусмотрено использование СО (см. приложения А и В), включая негеномные (см. 4.5.3) и геномные (см. 4.5.2) СО.

Чтобы валидировать использование различных матриц, необходимо проводить анализы с перегрузкой (метод добавок).

Если производитель предоставляет инструкции по хранению и использованию СО и контрольных материалов для исследований, они должны соблюдаться. Если производитель не предоставляет таких инструкций, они должны быть определены и утверждены лабораторией, и ими также следует руководствоваться.

4.5.2 Эндогенная нуклеиновая кислота

Геномная ДНК (гДНК) — это материал КК, который наиболее близок к образцам пациентов, и является наиболее предпочтительным, но он не всегда самый эффективный.

Наличие или отсутствие мутаций или вариантов в любом материале (например в иммортализованных линиях клеток человека, очищенной гДНК, бактериальных/микробных культурах и бактериальной гДНК) должно быть подтверждено или проверено лабораторией для каждой новой партии, полученной перед использованием.

В качестве альтернативного гДНК контрольного материала можно использовать синтетическую рекомбинантную сконструированную или искусственно созданную длинную ДНК, например, рекомбинантные искусственные хромосомы (см. 4.5.3). В качестве контрольного материала допускается использовать несколько транскриптов генов домашнего хозяйства.

Примечание — К генам домашнего хозяйства относятся, например, бета-актин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и циклофилин.

4.5.3 Негеномные стандартные образцы

Негеномные материалы КК являются синтетическими, рекомбинантными, генноинженерными или искусственно созданными и часто состоят из плазмид благодаря их стабильности и простоте использования. Негеномные материалы КК имеют большое значение и особенно подходят для мультиплексных анализов, поскольку они могут быть сконструированы таким образом, чтобы содержать все варианты последовательностей в сегментах генов в одном образце, выявляемых при исследовании. Негеномные контроли следует выбирать для целей контроля качества тщательно, чтобы убедиться, что они подходят для мониторинга нужных параметров системы. Существуют опасения и ограничения в отношении негеномных контролей. Некоторые тест-системы и/или программное обеспечение не рассчитаны на правильную идентификацию нескольких аллелей, содержащихся в мультиплексном контроле. Негеномные контроли должны быть добавлены к материалу пациента, и поэтому они не могут вести себя точно так же, как материал, полученный от пациента, на протяжении всего процесса исследования. Эта ситуация вызывает особую озабоченность, когда существует вероятность ошибочного определения или ложноположительного результата из-за присутствия псевдогенов или других последовательностей, как правило, обладающих высокой гомологией с интересующей мишенью.

Негеномные СО допускается использовать не только для исследования ДНК, но и для исследования РНК.

Примечание — СО ДНК или РНК могут быть оценены путем установления метрологической прослеживаемости к сертифицированным СО, таким как NMIJ CRM 6205-a и NMIJ CRM 6204-b.

4.6 Калибровка исследования

При количественных исследованиях, выполняемых, например, методом кПЦР, необходимо использовать соответствующее количество калибровочных точек и повторов, охватывающих диапазон, в котором сигнал достоверен. Калибровка влияет на неопределенность измерений (MU). Более подробно калибровка ПЦР описана в [16].

СО могут рассматриваться как альтернатива геномной ДНК или мРНК для проведения калибровки при условии, что будет доказана эквивалентность калибровок по СО геномной ДНК и по геномной ДНК, выделенной из образца, или по СО мРНК и по мРНК, выделенной из образца.

Пример — В качестве альтернативы геномной ДНК или мРНК для калибровочных СО допускается использовать серию разведений плазмиды или синтетической двуцепочечной ДНК (дцДНК), содержащей целевую последовательность, или плазмиды или синтетической дцДНК и одноцепочечной РНК (оцРНК).

4.7 Титрование нуклеиновых кислот

Исходная нуклеиновая кислота должна быть титрована для оптимизации диапазона концентраций, чтобы обеспечить обнаружение каждой целевой последовательности в конкретном исследовании, например, типичные диапазоны для ПЦР, микрочипов и секвенирования.

5 Оценка функциональных характеристик исследования

5.1 Общие сведения

Протокол валидации должен начинаться с четкого определения предполагаемого использования, что определит типы образцов и характеристики, которые необходимо рассмотреть.

Протокол валидации должен быть тщательно разработан, чтобы обеспечить максимально эффективное рассмотрение всех соответствующих параметров. На основе планирования проектирования и разработки лаборатория должна провести валидацию предполагаемого использования исследования в сравнении с существующим медицинским изделием (при наличии). Если существующее изделие недоступно, лаборатория должна подтвердить предполагаемое использование с помощью надлежащим образом спланированных исследований. В соответствии с планом валидации лаборатория должна описать и задокументировать соответствующие характеристики исследования в связи с заболеванием или другим клиническим контекстом, оцениваемым с помощью исследования. Лаборатория должна определить те характеристики исследования, которые в решающей степени связаны с клинической значимостью и клинической эффективностью исследования. Эти характеристики должны быть задокументированы как характеристики клинической эффективности. Более подробная информация об исследовании с использованием амплификации нуклеиновых кислот для выявления микробных патогенов приведена в [17].

Для оценки аналитических характеристик необходимо исследовать мультиплексную молекулярную тест-систему в ее окончательной конфигурации, а не в отдельных моноплексных исследованиях.

При проведении мультиплексных молекулярных исследований рекомендуется рассмотреть следующие моменты:

- тип и гетерогенность образца;
- LOD, который необходим с клинической точки зрения;
- генетическую неоднородность и нестабильность последовательностей-мишеней.

Пример — Примерами генетической неоднородности и нестабильности целевых последовательностей являются гетерогенность последовательностей как в рамках самого заболевания, так и при его прогрессировании, специфичность при рассмотрении гомологичных целевых последовательностей, генетический статус — заболевание приобретенное или наследственное — при изучении причины заболевания, а также генетическая ассоциация в случаях диагностики, прогноза или лечения заболевания.

Примечание — Рекомендации по практическому руководству для лабораторий в отношении валидации и верификации массового параллельного секвенирования для генетических заболеваний приведены в [6]—[8].

В процессе валидации необходимо решить следующие основные вопросы:

- возможность исследования всех имеющихся в панели образцов;
- проблему (или даже невозможность) предоставления статистически значимого количества образцов, достаточного для вывода о достоверности исследования, особенно, «положительных образцов»;
- сравнение внедряемого метода с более ранним методом;
- комплексное использование внутренних КК для всех целевых последовательностей панели.

При выборе исследования для оценки аналитических характеристик следует учитывать дизайн или принципы работы медицинского изделия ИВД, а также предполагаемое использование или назначение. Например, предел количественного определения (LoQ) не может быть применим к медицинскому изделию ИВД, который выдает качественный или бинарный результат.

5.2 Аналитическая специфичность

5.2.1 Аналитические характеристики

Поскольку такие аналиты, как варианты последовательностей или специфические для патогенов последовательности, часто по-разному реагируют с реагентами для их распознавания, для получения точных результатов следует, по возможности, исследовать все целевые аналиты. Должны быть определены основные аналиты, обнаруживаемые с помощью выбранного реагента. Информация об основных выявленных аналитах должна быть включена в спецификацию к реагентам. Те аналиты, которые наиболее чувствительны к параметрам реагентов, должны быть определены, и информация об этом должна быть приведена в спецификации к реагентам. Для исследования на выявление патогенов следует включать слабоположительные образцы, например, с концентрацией, соответствующей LOD, или с числом копий последовательности, эмпирически установленным на нижней границе диагностического диапазона. Также можно использовать ранее отрицательные образцы, загруженные определенным количеством копий последовательности ДНК/РНК.

Аналитическая специфичность может быть установлена и с помощью различных исследований. Ниже перечислены рутинные исследования, позволяющие установить аналитическую специфичность и чувствительность. Аналитическая специфичность исследования — это его способность обнаруживать и идентифицировать только предполагаемые последовательности или биомаркеры. Подход к определению специфичности заключается в том, что исследование должно обнаружить предполагаемую мишень в пределах заданного диапазона. Способность исследования обнаруживать и идентифицировать СО, содержащие предполагаемые целевые последовательности в различных концентрациях (например на уровне или вблизи LOD, в два-три раза выше LOD), является подходом в сочетании с другими исследованиями (например, перекрестной реактивностью) для демонстрации специфичности.

В мультиплексных молекулярных исследованиях, основанных на ПЦР, относительные концентрации праймеров и зондов должны быть сбалансированы и оптимизированы, чтобы обеспечить обнаружение каждой целевой последовательности, максимизируя эффективность амплификации и минимизируя вторичные структуры, например, петли и псевдоузлы, чтобы оптимизировать обнаружение продукта.

В ПЦР, чтобы сбалансировать конкурентные реакции, эффективность может быть увеличена путем оценки каждого отдельного параметра в отношении накопления продуктов амплифиакации. Взаимодействие зондов можно измерить с помощью моно- и мультиплексных реакций с одними и теми же наборами зондов; интенсивность сигнала и пороговую линию пересечения можно сравнить, чтобы выявить эффекты, возникающие при использовании праймеров и зондов в мультиплексных реакциях.

5.2.2 Предел холостой пробы

Термин «предел холостой пробы» — это значение наивысшего результата измерения, который может наблюдаться для холостой пробы (отрицательного образца). Сигнал может наблюдаться в отсутствие какого-либо аналита. Обычно это вызвано димеризацией праймеров. Димеризация праймеров может происходить с большей вероятностью по мере увеличения числа пар праймеров в реакции. Чтобы свести к минимуму образование праймеров-димеров, необходимо отбирать последовательности праймеров, не имеющие гомологии на 3′ конце среди всех праймеров в реакции; также рекомендуется наличие *G* или *C* на 3′ конце праймеров, что повышает «липкость» праймера и предотвращает «дыхание» концов, увеличивая эффективность праймирования. «Дыхание» ДНК происходит, когда концы остаются не «отожженными» и расходятся или расщепляются. Существуют модифицированные полимеразы, которые предотвращают неспецифическую амплификацию до тех пор, пока не активируются и не включаются в реакцию после первоначальной инкубации при высокой температуре.

Носитель должен быть включен в холостую пробу, поскольку отрицательные образцы, не содержащие нуклеиновой кислоты, не позволяют оценить контаминацию на низком уровне из-за отсутствия эффекта носителя.

Примечание — Хорошо разработанные методы амплификации нуклеиновых кислот на основе зондов не будут иметь сигнала в отсутствие мишени и, следовательно, не будут иметь фонового сигнала.

5.2.3 Перекрестная реактивность

Для определения перекрестных реакций мультиплексного исследования с аналитами, отличными от тех, для измерения которых оно предназначено, необходимо использовать панель близкородственных организмов/аллелей. Праймеры/зонды должны быть разработаны с учетом видовой специфичности. В исследованиях на выявление вирусов праймеры/зонды должны быть разработаны таким образом, чтобы исключить случайную перекрестную реакцию с последовательностями геномной ДНК человека и бактерий. В процессе разработки необходимо провести *in silico* исследование, включая поиск в базе данных нуклеиновых кислот, для подтверждения видовой специфичности, исключающей возможность случайной перекрестной реакции с человеком и бактериями.

При мультиплексном определении патогенов следует оценить влияние клинически значимых сопутствующих инфекций, чтобы убедиться, что они не влияют на результаты исследования ни для одного из патогенов, выявляемых с помощью исследования. Также должно быть оценено влияние образца, имитирующего клинические образцы с высоким фоновым уровнем геномной ДНК человека.

5.2.4 Исключительность

Для мультиплексного выявления целевых вариантов внутри аллелей праймеры/зонды должны быть разработаны с учетом специфичности вариантов.

5.2.5 Интерференты и контаминация

Интерферирующие вещества относятся к ингибирующим соединениям, попадающим в реакции из образца в процессе экстракции и приводящим к ложноотрицательным результатам. Возможные источники интерференции для исследования должны быть определены, и влияние каждого из них должно систематически оцениваться в ходе верификации и валидации. Риск переноса загрязнения (контаминации) должен оцениваться на каждом этапе исследования. Контроль отсутствия матричной ДНК должен быть включен в каждый цикл, если это необходимо.

Выбор интерферирующих веществ, эндогенных и экзогенных, зависит от типа образца и этапов его обработки или предварительного изучения перед исследованием.

Контаминация — признанная проблема массового параллельного секвенирования генома человека, предназначенного для выявления вариантов с низкой аллельной нагрузкой. При разработке исследования должны быть предусмотрены процедуры, позволяющие избежать контаминации одного образца другим. Биоинформатические подходы могут быть использованы для обнаружения контаминации образцов человек — человек и контроля их передачи.

Примечание — При массовом параллельном секвенировании генома человека значительное влияние оказывают повторяющиеся последовательности и псевдогены. В случае сильно фрагментированной ДНК короткие считывания могут быть неправильно выровнены, если они происходят от псевдогенов, что даст ложноположительные результаты. Псевдогены и последовательности с высокой повторяемостью могут снижать количество целевых прочтений за счет истощения количества зондов для захвата.

5.3 Диапазон достоверного результата, диапазон сообщаемых результатов исследования и референсный диапазон

Определение диапазона достоверного результата, такого как LOD и линейный диапазон в мультиплексном молекулярном исследовании, должно быть обеспечено в ходе верификации и валидации. Метод будет применим только в этом диапазоне. Результат для аналита должен быть валидным в пределах диапазона достоверного результата.

Перекрестные результаты должны быть установлены эмпирически. Если критерии используют для определения диапазона аналитов, исследуемых мультиплексной молекулярной тест-системой, они должны быть проверены в исследованиях перекрестной реактивности и соответствующих аналитических оценках, таких как оценка LOD и прецизионности.

Диапазон сообщаемых результатов исследования — это диапазон всех результатов обследования, которые считают достоверными. Референсный диапазон — это диапазон нормальных значений. Диапазон сообщаемых результатов и референсный диапазон должны определяться в зависимости от предполагаемого использования.

Примечание — В мультиплексных молекулярных исследованиях генома человека, основанных на массовом параллельном секвенировании, референсный диапазон включает варианты, которые считают доброкачественными или непатогенными, в дополнение к референсному геному человека, который представляет собой компиляцию нескольких геномов здоровых людей.

5.4 Предел обнаружения мультиплексной молекулярной тест-платформы

В случае мультиплексных молекулярных исследований LOD следует оценивать, по возможности, для всех мишеней в рамках исследования. Если возможно, следует определить LOD для каждой основной мишени. При выборе подходящих мишеней для исследования LOD критерием отбора должна быть распространенность или сложность обнаружения. В число целевых последовательностей должны входить, по крайней мере, наиболее распространенные и наиболее сложные для обнаружения. Для остальных мишеней следует выбрать самую низкую концентрацию целевого аналита, которая может быть стабильно обнаружена в ≥ 95 % измерений образцов.

Использование предела обнаружения мультиплексной молекулярной тест-платформы (LODP) следует рассматривать вместо LOD, когда целевые последовательности состоят из смеси последовательностей, которые должны и не должны быть обнаружены, независимо от используемой платформы.

В мультиплексных молекулярных исследованиях не всегда возможно определить LOD для каждой исследуемой мишени. Если требуется определить LOD отдельных мишеней, допускается использовать внешний контрольный образец (или СО) для определения предела LOD репрезентативных мишеней на данной платформе. Количество каждого аналита, подлежащего обнаружению, должно быть выше LODP.

LODP связан с аналитической частью, качеством/количеством аналита и абсолютной LODP метода обнаружения. Эти значения должны быть подтверждены путем межлабораторных сличений с использованием соответствующих СО и контрольных материалов, а самый низкий уровень внешнего образца сравнения (или СО), полученный экспериментальным путем, должен иметь коэффициент ложноотрицательных результатов менее или равный 5 %.

В процессе оценки эффективности, включая определение LOD, необходимо оценить любую перекрестную реактивность между праймерами/зондами, используемыми в системе. Критерии приемлемости оценки эффективности должны включать описание, которое всесторонне рассматривает всю систему исследования, включающую детекцию отдельных аналитов.

Примечание 1 — NMIJ CRM 6204-a доступен в качестве примера внешней оценки качества, который может быть универсально использован для определения экспрессии РНК.

Примечание 2 — Если соответствующие СО или контрольные материалы недоступны, в качестве СО используют альтернативные варианты, такие как международно признанные калибраторы или рабочие калибраторы, подготовленные лабораториями и производителями своими силами. Лаборатория должна гарантировать взаимозаменяемость любого СО, используемого для целей валидации.

5.5 Прецизионность и неопределенность измерений

При установлении прецизионности необходимо учитывать такие источники вариабельности, как оборудование, лаборатория, оператор, концентрация образца, источник образца, партия реагента, цикл измерений, день и время суток, если это имеет значение.

Установление прецизионности должно включать сложные образцы, например, с концентрациями близкими к LOD (например, в два-три раза превышающими LOD) или близкими к клиническому пределу.

При проведении исследований на повторяемость должны быть представлены редкие аллели, чтобы обеспечить возможность точного определения их присутствия. При каждом исследовании на повторяемость следует включать обоснованное количество вариантов редких аллелей.

Панель воспроизводимости должна включать каждый аналит.

Для качественных исследований, имеющих в основе количественные результаты, прецизионность можно измерить с помощью коэффициентов вариации (CV) для каждого источника вариации и исследования компонентов дисперсии для общей вариации. С этой целью следует использовать образцы, содержащие аналиты, измеряемые в мультиплексных молекулярных исследованиях, а также, по крайней мере, несколько образцов, не содержащих все мишени/аналиты.

Примечание 1 — Использование CV не подходит для методов NAAT, в которых используют произвольные флуоресцентные единицы, такие как Cq/Ct. CV также не подходит с математической точки зрения для измерений нуклеиновых кислот, которые следуют логарифмически нормальному распределению.

MU можно определить как предполагаемый диапазон значений, в котором находится истинное значение измерения. Для качественных испытаний, имеющих в основе количественные результаты, MU может быть оценена на основе информации о прецизионности и смещении, полученной при исследованиях, проведенных при верификации метода.

В мультиплексных молекулярных исследованиях не всегда возможно определить MU для каждой исследуемой мишени. Если требуется определить MU для отдельных мишеней, допускается использовать внешний образец сравнения (или СО) для определения MU для репрезентативных мишеней на данной платформе. Совокупная MU исследования должна быть больше, чем MU каждой мишени.

Примечание 2 — Практическое руководство по оценке MU приведено в [9].

5.6 Точность и сравнение методов ее определения

Точность включает в себя различные элементы, такие как аналитическая/диагностическая чувствительность и специфичность, положительное прогностическое значение (PPV) и отрицательное прогностическое значение (NPV), процентное совпадение, частота ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Аналитические характеристики исследования следует сравнивать с установленным референтным методом или другим валидированным медицинским изделием IVD для молекулярных исследований и/или исследовать с использованием СО. Они должны быть установлены путем соответствующего статистического анализа набора данных, полученных в ходе надлежащим образом разработанного протокола исследования. Для определения точности как на уровне отдельного аналита, так и всей системы в целом, должны быть выбраны соответствующие методы анализа данных и референтные методы.

Примечание 1 — При использовании материала, не являющегося СО для сравнения при оценке нового метода исследования невозможно напрямую рассчитать чувствительность и специфичность. Такие же вычисления могут применяться, когда оценки называются процентом совпадения положительных результатов (PPA) и процентом совпадения отрицательных результатов, а не чувствительность и специфичность.

Аналитическая/диагностическая чувствительность/PPV для некоторых мишеней/аллелей мультиплексной панели часто бывает неоднозначной. В таких случаях для разработки теста необходимо получить как можно больше положительных образцов для сравнения методов, а также получить дополнительные данные с использованием альтернативного источника образцов. Дополнительные данные могут быть приведены в публикациях, в которых изучалась диагностическая чувствительность данного теста для этих редких мишеней.

В случае массового параллельного секвенирования для каждого зарегистрированного класса вариантов (т. е. *SNVs*, *indels*, *CNAs*, *SVs*) должны быть установлены и задокументированы показатели PPA и PPV, если это необходимо.

Примечание 2 — В некоторых протоколах (отчетах) описаны схемы применения необходимого минимального количества образцов для мультиплексного молекулярного исследования, включая валидацию/верификацию результатов массового параллельного секвенирования, при анализе с 95 %-ной достоверностью и 95 %-ной надежностью, которые не описаны в настоящем стандарте [6], [7].

Приложение А
(справочное)

Сертифицированные стандартные образцы (ССО)

А.1 Использование сертифицированных стандартных образцов нуклеиновых кислот

А.1.1 Общие сведения

Более подробное описание использования ССО и СО приведено в [10].

А.1.2 Проверка результатов оценки и неопределенность измерений

Оценка смещения (разницы между измеренным и истинным значением) является одним из наиболее сложных элементов верификации результатов исследования, однако информация о неопределенности сертифицированных значений СО может быть важна для оценки неопределенности результатов валидируемого исследования. Несмотря на то, что рекомендовано применение СО с метрологически прослеживаемыми сертифицированными значениями, оценка различий в смещениях между результатами двух или более исследований может быть установлена с помощью СО, сертификация которых выполнена без указания прослеживаемости. Очевидно, что СО должны соответствовать задаче исследования, например, по типу матрицы, концентрации аналита. Рекомендуется исследовать несколько СО, охватывающих весь диапазон, в котором проводят исследования. Если проверяют незначительные модификации хорошо зарекомендовавшей себя методики исследования, допускается использовать менее жесткие критерии оценки смещения.

Повторные измерения СО, охватывающие весь диапазон влияющих факторов, допустимых в валидируемом исследовании, могут быть использованы для оценки неопределенности, связанной с любым смещением, которое будет откорректировано.

Проверяют, чтобы неопределенность, связанная с СО, не превышала одной трети от неопределенности результата измерения образца.

А.1.3 Калибровка

Как правило, для калибровки на аналитическом этапе используют СО чистых веществ. Другие этапы исследования, такие как ферментативная обработка образца, его разделение и дериватизация, не учитывают, а потери содержания аналита, контаминацию, интерферирующие факторы и связанные с ними вклады в неопределенность рассматривают как часть критериев верификации исследования. Неопределенность, связанная с чистотой СО, вносит вклад в общую MU. Например, СО, сертифицированное значение чистоты которого 99,9 %, с расширенной неопределенностью U (k = 2), равной 0,1 %, будет вносить составляющую неопределенности 0,1 % в бюджет MU. Если оценивают следовые количества веществ этот уровень неопределенности редко важен, но для аналитических исследований его значение может быть существенным.

В некоторых исследованиях, основанных на спектроскопическом анализе, таких как рентгенофлуоресцентный анализ (XRF), матричные СО используют для калибровки всего аналитического этапа. Помимо близкого соответствия матрицы, структура аналита в образцах и СО должна быть одинаковой, а аналитические концентрации СО должны соответствовать концентрациям в образцах.

Дополнительная информация приведена в [10] и [13].

А.1.4 Контроль качества и обеспечение качества

Для внутреннего КК требование о наличии сертифицированных значений свойств может быть смягчено, но при этом важны достаточная однородность и стабильность. Аналогичные требования предъявляют к образцам, используемым для определения того, насколько хорошо или плохо согласуются результаты измерений, выполненных в разных лабораториях. При проведении внешней оценки качества важна однородность, стабильность образцов также оценивают и контролируют в течение всего периода проведения мероприятия. Несмотря на то, что рекомендуется проведение данного контроля, однако, высокая стоимость подтверждения значений свойств образцов при проведении внешней оценки качества часто не позволяет его провести, и вместо данного контроля используют средние значения, принятые на основе консенсуса. Как следствие, часто остаются сомнения в надежности приписанных значений, используемых в схемах проведения внешней оценки качества. Это связано с тем, что, несмотря на то, что консенсусное среднее значение набора данных имеет определенное значение, «большинство» не обязательно верно, и, как следствие, значения несут в себе некоторый скрытый элемент неопределенности. Таким образом, интерпретацию данных внешней оценки качества необходимо проводить с осторожностью. Организации, проводящие испытания в рамках оценки квалификации и отвечающие требованиям [12], должны учитывать неопределенность при обработке результатов.

А.2 Оценка пригодности стандартных образцов

Как указывалось ранее, ключевым параметром качества является неопределенность, связанная с сертифицированным значением СО, и надежность оценки неопределенности. Уровни неопределенности вычисляют, учитывая значения величины, полученные при «сертификации» СО, указанные вместе с расширенной неопределенностью U, с использованием коэффициента охвата k = 2 и достоверностью приблизительно 95 %.

Однако полные данные о неопределенности часто недоступны, поэтому следует рассмотреть другие критерии качества. Кроме того, неспециалист может оказаться не в состоянии в полной мере оценить данные, полученные при «сертификации», и рекомендуется иметь перечень КК или подтверждения качества третьей стороной. Такие системы находятся в стадии разработки, но на их полное внедрение потребуется некоторое время.

А.3 Сертификаты и подтверждающие отчеты

Рекомендуется иметь сертификат в соответствии с [13] и отчет о процессах определения характеристик, сертификации и статистического анализа в соответствии с [14]. Однако многие СО, особенно старые материалы и материалы, специально не производимые как СО, не могут полностью соответствовать [14] и [15]. Альтернативная, эквивалентная информация в любой доступной форме, которая обеспечивает достоверное подтверждение соответствия, может считаться приемлемой. В качестве примера можно привести следующие документы: технические отчеты, торговые спецификации, статьи в журналах или отчеты о научных совещаниях, а также переписку с поставщиками.

Приложение В
(справочное)

Пример стандартных образцов состава генома человека

В.1 Использование образцов состава генома человека

Более подробное описание использования ССО и СО приведено в [10].

Протокол оценки пригодности образцов состава генома человека (hGMs) подробно представлен на рисунке В.1. Предполагается, что пользователь должен оценить пригодность и соответствие цели любого СО на основе требований заказчика и аналитических требований. Необходимо учитывать следующие факторы:

a) пригодность hGMs зависит от деталей аналитической спецификации. Важными могут быть матричные эффекты и другие факторы, такие как фрагментация. К числу факторов, которые необходимо учитывать, относятся:

1) измеряемая величина, включая аналит,
2) диапазон измерений (точность определения нуклеотида и/или глубина прочтения),
3) идентичность матриц и потенциальные интерферирующие факторы,
4) размер выборки,
5) однородность и стабильность,
6) комбинированная MU в мультиплексном анализе,
7) методики приписывания значения (измерительные и статистические);

b) достоверность данных о неопределенности, включая соответствие ключевых процедур [14] и [15];

c) отчетные записи как производителя, так и о материале. Например, о применении используемого hGM при проведении межлабораторных сличений, перекрестной проверке с использованием различных методов или об опыте использования в нескольких лабораториях в течение нескольких лет;

d) наличие отчета, соответствующего [13].

Все или некоторые требования рекомендуется указывать в спецификации заказчика и аналитической спецификации, но часто от аналитика требуется профессиональное заключение.

Наконец, качество не обязательно равнозначно малой неопределенности, поэтому необходимо использовать критерии соответствия поставленной цели.

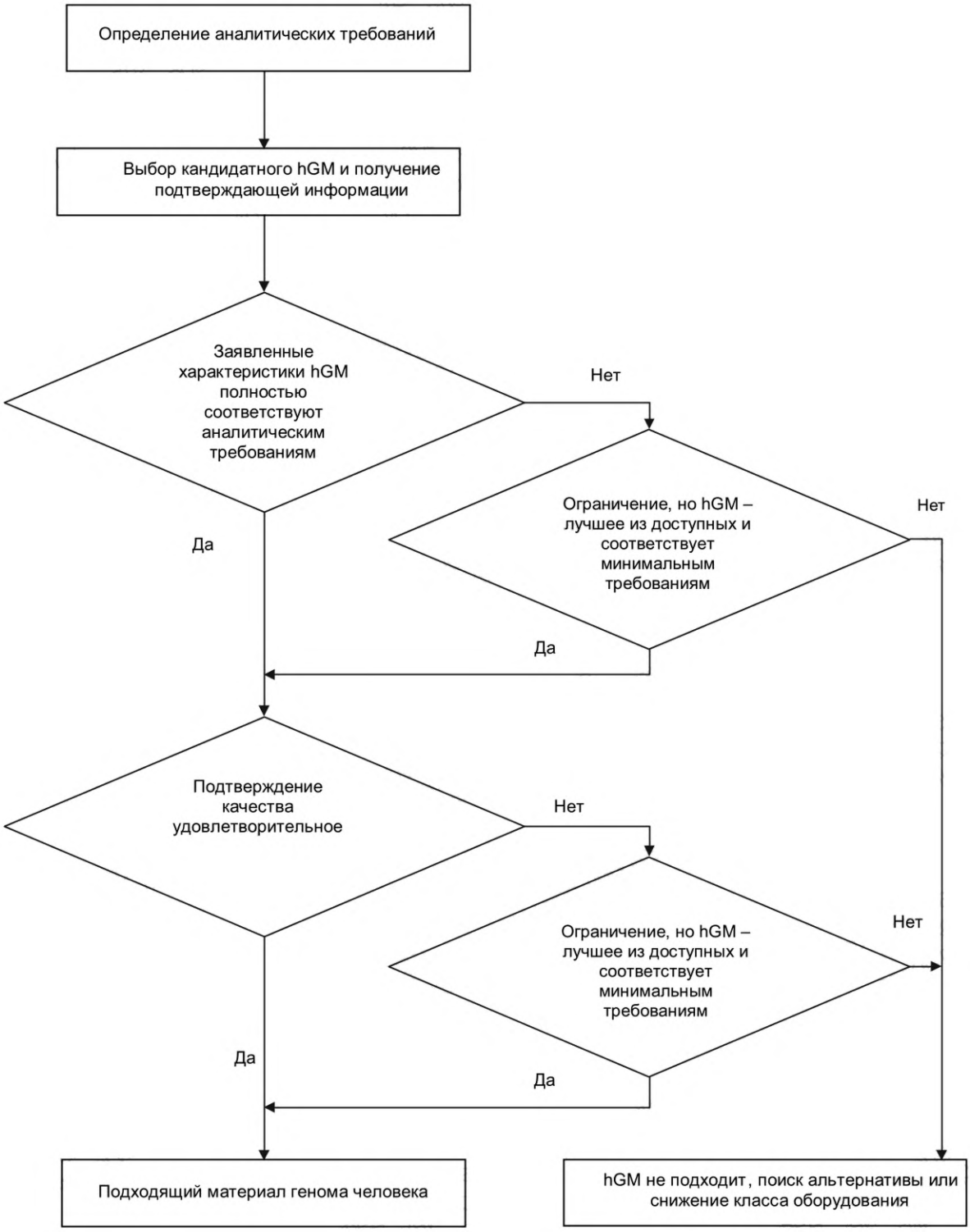

Рисунок В.1 — Оценка пригодности материала генома человека

В.2 Сертификаты и подтверждающие отчеты

В.2.1 Сертификаты и подтверждающие отчеты

Рекомендуется иметь сертификат в соответствии с [13] и отчет о процедурах определения характеристик, сертификации и статистического анализа в соответствии с [14]. Однако многие СО, особенно старые материалы и материалы, специально не производимые как СО, не могут быть полностью приведены в соответствие с [13] и [14]. Альтернативная эквивалентная информация в любой доступной форме, которая предоставляет достоверные

доказательства соответствия, может считаться приемлемой. В качестве примера можно привести следующие документы: технические отчеты, торговые спецификации, статьи в журналах или отчеты о научных совещаниях, а также переписку с поставщиками.

B.2.2 Оценка пригодности материалов генома человека

Лаборатории должны объяснить и обосновать как основу отбора всех hGM и в обязательном порядке любые решения по неиспользованию нелегальных hGM. В отсутствие конкретной информации невозможно оценить качество hGM. Объем критериев оценки зависит от критичности измерений, уровня технических требований и ожидаемого влияния конкретного hGM на достоверность измерения. Формальная оценка пригодности ожидается только в том случае, если выбор hGM существенно влияет на результаты измерений.

B.3 Внутренняя подготовка материалов для генома человека

Высококачественные hGMs требуют больших усилий и затрат, и если материалы доступны из других источников, то обычно лаборатории нерентабельно делать свои собственные. Однако, если это необходимо, существуют руководства, которые помогут неспециалистам подготовить собственные hGMs.

Необходимо рассмотреть следующие ключевые вопросы:

- выбор материалов, например соответствие, выбор натурального материала по сравнению с материалом с добавками, подготовка материала;
- проверка однородности, подготовка и упаковка, например однородность, загрязнение, стабильность;
- исследование стабильности, сертификационные исследования, оценка неопределенности, документирование и контроль качества, хранение и распространение.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов национальным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего национального стандарта
ISO 15189	IDT	ГОСТ Р ИСО 15189—2024 «Медицинские лаборатории. Требования к качеству и компетентности»
ISO 21474-1	IDT	ГОСТ Р ИСО 21474-1—2021 «Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Мультиплексные молекулярные методы для определения содержания нуклеиновых кислот. Часть 1. Терминология и общие требования к оценке качества нуклеиновых кислот»
Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов: - IDT— идентичные стандарты.		

Библиография

[1] ISO 18113-1:2009*, In vitro diagnostic medical devices — Information supplied by the manufacturer (labelling) — Part 1: Terms, definitions and general requirements

[2] CLSI, Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid Assays Approved Guideline CLSI document MM17-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008

[3] ISO 22174:2005, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions

[4] ISO 21571, Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction

[5] ISO 16578, Molecular biomarker analysis — General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences

[6] Jennings LJ et al., Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. Mol Diagn. 2017 May; 19(3): 341—365.

[7] Mattocks CJ et al., A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. Eur J Hum Genet. 2010; 18(12):1276—88.

[8] Aziz N et al., College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. Arch Pathol Lab Med. 2015 Apr; 139(4):481—93.

[9] ISO/TS 20914:2019, Medical laboratories — Practical guidance for the estimation of measurement uncertainty

[10] ISO Guide 33:2015, Reference materials — Good practice in using reference materials

[11] ISO 17511:2020, In vitro diagnostic medical devices — Requirements for establishing metrological traceability of values assigned to calibrators, trueness control materials and human samples

[12] ISO/IEC 17043, Conformity assessment — General requirements for proficiency testing

[13] ISO Guide 31:2015, Reference materials — Contents of certificates, labels and accompanying documentation

[14] ISO Guide 35:2017, Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability

[15] ISO Guide 98-3, Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995)

[16] ISO 20395, Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR

[17] ISO 17822, In vitro diagnostic test systems — Nucleic acid amplification-based examination procedures for detection and identification of microbial pathogens — Laboratory quality practice guide

* В настоящее время действует ISO 18113-1:2022 «*In vitro* diagnostic medical devices — Information supplied by the manufacturer (labelling) — Part 1: Terms, definitions, and general requirements» («Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставленная изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования»).

УДК 57.085.2:006.354 ОКС 11.100.10

Ключевые слова: изделия медицинские для диагностики *in vitro*, ИВД, мультиплексные молекулярные методы, нуклеиновые кислоты, валидация, верификация

Редактор *Е.Ю. Митрофанова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *С.И. Фирсова*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 26.03.2026. Подписано в печать 15.04.2026. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,32.

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