|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Федеральное агентство**  **по техническому регулированию И МЕТРОЛОГИИ** | | |
|  | **национальныЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ** | **ГОСТ Р**  **ИСО 21474-1–**  **202Х**  *(проект,*  *первая редакция)* |

**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**

**(ISO 21474-1:2020, IDT)**

*Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия*

**Москва**

**Стандартинформ**

**202Х**

# Предисловие

1. ПОДГОТОВЛЕН Ассоциацией специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»),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 20 г. №
4. Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ИСО 21474-1:2020 «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» (ISO 21474-1:2020 «Dispositifs medicaux de diagnostic in vitro-Tests moleculaires multiplex pour les acides nucleiques — Partie 1: Terminologie et exigencesgenerales pour revaluation de la qualite des acides nucleiques», IDT).

Международный стандарт разработан Техническим комитетом ISO/TC 212 «Клинические лабораторные испытания и диагностические тест-системами ин витро»

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

1. 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 (*[*www.gost.ru*](http://www.gost.ru/)*)*

© ISO, 2020 – Все права сохраняются

Стандартинформ, оформление, 2020

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**

[Предисловие II](#_Toc58534027)

[Введение IV](#_Toc58534028)

[1 Область применения 1](#_Toc58534029)

[2 Нормативные ссылки 2](#_Toc58534030)

[3 Термины и определения 2](#_Toc58534031)

[4 Общие вопросы 11](#_Toc58534032)

[Приложение А](#_Toc58534033) [(информативное)](#_Toc58534034) [Оценка целостности РНК 24](#_Toc58534035)

[Приложение Б](#_Toc58534036) [(информативное)](#_Toc58534037) [Оценка целостности ДНК](#_Toc58534038)

[Приложение В](#_Toc58534039) [(информативное)](#_Toc58534040) [Использование ПЦР для оценки амплифицируемой ДНК из образ 26](#_Toc58534041)

[Приложение Г](#_Toc58534042) [(информативное)](#_Toc58534043) [Образец микро РНК 29](#_Toc58534044)

[Библиография 30](#_Toc58534045)

# Введение

В первом поколение таких медицинских изделий, как тесты для молекулярной диагностики, основанные на детекции нуклеотидных последовательностей, в качественном или количественном формате определялась единственная последовательность (например, вирусной РНК, мРНК или геномной ДНК) в биологическом образце. В мультиплексных молекулярно-биологических тестах в одной пробирке определяют сразу несколько нуклеотидных последовательностей, представляющих интерес. По мере развития технологий и выявления клинической значимости новых биомаркеров, активно разрабатывают и внедряют в клиническую практику новые мультиплексные диагностические тесты.

Измерение нескольких анализируемых последовательностей обычно состоит из следующих последовательных или одновременных этапов. Образцы собирают, транспортируют и хранят, после чего из них выделяют нуклеиновые кислоты ~~с~~ последующей очисткой или без неё. Затем измеряют количество нуклеиновых кислот и оценивают качество (при необходимости), разбавляют (при необходимости) и выполняют мультиплексные молекулярные тесты. В современной клинической практике мультиплексные тесты направлены на детекцию специфических ДНК- или РНК-мишеней с помощью мультиплексных ПЦР- технологий, микрочипов, а также методов, основанных на масс-спектрометрии или массовом параллельном секвенировании.

Существующие требования к качеству нуклеиновых кислот для молекулярного анализа с единственной мишенью (к примеру, для моноплексной ПЦР) не всегда применимы к мультиплексным молекулярным тестам. Вследствие конкуренции за несколько нуклеотидных мишеней, мультиплексные методы более чувствительны к качеству и количеству выделенных нуклеиновых кислот, чем методы с единственной мишенью. Разнообразие биологических, физических и химических свойств каждого образца на мультиплексный анализ будет влиять сильнее, чем на анализ с единственной мишенью. Это может приводить к ненадёжным результатам и затруднять ход лечения. Таким образом, к оценке качества образцов для мультиплексных молекулярных тестов следует подходить с особенным вниманием.

Сбор, транспортировка и подготовка образцов для медицинских лабораторий рассматривались в национальных и международных документах — в частности, в стандарте ISO/TS 20658 «Лаборатории медицинские. Требования к забору, транспортировке, приему образцов и обращению с ними» [3], «Руководство по контролю качества образцов для молекулярных методов. Сбор, транспортировка и пробоподготовка образцов» (Япония, JCCLS) [4], «Руководство по контролю качества образцов для молекулярных методов (Часть 2). Новые технологии и контроль качества образцов» (Япония, JCCLS) [5], и для конкретных типов биологических образцов — в серии международных стандартов ISO 20166, 20184 и 20186 [6], [7], [8].

Настоящий документ описывает терминологию и общие требования к качеству нуклеиновых кислот, используемых в мультиплексных молекулярных тестах, с целью обеспечения воспроизводимости результатов таких тестов.

Примечание: методические указания, требования и критерии эффективности, изложенные в настоящем документе, предназначены, чтобы обеспечить получение сопоставимых, точных и воспроизводимых результатов в разных лабораториях.

национальный стандарт Российской федерации

**Изделия медицинские для диагностики in vitro. Мультиплексные молекулярные методы для определения содержания нуклеиновых кислот.**

**Часть 1.**

**Терминология и общие требования к оценке качества нуклеиновых кислот**

Dispositifs medicaux de diagnostic in vitro-Tests moleculaires multiplex pour les acides nucleiques — Partie 1: Terminologie et exigencesgenerales pour revaluation de la qualite des acides nucleiques

**Дата введения – 2020–\_\_–\_\_**

# 1 Область применения

Настоящий документ содержит условия и общие требования к оценке качества нуклеиновых кислот, аналитов мультиплексных молекулярных тестов~~,~~ в ходе которых идентифицируют не менее двух целевых нуклеотидных последовательностей. Настоящий документ применим ко всем мультиплексным молекулярным методам, используемым для исследования с использованием медицинских изделий для диагностики *in vitro* и тестам LDT\*. Документ содержит информацию как для качественного, так и для количественного определения целевых нуклеотидных последовательностей.

Настоящий документ представляет собой руководство по мультиплексным молекулярным методам, которые позволяют обнаружить или количественно охарактеризовать целевые нуклеотидные последовательности человека или патогенных микроорганизмов, выделенных из биологических образцов человека. Настоящий документ применим к любому диагностическому молекулярному исследованию in vitro, проводимому в медицинской лаборатории, а также предназначен для заказчиков услуг лабораторий, разработчиков и производителей в области лабораторной диагностики, биобанков, учреждений и коммерческих организаций, осуществляющих биомедицинские исследования и вышестоящих организаций. Этот документ не применим к исследованиям в области метагеномики~~.~~

Примечание: процедура исследования, разработанная в лаборатории для внутреннего использования, обычно называется «тест, разработанный в лаборатории» (LDT, laboratory developed test) “in-house test”.

# 2 Нормативные ссылки

Cледующие документы упоминаются в тексте таким образом, что их содержание или его часть составляют требования настоящего документа. Для датированных ссылок применяется только цитируемое издание. Для недатированных ссылок применяется последняя редакция ссылочного документа (включая любые поправки).

ИСО 15189: 2012, *Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.*

# 3 Термины и определения

В настоящем стандарте используются следующие термины с соответствующими определениями.

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

* Платформа онлайн-просмотра ИСО: <http://www.iso.org/obp>
* Электропедия МЭК: <http://www.electropedia./org>

**3.1 точность (accuracy):** Близость соответствия между измеренным значением и истинной величиной мезюранда

Примечание 1: термин «точность» применительно к совокупности результатов испытаний включает совокупность случайной составляющей и общей систематической ошибки или компонента смещения (ИСО 3534-2:2006, 3.3.1).

[Источник: руководство ИСО/МЭК 99: 2007, 2.13, изменено — “Примечание 1”, “примечание 2” и “Примечание 3” были удалены, и было добавлено новое "Примечание 1 к записи".]

ГОСТ Р ИСО 3534-2-2019 3.3.1 точность: Степень близости результата испытаний (3.4.1) или измерений (3.4.2) к истинному значению (3.2.5).

Примечание 1 - На практике истинное значение заменяют принятым опорным значением (3.2.7).

Примечание 2 - При применении к набору результатов испытаний или измерений, "точность" включает комбинацию случайных компонент и общей систематической ошибки или смещения.

Примечание 3 - Точность связана с комбинацией правильности (3.3.3) и прецизионности (3.3.4) измерений.

**3.2 алгоритм** (algorithm)**:** Набор правил или вычислений, которые применяются к результатам исследования, чтобы сформировать интерпретируемый или подлежащий регистрации результат

**3.3 аллель** (allele)**:** <генетика> любая из нескольких форм гена, ответственного за наследственную изменчивость

Примечание 1 к записи: аллель также может быть определен как:

1. одна из альтернативных форм полиморфной последовательности ДНК, которая не обязательно содержится в гене;
2. одна из альтернативных форм гена, которая может занимать данный локус.

**3.4 соотношение аллелей** (allelic ratio)

<отношение встречаемости> данного *аллеля* ([3.3](#bookmark11)) к общему числу *аллелей* <в популяции> ([3.3](#bookmark11)), обычно выраженное в виде дроби

Примечание 1: например, если данный *аллель* ([3.3](#bookmark11)) составляет 40% от общего числа *аллелей* ([3.3](#bookmark11)), в данном локусе, аллельное соотношение составляет 0,4.

Примечание 2: Аллельное соотношение является синонимом частоты аллелей.

**3.5 аналит** (analyte)**:** компонент, представленный в названии измеряемой величины

[источник: ИСО 17511: 2020, 3.1, изменено-пример был удален.] (ПНС 2021)

**3.6 химическая чистота** (chemical purity)**:** Степень загрязнения химическими веществами, влияющими на мультиплексный анализ

Примечание 1: чистота нуклеиновой кислоты для ПЦР — отсутствие органических и белковых примесей, прошедших стадию экстракции, а также отсутствие контаминирующих нуклеиновых кислот.

**3.7 метод ДНК-микрочипов** (DNA microarray DNA chip)**:**

твердый субстрат, на который напрямую или опосредованно наносится смесь проб ДНК, что позволяет исследовать большое количество биологического материала с использованием высокопроизводительных методов скрининга

[ИСТОЧНИК: ИСО 16578: 2013, 3.3] (имеется аутентичный перевод ГОСТ отсутствует)

**3.8 документированная процедура** (documented procedure)**:**

определенный способ проведения деятельности или процесса, который документируется, реализуется и поддерживается системой межлабораторного сличения ([3.13](#bookmark27))

**3.9 метод оценки качества** (evaluation method) **:**

способ оценки качества для заданной нуклеиновой кислоты

**3.10 срок годности** (expiry date expiration date)**:**

верхний предел временного интервала, в течение которого при хранении материала в определенных условиях могут быть гарантированы его функциональные характеристики.

Примечание

1 Сроки годности, приписанные реагентам([3.16](#bookmark32" \o "Current Document)), калибраторам, контрольным материалам и другим компонентам, основаны на свойствах стабильности, определенных опытным путем

[Источник: ИСО 18113-1: 2009, 3.17, изменено — “примечание 2 к записи” и "Примечание 3 к записи" были удалены.]

**3.11 внешний стандарт измерения, референсный стандарт** (external measurement standard, reference standard)

материал или субстрат, подготовленный для проверки совместимости методов мультиплексного анализа, значения свойств которого выводится как консенсусное значение на основе совместной экспериментальной работы при содействии научной или технической группы

Примечание 1: обычно речь идёт о мультиплексном молекулярном анализе.

Примечание 2: стандарт может быть использован в качестве альтернативы внешнему эталону измерений.

[Источник: ИСО 16578:2013, 3.9, изменено-добавлены “Примечание 1 к записи” и “примечание 2 к записи”.] (имеется аутентичный перевод ГОСТ отсутствует)

**3.12 предусмотренное применение, использование по назначению** (intended use, intended purpose):

Цель изготовителя изделия для диагностики *in vitro* в отношении применения продукта, процесса или услуги, отраженное в спецификациях, инструкциях и информации, предоставленной изготовителем изделия для диагностики *in vitro*.

[Источник: ИСО 18113-1: 2009, 3.31, изменено — “примечание 1 ” и "Примечание 2 " были удалены.]

**3.13 межлабораторное сличение** (interlaboratory comparison): Организация, выполнение и оценка измерений или тестирований одного и того же или нескольких подобных образцов двумя или более лабораториями в соответствии с заранее установленными условиями.

[ИСТОЧНИК: ИСО/МЭК 17043: 2010, 3.4]

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

В Российской Федерации наряду с данным термином применим термин "межлабораторные сравнительные испытания"

**3. устройство для in vitro диагностики, ИВД устройство (**in vitro diagnostic instrument, IVD instrument) –

Оборудование или прибор, предназначенный изготовителем для применения как медицинское изделие для диагностики in vitro ([3.15](#bookmark30)).

[источник: ISO 18113-1: 2009, 3.26, изменено — “Примечание 1 к записи” было исключено.]

**3.15 медицинское изделие для in vitro диагностики** (in vitro diagnostic product in vitro diagnostic medical device IVD medical device)

реагенты, инструменты и системы, предназначенные для использования в диагностике заболеваний или других состояний, включая определение состояния здоровья, с целью лечения или предотвращения заболевания или его последствий

[Источник: 21CFR809. 3 Федерального закона США о продуктах питания, лекарствах и косметике]

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

****В Российской Федерации применимтермин **медицинское изделие для диагностики** ***in vitro*** (*in vitro* diagnostic medical device): Медицинское изделие, предназначенное изготовителем для применения при исследованиях *in vitro* образцов, взятых из тела человека единственно или главным образом для получения информации, которая может быть использована для целей диагностики, мониторинга или совместимости, включающее в себя реагенты, калибраторы, контрольные материалы, емкости для сбора и хранения проб и относящиеся к ним инструменты или приборы или другие предметы.

**3.16**

**реагент для диагностики** ***in vitro*** (*in vitro* diagnostic reagent): Химические, биологические или иммунологические компоненты, растворы или препараты, предназначенные изготовителем для применения в качестве медицинского изделия для диагностики *in vitro*. ([3.15](#bookmark30))

[Источник: ИСО 18113-1: 2009, 3.28, изменено — ” Примечание 1 " было удалено.]

**3.17 тесты, разработанные лабораторией** (laboratory developed tests LDTs)

тип диагностических изделий in vitro, предназначенных для клинического применения, которые спроектированы, изготовлены и используется в рамках одной лаборатории

Примечание 1: его часто называют "внутренним тестом".

[ИСТОЧНИК: CLSI QSRLDT]

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

В Российской Федерации применение незарегистрированных медицинских изделий для клинического применения запрещено.

**3.18 предел обнаружения:** (limit of detection, LOD):

Значение измеренной величины, полученное с применением данной методики измерения, для которого вероятность ложного утверждения об отсутствии компонента в материале есть , данная вероятность ложного утверждения об его присутствии.

Примечание 1 Международный союз теоретической и прикладной химии (IUPAC) рекомендует α и β оценивать в равной мере как 0,05.

Примечание 2 это относится к ЛОД, когда тесты оценивают наличие или отсутствие нескольких *анализируемых веществ* ([3.5](#bookmark12)), а не множественный молекулярный тест ([3.26](#bookmark48)).

Примечание 3: предел обнаружения, LOD, альтернативно определяется как 1) наименьшее количество нуклеиновой кислоты, которое может быть достоверно отсеквенировано и отличено от ее отсутствия, как правило, в пределах установленного доверительного предела; 2) минимальная обнаруживаемая аллельная фракция в данном образце.

[ИСТОЧНИК: CLSI MM09 2014]

**3.19 предел обнаружения для платформы микрочипа,** **предел обнаружения для мультиплексной молекулярной тестовой платформы LODP** (limit of detection for microarray platform, limit of detection for multiplex molecular test platform,LODP)

наименьшее относительное количество *внешнего эталона измерения* ([3.11](#bookmark23)) (или референсного материала), которое может быть последовательно обнаружено экспериментально с 95%-ным уровнем достоверности при известном (определенном/оцененном) количестве копий и/или концентрации *внешнего эталона измерения* ([3.11](#bookmark23)) (или референсного материала)

Примечание 1: это обычно нацелено на мультиплексный молекулярный анализ.

Примечание 2: LODP может быть использован в качестве индикатора производительности, замененного *пределом обнаружения* ([3.18](#bookmark34)) для мультиплексного  
 анализа.

[Источник: ИСО 16578:2013, 3.9, изменено-добавлены “Примечание 1 к записи” и “примечание 2 к записи”.] (имеется аутентичный перевод ГОСТ отсутствует)

**3.20 массовое параллельное секвенирование** (massive parallel sequencing)

метод, позволяющий проводить высокопроизводительное секвенирование ДНК с использованием концепции параллельной обработки очень большого числа молекул

Примечание 1: к примеру, но не ограничиваясь ими, технологии с миниатюризированными и распараллеленными платформами для секвенирования от тысяч до миллионов коротких считываний (~50-400 баз) или полимеразная платформа для ДНК-секвенирования в реальном времени, позволяющая длительное считывание (средняя длина ~10 000-1000 баз).

**3.21 микроРНК** (microRNA)

Одноцепочечная РНК длиной от 17 до 25 нуклеотидов, относящаяся к посттранскрипционной регуляции экспрессии

**3.22 множественные последовательности аналита(ов)** (multiple sequences of analyte(s))

часть образца с несколькими последовательностями нуклеиновых кислот, измеренными одновременно

**3.23 мультиплексные молекулярные тесты** (multiplex molecular test)

диагностический тест in vitro, который одновременно оценивает идентичность последовательностей и/или количество нескольких, а именно двух или более нуклеиновых кислот-мишеней, определяемых в одной серии исследования, на основе методологий таких как *мультиплексная ПЦР* ([3.25](#bookmark46)), множественная гибридизация, микрочипы и *массовое параллельное секвенирование* ([3.20](#bookmark35))

Примечание 1 "мультиплекс" определяется как " тест, в которых две или более цели одновременно обнаруживаются с помощью общего процесса подготовки образца, амплификации целевой последовательности или сигнала, аллельной дискриминации ([3.3](#bookmark11)) и коллективной интерпретации. (CLSI/MM17-A[B4](#bookmark106)]).

Примечание 2: цели, представляющие интерес, определяются как цели обнаружения, представляющие интерес, и исключают контрольный материал из числа целей.

**3.24 мультиплексный молекулярный тест качества нуклеиновой кислоты** (multiplex molecular test quality nucleic acid)

матрица нуклеиновой кислоты, обладающая соответствующим свойством, обеспечивающим проведение мультиплексного молекулярного теста([3.23](#bookmark43)), таким как достаточная длина, количество, *химическая чистота* ([3.6](#bookmark13)), *структурная целостность* ([3.40](#bookmark65)) и наличие необходимой последовательности нуклеиновых кислот.

**3.25 мультиплексная ПЦР**

Технология ПЦР, которая использует несколько пар праймеров, объединенных в одной реакционной смеси, для получения нескольких ампликонов одновременно

[ИСТОЧНИК: ИСО 16577: 2016, 3.117] (перевод ИСО 16577отсутствует ГОСТ Р отсутствует)

**3.26 мультиплексные молекулярные тесты**

молекулярный тест, который объединяет значения нескольких переменных с помощью функции интерпретации для получения единого, специфичного для пациента результата, включая "классификацию", "оценку" и / или " индекс”

Примечание 1: это обычно основано на платформе мультиплексных молекулярных тестов.

Примечание 2: это предназначено для использования в диагностике заболеваний или других состояний, а также в лечении, смягчении, лечении или профилактике заболеваний.

Примечание 3: термин "многовариантный", используемый в статистике, подразумевает оценку нескольких результатов, а не использование нескольких переменных для оценки одного результата.

**3.27 патоген** (pathogen)

инфекционный агент, вызывающий заболевания

Примечание 1: патоген включает в себя некоторые вирусы, вироиды, прионы, бактерии, грибы или паразиты.

[Источник: ИСО 15714: 2019, 3.1.2, изменено.] (перевод отсутствует)

**3.28 качество ДНК, необходимое для проведения ПЦР**  (**PCR quality DNA)**

Матрица ДНК достаточной длины, количества, *химической чистоты* ([3.6](#bookmark13)) и *структурной целостности* ([3.40](#bookmark65)) для амплификации методом ПЦР

[Источник: ИСО24276: 2006, 3.2.3, изменено — добавлено “количество".] (имеется русскоязычная версия)

**3.29 преаналитический этап, процедуры перед исследованием,** (preanalytical phase, pre-examination procedures,)

Мероприятия, которые начинаются с назначения клиницистом исследования и включения исследования в заявку, за ними следует подготовка пациента к исследованию, взятие первичной пробы, транспортировка пробы в лабораторию и перемещение ее внутри лаборатории, выделение аналита и заканчиваются началом аналитического исследования.

[Источник: ИСО 15189: 2012, 3.15, изменено-добавлены слова "выделение анализируемых веществ".]

**3.30 первичная проба, образец** (primary sample, specimen)

Отдельная порция биологической жидкости или тканей, взятая для исследования, изучения или анализа одной или нескольких величин или свойств, которые предполагается приписать целому.

Примечание 1 Рабочая группа по глобальной гармонизации использует термин "образец" в руководящих документах по гармонизации, обозначая пробу биологического происхождения, предназначенную для исследования в медицинской лаборатории.

Примечание 2 В некоторых документах ИСО и СЕН "образец" определен как "биологическая проба, взятая из тела человека".

Примечание 3 В некоторых странах термин "образец" используется вместо первичной пробы (или ее порции), которая является пробой, подготовленной для пересылки в лабораторию (или получаемую лабораторией) и предназначенную для исследования.

[ИСТОЧНИК: ИСО 15189: 2012, 3.16]

**3.31 диапазон уверенного сигнала** (range of reliable signal)

способность (в пределах заданного диапазона) представлять результаты, прямо пропорциональные концентрации и/ или числу копий *внешнего стандарта* ([3.11](#bookmark23)) (или референсного материала)

Примечание 1: это используется в основном для количественных, но не качественных тестов.

Примечание 2: также используется линейный диапазон или аналитический измеримый диапазон.

[Источник: ИСО 16578:2013, 3.9, изменено-добавлены “Примечание 1 к записи” и “примечание 2 к записи”.]

**3.32 отчетный диапазон** (reportable range)

область генома, в которой последовательность приемлемого качества может быть получена в ходе лабораторного исследования

Примечание 1 к записи: отчетной диапазон также определяется как " диапазон тестовых значений, в течение которого связь между измерительным откликом прибора, комплекта или системы оказывается действительной” (US CFR 493).

**3.33 референсный диапазон** (reference range)

диапазон вариаций последовательностей, который ожидается обнаружить в естественной популяции

**3.34 обратная транскрипция ОТ** (RT reverse transcription)

Синтез ДНК с матрицы РНК с использованием фермента обратной транскриптазы в сочетании с ОТ-праймером в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов.

[источник: ИСО 22174:2005, 3.3.1] (ГОСТ Р 52833-2007 (ИСО 22174:2005)

**3.35 ОТ-ПЦР** (RT reverse transcription)

Метод, состоящий из двух реакций: обратной транскрипции (ОТ) РНК в ДНК и последующей ПЦР [источник: ИСО 22174:2005, 3.4.2] (ГОСТ Р 52833-2007 (ИСО 22174:2005)

**3.36 качество РНК для ОТ-ПЦР** (RT-PCR quality RNA)**:**

Матрица РНК, длина и количество которой достаточны для проведения реакции обратной транскрипции ([3.34](#bookmark52)) и ПЦР

[Источник: ИСО 22174: 2005, 3.2.4, изменено.] (ГОСТ Р 52833-2007 (ИСО 22174:2005)

**3.37 проба** (sample)

Одна или несколько частей (порций), которые взяты из первичной пробы (образца).

[Источник: ИСО 15189: 2012, 3.24, изменено-пример был удален.]

**3.38 стабильность**  (stability)

способность медицинского изделия ИВД ([3.15](#bookmark30)) сохранять свои эксплуатационные характеристики в пределах, установленных изготовителем

Примечание 1: стабильность применяется к:

- Реагентам ИВД ([3.16](#bookmark32)): калибраторы и регуляторы при хранении, транспортировке и использовании в условиях, указанных изготовителем;

- Восстановленным лиофилизированным материалам, рабочим растворам и материалам, извлеченным из герметичной тары (при приготовлении, использовании и хранении в соответствии с инструкцией производителя по применению).

Примечание 2: стабильность реагента ИВД ([3.16](#bookmark32)) или измерительной системы обычно определяется относительно времени:

* длительности временного интервала, в течение которого метрологические характеристики свойство изменяется на установленную величину;
* изменения свойств в течение определенного интервала времени.

[Источник: ИСО 18113-1: 2009, 3.68, изменено - “измерительные приборы или измерительные системы после калибровки “в” Примечании 1 к записи “и” примечании 3 к записи " были исключены.]

**стабильность** (stability): Способность медицинского изделия для диагностики *in vitro* сохранять свои свойства в пределах, заданных изготовителем.

Примечания

- измерительным инструментам или измерительным системам после калибровки.

2 Стабильность реагента для диагностики *in vitro* или измерительной системы обычно вычисляют по отношению ко времени

- в терминах продолжительности интервала времени, в течение которого метрологическое свойство изменилось в установленном размере;

- в терминах изменения свойства за установленный интервал времени.

**3.39 стабильность образца** (specimen stability)

устойчивость образца к изменению качества при длительном хранении

[Источник: ИСО 23833: 2013, 5.5.10, модифицированный-текст “изменения химического состава при электронной бомбардировке, т. е. сопротивление изменению интенсивности соответствующих характерных рентгеновских лучей, наблюдаемое в течение времени воздействия электронного пучка на образец” был заменен на “изменение качества при длительном хранении”.] (перевод ИСО 23833: 2013 отсутствует)

**3.40 устойчивость структуры**(structural integrity)

степень сохранности нуклеиновой кислоты, отражающей исходное состояние

**3.41 валидация** (validation)

подтверждение выполнения требований, необходимых для конкретного использования или применения, посредством представления объективных свидетельств

Примечание

Термин "валидирован" используют для обозначения соответствующего статуса.

[Источник: ISO 9000:2015, 3.8.13, изменен — “Примечание 1 Примечание 3 удалены.]

**3.42 верификация** (verification):

Подтверждение, посредством представления объективных свидетельств, что установленные требования были выполнены.

Примечание 1 термин "верифицировано" используется для обозначения соответствующего статуса.

Примечание 2 верификация может включать такие действия, как

* выполнение альтернативных расчетов,
* сравнение новой проектной спецификации с аналогичной проверенной проектной спецификацией,
* проведение испытаний и демонстраций, а также
* рассмотрение документов до их выдачи.

[Источник: ISO 9000:2015, 3.8.13, изменен — “Примечание 1 Примечание 3 удалены.]

# 4 Общие вопросы

**4.1 Общие**

**4.1.1 вопросы преаналитического этапа**

Общие положения о системах менеджмента качества медицинских лабораторий и, в частности, о сборе и обработке образцов см. В стандартах ИСО 15189: 2012, 4.2, 5.4.4, 5.4.7 и ИСО/TS 20658[[3](#bookmark99)]. Должны соблюдаться требования к лабораторному оборудованию, реагентам и расходным материалам в соответствии с ИСО 15189:2012, 5.3; также могут применяться стандарты ИСО 15189:2012, 5.5.1.2 и 5.5.1.3.

преаналитический этап обычно состоит из следующих процессов:

* Сбор, хранение и транспортировка проб;
* Предварительная обработка образца;
* Экстракция и очистка нуклеиновых кислот

Эти факторы в значительной степени влияют на качество образца и последующие результаты испытаний. Были описаны детали особенностей преаналитических процедур для молекулярных исследований [[6](#bookmark102)] [[7](#bookmark103)] [[8](#bookmark104)] [[25](#bookmark107)] [[26-](#bookmark108)] [[27](#bookmark109)] [[28](#bookmark110)] [[29](#bookmark111)] [[30](#bookmark112)].

Одним из основных факторов преаналитического этапа исследований, оказывающих сильное влияние на результаты аналитических тестов, являются биологические изменения аналита (РНК, ДНК) в образце: индукция генов,подавление экспрессии генов, апоптоз и т. д. Эти эффекты могут зависеть от продолжительности теплой и холодной ишемии и температуры окружающей среды до фиксации формалина. Эти факторы являются основным источником неправильных или ненадежных результатов аналитических тестов[®](#bookmark102)[[7](#bookmark103)][[8](#bookmark104)][[30](#bookmark112)]. Таким образом, транспортировка ткани перед хранением или фиксацией в формалине должна производиться в кратчайшие сроки и, возможно, при низкой температуре или под вакуумом.

Мультиплексные молекулярные тесты - это тесты IVD или медицинские устройства, которые измеряют последовательность двух или более нуклеиновых кислот одновременно. Для мультиплексных молекулярных тестов необходимо применение образца высокой степени качества

4.1.2.**качество образцов** Specimen quality considerations

Источник образца, сбор, обработка, экстракция и очистка должны быть валидированы и верифицированы (при необходимости~~)~~ для того, чтобы убедиться, что качество нуклеиновой кислоты подходит для всех аналитов или мишеней, которые планируется выявить в исследовании. Панель мишеней длямультиплексного анализа включает мишени представленные в высокой или низкой концентрации.

Изменчивость биологических, физических и химических свойств каждого образца может влиять на качество получаемой нуклеиновой кислоты и, следовательно, на результаты мультиплексных молекулярных анализов. Однако нецелесообразно оценивать все влияния для каждого образца. Лаборатория должна обеспечить, чтобы каждый биологический образец, получали способом, который не допускал бы изменчивости свойств. Когда этого нельзя избежать, влияние изменчивости свойств должно оцениваться соответствующим способом, таким как включение в анализ образца внутреннего контроля.

**4.1.3 Качество нуклеиновых кислот**

Качество нуклеиновой кислоты для мультиплексного молекулярного теста определяется как матрица нуклеиновой кислоты с соответствующими свойствами, которые гарантируют измерение в ходе мультиплексного молекулярного теста. В то время как общие соображения по оценке качества нуклеиновых кислот совпадают для классических (моно-) и мультиплексных тестов, существуют особые правила для мультиплексных молекулярных тестов из-за потенциальной интерференции или взаимодействия между несколькими мишенями и/или компонентами теста.

Качество выделенной из образца нуклеиновой кислоты зависит от ряда факторов, включая, но не ограничиваясь, от количества, химической чистоты, длины и структурной целостности, а также содержания копийности интересующей мишени. Влияние качества следует учитывать в отношении таких параметров анализа, как предел обнаружения и линейный диапазон каждого аналитического метода.

Качество нуклеиновой кислоты для мультиплексного молекулярного теста должно оцениваться способами, подходящими для используемого метода измерения. Оценка качества должна определять репрезентативный профиль выделенной нуклеиновой кислоты, определяемый длиной, количеством, химической чистотой и структурной целостностью или обнаружением или количеством репрезентативных генов (например, генов внутреннего контроля).

Материалы управления технологическими процессами должны использоваться для мониторинга как преаналитических, так и аналитических процессов, где это уместно и доступно. Такие материалы следует использовать для мониторинга процедур экстракции и очистки нуклеиновых кислот. Для определения качества нуклеиновых кислот каждой целевой последовательности следует учитывать внутренний контроль.

Примечание руководство CLSI MM17-A содержит рекомендации по различным аспектам верификации и валидации мультиплексного тестирования![24](#bookmark106)!.

**4.2 Оценка качества нуклеиновых кислот для мультиплексных молекулярных тестов**

**4.2.1 оценка качества нуклеиновых кислот для мультиплексных молекулярных тестов**

Термин «ДНК качества ПЦР» - описан в ИСО 22174, ИСО 16577 и ИСО 20395. В ИСО 16577 характеризуется как матрица ДНК достаточной длины, качества и структурной целостности для амплификации с помощью ПЦР, а «РНК качества ОТ-ПЦР», также описанная в ИСО 22174, представляет собой образец РНК достаточной длины в количестве, пригодном для обратной транскрипции и ПЦР. Понятия «ДНК качества ПЦР» и « РНК качества ОТ-ПЦР» не применимы к мультиплексным молекулярным методам измерения, включая методы ПЦР или РТ-ПЦР, микрочипы и массовое параллельное секвенирование.

Учитывая, что мультиплексный молекулярный тест является молекулярно-биологическим методом, способным одновременно обнаруживать несколько нуклеотидных последовательностей даже более короткой длины, должны быть разработаны методы оценки качества мультиплексного молекулярного теста нуклеиновой кислоты, подходящие для каждой измерительной системы.

Качество нуклеиновых кислот должно быть определено перед проведением мультиплексного молекулярного теста. Метод, с помощью которого определяется качество нуклеиновых кислот, будет зависеть от нескольких факторов, таких как используемый мультиплексный метод, известное или ожидаемое количество нуклеиновой кислоты, присутствующей в образце, и нуклеиновая кислота, подлежащая анализу (ДНК или РНК). Пользователь должен выбрать наиболее подходящий подход в зависимости от мультиплексного молекулярного теста, который будет использоваться.

Для определения количества, концентрации, чистоты и возможного разрушения нуклеиновой кислоты в образце может быть использована оценка спектрофотометрическими и/или флуорометрическими методами и/или гель- или капиллярным электрофорезом. Качество нуклеиновых кислот следует оценивать на основе распределения размеров, выявленных при электрофорезе нуклеиновых кислот, обнаружения или количества референсных генов (например, генов внутреннего контроля, включая гены домашнего хозяйства house-keeping genes). Для определения качества нуклеиновых кислот каждой целевой последовательности для определения контроля процесса можно использовать обогащенные внутренние контроли (т.е. образцы, в которые был добавлен интересующий аналит в точно известном количестве). Существуют методы, доступные для оценки качества нуклеиновой кислоты, присутствующей в растворе, как описано в [приложениях с А](#bookmark85) до [Д](#bookmark94).

Пример 1 Качество РНК можно оценить по электроферограмме с помощью соотношения 28S:18s рибосомальной РНК образца, содержащего общую РНК, числа целостности РНК (значения RIN) или балла целостности РНК

(Рис) [[21](#bookmark113)][[32](#bookmark114)].

Хотя показатели качества на основе рРНК популярны для тех, кто проводит анализ РНК, они не всегда могут быть полезны для оценки качества мРНК[[33](#bookmark115" \o "Current Document)].

Пример 2 Соотношения А260/А280 и А260/А230 могут быть использованы для оценки чистоты РНК

Когда мультиплексные молекулярные тесты предназначены для обнаружения или количественной оценки мишеней различной длины, следует убедиться, что матрица нуклеиновой кислоты имеет достаточное качество, чтобы быть амплифицируемой во всем диапазоне размеров мишеней. Это может быть достигнуто с помощью ПЦР-реакции с наборами праймеров, которые производят фрагменты, оценивающие нижний и верхний диапазон размеров мишени. Качество матрицы нуклеиновой кислоты, пригодной для анализа, затем может быть оценено на основе распределения размеров полученных ПЦР-фрагментов с помощью капиллярного или гель-электрофореза.

Для некоторых мультиплексных молекулярных тестов критическим аспектом обеспечения качества образца нуклеиновой кислоты является определение наличия интересующей нуклеиновой кислоты. Например, мультиплексный анализ мишени нуклеиновой кислоты, содержащейся в низком количестве в конкретной исходной ткани или организма должен гарантировать, что образец содержит нуклеиновую кислоту из этой ткани/организма. Это подтверждение может быть получено в результате мультиплексного теста, или может быть подтверждено исследованием выполненным до использования образца нуклеиновой   
кислоты для мультиплексного анализа.

Примечание. Для улучшения обнаружения жизнеспособных патогенов можно использовать одновременное определение рРНК или мРНК. Другой подход может быть рассмотрен для обработки бактерий с помощью интеркаляторов ДНК, которые проникают в инактивированные клетки и ингибируют ПЦР-амплификацию, но исключаются из жизнеспособных клеток.

Образец нуклеиновой кислоты должен иметь достаточное количество интересующей последовательности, которая определяется интересующими исследователя разновидностью и популяцией. Когда мультиплексные молекулярные тесты предназначены для обнаружения или количественной оценки различных последовательностей, должно быть обеспечено достаточное количество, требуемое в данном методе измерения для соответствия назначению. Должно быть обеспечено измерение последовательности, присутствующей в меньшем количестве, чем другие.

Пример: при проведении мультиплексной лигатурно-зависимой зондовой амплификации (MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) используются два денатурированных фрагмента (D-фрагменты) для выявления слабой денатурации ДНК вследствие солевых загрязнений образца.

**4.2.2 Оценка количества нуклеиновых кислот**

Методы, подходящие для оценки количества нуклеиновых кислот должны быть выбраны в соответствие с ходом эксперимента, использующего мультиплексный молекулярных тест.

В ходе определения количества очищенных нуклеиновых кислот для мультиплексных молекулярных тестов должно быть измерено соотношение целевого генома к количеству референсного образца, соответствующих калибровочных и контрольных образцов для сравнения относительного значения нескольких переменных. В этом случае принцип подсчета – определение отношения (в процентах~~)~~ двух последовательностей ДНК или РНК, в том числе целевой последовательности и контрольного гена или материала (внутренние контрольные гены, референсный материал). Это подтверждение может быть включено в мультиплексный тест или получено в ходе отдельного исследования.

1. **Подготовка образцов**

**5.2.1 Общие положения**

В преаналитическом этапе существует множество стадий обработки образцов, включая сбор, фиксацию, хранение, транспортировку, подготовку и обработку. Поскольку эти факторы преаналитического этапа значительно влияют на качество образца и последующие результаты испытаний, необходимо обеспечить подобающее обращение с образцом![6](#bookmark102)][[7](#bookmark103)] [[S](#bookmark104)] [[20](#bookmark112)].

По мере увеличения числа мишеней в мультиплексном анализе, ложноотрицательные результаты для определенных последовательностей могут стать более проблематичными. В частности, следует оценить качество мишени с наименьшим присутствием таких нуклеиновых кислот в образце, поскольку конкуренция за компоненты реакции может влиять на содержащиеся в малом количестве мишени более значительно, чем на более распространенные.

Пример 1 в мультиплексных тестах для выявления подтипов вируса папилломы человека при цервикальной инфекции во время сбора образцов можно получить некачественный образец слизистой из шейки матки, например без достаточного количества клеток человека. Это может привести к ложноотрицательному результату теста вследствие непригодного образца. Для проверки отрицательного результата теста в образцах, которые потенциально являются низкокачественными, одновременное обнаружение последовательности генома человека может быть использовано в качестве внутреннего контроля анализа.

Пример 2 в мультиплексных тестах для определения соматических видов рака относительное снижение интересующих мишеней может происходить, когда доля не-неопластических клеток, таких как воспалительные инфильтраты или эндотелиальные клетки, больше, чем неопластических клеток, что приводит к недооценке или ложноотрицательным результатам определения целевой последовательности.

Пример 3 в мультиплексных тестах для обнаружения микробных патогенов при инфекции дыхательных путей плохое качество нуклеиновой кислоты, обусловленное высокой вязкостью образца, может возникать во время сбора и подготовки респираторных образцов, что приводит к ложноотрицательным тестам для вида с низкой концентрацией в образце. Это может быть сведено к минимуму путем растворения образца в NALC (W-ацетил-L-цистеине) и semi-alkali-proteases. (EC 3.4.21.63, Aspergillus alkaline proteinase).

По мере увеличения числа определяемых объектов, ложноположительные результаты, не имеющие клинической значимости, становятся все более проблематичными. Поэтому биологический образец должен быть отобран и обработан таким образом, чтобы избежать ложноположительных результатов, обусловленных контаминацией вследствие таких факторов. Когда этого нельзя избежать, факторы должные быть оценены при использовании соответствующего метода, такого как использование количественного измерения и применения значения cut-off.

Пример 1 в мультиплексных тестах для обнаружения бактериальных патогенов в инфекции кровотока контаминация может произойти во время сбора крови, что приводит к ложноположительным результатам теста вследствие присутствия нормальной флоры кожи человека, таких как коагулазонегативный стафилококк. Это может быть уменьшено асептическими методами при взятии крови, включая антисептику кожи, гигиену рук и предварительно упакованные наборы. Заражение нежизнеспособными бактериями может также происходить в крови после антимикробной обработки, что приводит к положительным тестам обнаружения таких бактерий. Это можно уменьшить, избегая забора крови до или сразу после введения антимикробных препаратов.

Пример 2 в мультиплексных тестах для обнаружения видов микобактерий при инфекции дыхательных путей загрязнение может происходить во время сбора респираторных образцов, что приводит к положительным тестам присутствия бактерий окружающей среды, таким как *M. gordonae, M. chelonae* или *M. simiae.* Это может быть уменьшено с помощью стерильного аппарата для сбора образцов, такого как бронхоскоп.

1. **Рассмотрение вопроса о подготовке тканей**

Когда методы, основанные на реакциях ферментативной амплификации, используются для мультиплексных молекулярных тестов, ингибиторы, присутствующие в образцах тканей, могут мешать обнаружению или количественной оценке мишеней, представленных в малом количестве, но представляющих интерес по сравнению с более распространенными мишенями. Поэтому ингибиторы должны быть сведены к минимуму настолько, насколько это возможно, чтобы обеспечить измерение каждой интересующей последовательности.

Наличие и доля опухолевых клеток должны быть оценены, чтобы обеспечить интерпретацию результатов теста и определить, необходимо ли обогащение опухолевых клеток в такой степени, чтобы обеспечить оценку каждой интересующей последовательности.

Для образцов FFPE фиксация формалином сопровождается фрагментацией и химической модифицией нуклеиновых кислот, и поэтому желательно проводить фиксацию формалином в соответствующем фиксирующем реагенте (т. е. стандартном буферном растворе формалина), при низкой температуре и в кратчайшие сроки[[2](#bookmark98)][[6](#bookmark102)][[20](#bookmark112)].

Примечание Рабочие процессы для предварительного исследования различных типов образцов, таких как FFPE, замороженные ткани и кровь, описаны в ИСО 20166, ИСО 20184 и ИСО 20186[[6](#bookmark102)][[7](#bookmark103)][[s](#bookmark104)].

Примечание Нейтральный буферный формалин (НБФ) обычно используется для процесса фиксации.

Примечание ДНК, полученная из более старых фиксированных формалином парафиновых блоков (например, > 3 лет), часто демонстрирует отсутствие дезаминирования цитозина до урацила, что приводит к переходу C:G в T:A в последовательностях ДНК. Обработка урацил-W-гликозилазой может устранить урацил-содержащие молекулы ДНК в таком образце. В качестве альтернативы оценка коэффициентов перехода к трансверсии данных последовательностей путем массового параллельного секвенирования может быть использована для обнаружения значительного дезаминирования.

При работе с образцами тканей небольшого объема, например полученными путем тонкоигольной аспирации, следует учитывать стохастическое смещение, поскольку количество геномных эквивалентов, присутствующих в образце, может быть достаточным для последовательного обнаружения вариантов или организмов с низким присутствием генома или аллелей.

При фиксации формалином и подготовке тканей для мультиплексного выявления соматических видов рака может происходить перекрестное попадание ткани от одного пациента в тканевой препарат другого пациента. Это может привести к положительному результату теста для данного пациента, хотя последовательность нуклеиновых кислот принадлежит образцу другого пациента. Следует позаботиться о том, чтобы свести к минимуму этот риск, обрабатывая ткань на чистой поверхности и используя одноразовые устройства или расходные материалы (например, лезвие, прокладку и контейнер). Если перекрестная контаминация неизбежна, то должен быть разработан соответствующий контроль мультиплексных анализов.

Примечание включение полиморфных геномных областей (например, используемых в судебных анализах) в целевые области анализов методом массивого параллельного секвенирования может быть использовано для оценки наличия более чем одного генома пациентов в секвенируемых образцах.

1. **Экстракция и очистка нуклеиновых кислот**

Метод экстракции или очистки нуклеиновых кислот выбирается с учетом влияния типов образцов и матриц на каждый мультиплексный метод, которому будет подвергаться экстрагированная или очищенная нуклеиновая кислота.

При измерении с использованием некоторых высокочувствительных мультиплексных методов потенциальная контаминация нуклеиновой кислоты реагентами, пробирками и пластиковой посудой может привести к ложноположительным результатам. Использование специально разработанных и изготовленных материалов для этих типов анализов должно быть рассмотрено с целью минимизации контаминации нуклеиновыми кислотами. Кроме того, потенциальная перекрестная контаминация образцов может привести к ложноположительным результатам. Должен быть установлен протокол подготовки и обработки образцов/проб, который должен быть задокументирован и соблюден, чтобы свести к минимуму влияние такого перекрестного загрязнения.

Когда ожидается низкий выход нуклеиновой кислоты из образца, следует использовать специальную пластиковую посуду для снижения связывания нуклеиновых кислот, чтобы минимизировать потери образца, например, с помощью низкоадсорбирующей пластиковой посуды.

Примечание некоторые материалы пробирок связывают нуклеиновые кислоты. Полиалломерные пробирки в качестве сосудов для реагентов поглощают меньше ДНК по сравнению со стандартными полипропиленовыми пробирками для микроцентрифуги, которые поглощают до 100 нг ДНК. Моющее средство такое, как 0,02 % полиэтиленгликоль сорбитан монолаурат на каждой стадии реакции снижает адсорбцию ДНК на стенках пробирок ![20](#bookmark112" \o "Current Document)!.

Когда мультиплексный молекулярный тест предназначен для обнаружения или количественной оценки мишеней нуклеиновых кислот, снижение эффективности экстракции может привести к потере определенных мишеней нуклеиновых кислот, что приведет к ложноотрицательным результатам тестирования. Необходимо позаботиться о том, чтобы обеспечить воспроизводимую эффективность экстракции для всех мишеней нуклеиновых кислот, подлежащих тестированию в мультиплексных анализах.

Потенциальное загрязнение нуклеиновых кислот ингибиторами также может привести к ложноотрицательному результату в мультиплексных анализах. Для предотвращения этого явления необходимо эффективно удалять ингибиторы.

Примечание при агрессивном разрушении клеточных стенок грибов или тканей организма с помощью стеклянных шариков нуклеиновые кислоты имеют тенденцию к фрагментации.

1. **Метод оценки качества**

Для оценки качества нуклеиновых кислот существует несколько методов, таких как спектры поглощения для определения количества, отношение поглощения от 260 нм (А260) до 280 нм (А280) для оценки чистоты и гель-электрофорез для оценки длины или целостности фрагмента![31](#bookmark113)!. Эти значения, однако, не являются надлежащим показателем качества образца для мультиплексных молекулярных тестов, таких как соотношение А260/А280 при оценке фрагментов для секвенирования.

Примечание во всех протоколах подготовки образцов для массового параллельного секвенирования исходным материалом является ДНК в виде, например, изолированной геномной ДНК, кДНК, полученной в ходе обратной транскрипции или иммунопреципитированного хроматина. Чтобы преобразовать это в секвенируемую библиотеку, исходная ДНК фрагментируется, фрагменты сортируются по размеру и, к фрагментам определенной длины, в соответствии с используемым протоколом секвенирования пришиваются. Концентрация ДНК и качество фрагментов для секвенирования с использованием соотношения А260/А280 (например, 2,00) в качестве показателя чистоты образца не подходят, так как оставшиеся праймеры, свободные нуклеотиды и неправильно адаптированные фрагменты неотличимы от желаемых, продуктивных фрагментов. Вместо этого для специфического измерения двухцепочечной ДНК необходимы другие методы, такие как использование интеркалирующего флуоресцентного красителя.

Соотношение А260/280 может дать ценную информацию. Если соотношение А260/280 выходит за пределы диапазона, указанного аналитическим испытанием, образец следует выбросить. Например, значение <1,60 может быть сильным признаком того, что в этом образце присутствуют потенциально мешающие соединения, такие как белок, фенол, гуанидин или другие реагенты. Соотношение 260/280 также может быть полезно для определения чистоты продукта ПЦР после очистки для удаления избыточных праймеров / ssDNA и т. д.

Примечание значение A 260 также используется для измерения выхода суммарной нуклеиновой кислоты. Это может быть использовано для определения загрязнения геномной ДНК, когда это значение неожиданно велико. Например, когда вирионы ВИЧ измеряют в образцах плазмы крови, высокое значение A 260 может быть индикатором загрязнения геномной ДНК из лейкоцитов

Прямые методы оценки состояния фрагментации ДНК включают прямое подтверждение путем электрофореза, оценка ПЦР-амплификации фрагментов ДНК известной длины (например, внутреннего контроля гена β-глобина или рецепторов витамина D, или внесение референсного материала), или оценка реакции амплификации с использованием delta Cq (количественное определение цикла, также известного как пороговый цикл, КТ или Cp) значения в количественной ПЦР в реальном времени.

Длина фрагментов для секвенирования может быть оценена по разделению размеров при капиллярном электрофорезе или по набору клонированных и секвенированных по Сэнгеру фрагментов.

Для оценки фрагментации РНК методы включают прямое измерение конформации РНК с помощью электрофореза в денатурированном агарозном геле. Кроме того, целостность экстрагированной РНК может быть оценена по экспрессии рибосомальной РНК (рРНК) и генов внутреннего контроля, включая гликоральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) или бета-актин. Когда эти гены также будут использоваться для целей нормализации, они должны быть валидированы, чтобы убедиться, что они подходят для конкретного теста. Для оценки качества РНК доступны значения RIN или RIS и/или отношение 18S-единицы к 28S-единице рибосомной РНК, полученной в результате электрофореза.

Примечание. анализ показателей качества RIN и рРНК не всегда является полезным индикатором естественной деградации мРНК, особенно в образцах FFPE. Для РНК из FFPE использование парафинового алгоритма метрики РНК (PERM), основанного на Формуле, аппроксимирующей взвешенный анализ площади под кривой электроферограммы извлеченной РНК, считается лучшим, чем RIN[[34](#bookmark116)].

Примечание. целью секвенирования РНК является определение содержания РНК в образце количественно. Секвенирование РНК достигается путем выделения интересующей РНК фракции (или селективного удаления незначимых фракций), превращения в двухцепочечную кДНК и использования в реакциях секвенирования.

Использование внутреннего контроля, осуществляемого на всех этапах экстракции, амплификации и детекции, может быть полезным инструментом для оценки качества нуклеиновых кислот, оценки эффектов ингибиторов и оценки эффективности методов экстракции. Внутренний контроль может быть разработан специально для обнаружения каждой интересующей цели. Мультиплексные молекулярные тесты с таким внутренним контролем могут быть использованы для оценки количества определенных шаблонов в образце, для идентификации патогена, генотипирования или мультиплексного анализа мутаций.

# Приложение А

# (информативное)

# Оценка целостности РНК

Методы оценки целостности РНК с использованием формата капиллярного электрофореза включают число целостности РНК, (RNA integrity number, RIN), и оценку целостности РНК, (RNA integrity score, RIS) [2][31][32]. RIN определяют методом электрофореза и используют для оценки интактности РНК, показывая детальную картину распределения фрагментов РНК по размерам![2](#bookmark98)!![35](#bookmark117)]. Разработан программный алгоритм, способный оценивать качество РНК лучше, чем рибосомные соотношения. Для электрофореза широко используются автоматические системы в сочетании с микрофлюидными чипами, индуцированным напряжением разделением размеров и детекцией флуоресценции. Молекулы РНК окрашивают интеркалирующим красителем и обнаруживают с помощью системы. Данные RIN также анализируются по электроферограммам в системе. На электроферограммах и геле-подобных изображениях деградация рРНК отражается сдвигом в сторону более коротких размеров фрагментов. RIN образца назначается в диапазоне от 10 (интактный) до 1 (полностью деградированный). На электроферограммах и геле-подобных изображениях деградация рРНК отражается сдвигом в сторону более коротких размеров фрагментов. В качестве еще одного метода обеспечения целостности РНК блок измерения системы QIAxcel (Qiagen) для РНК обеспечивает RIS с использованием капиллярного электрофореза высокого разрешения с другим программным алгоритмом от RIN.

**Приложение Б**

(информативное)

**Оценка целостности ДНК**

Алгоритм DNA Integrity Number (DIN) был разработан для того, чтобы обеспечить объективный и стандартизированный инструмент для надежной оценки целостности ДНК. DIN определяет фрагментацию образца геномной ДНК путем оценки распределения сигнала по всему диапазону размеров и применяет автоматически рассчитанное число. Для обеспечения численной оценки образцы сортируются в соответствии с распределением их сигнала по шкале DIN от 1 до 10. Высокий DIN указывает на высоко интактную gДНК,  
а низкий DIN-на сильно деградированный образец gДНК t[2](#bookmark98)][[36](#bookmark118)].

**Приложение В**

(информативное)

**Использование ПЦР для оценки амплифицируемой ДНК из образ**цов **FFPE**

ДНК, извлеченная из фиксированных формалином тканей, фрагментирована и содержит повреждения, которые являются источниками артефактов ее последовательности. В частности, обширная фрагментация значительно уменьшает количество амплифицируемых матриц, доступных для ПЦР-амплификации. Второй серьезной проблемой, связанной с ДНК FFPE, является появление артефактов последовательности, то есть видимых изменений последовательности, которых нет в исходном образце.

Фрагментация - распространенная форма повреждения ДНК, обнаруживаемая в тканях, фиксированных формалином. Было показано, что фрагментация ДНК в фиксированных формалином тканях увеличивается с увеличением времени хранения и снижением рН формалина, используемого для фиксации тканей. Таким образом, одно и то же количество ДНК FFPE из разных образцов может содержать существенно различное количество амплифицируемых матриц в зависимости от степени повреждения.

Индуцированные формальдегидом сшивки ДНК снижают стабильность двухцепочечной ДНК, что приводит к частичной денатурации ДНК. Было показано, что фрагментация ДНК в фиксированных формалином тканях увеличивается с увеличением времени хранения и снижением рН формалина, используемого для фиксации тканей![37](#bookmark121)!. Формальдегид легко окисляется до муравьиной кислоты в реакции с кислородом воздуха. Образование муравьиной кислоты снижает рН формалина. Таким образом, формалин следует забуферить для поддержания нейтрального уровня рН. N-гликозидные связи пуриновых оснований и сахаров подвержены гидролизу при низком рН, образуя абазные участки в ДНК.

Среди артефактов последовательности, обнаруженных в ДНК FFPE, переходные варианты C:G>T:A являются наиболее частым типом SNV. Артефакты последовательности чаще обнаруживаются при тестировании копий низкого количества ДНК FFPE, как это часто бывает в протоколах на основе ампликона. Варианты артефактов С:Г>Т:А могут быть заметно снижены после обработки ДНК в парафине УДГ перед ПЦР-амплификацией, что свидетельствует о повреждении урацила как одного из основных источников артефактов С:Г>Т:А вариантов в ДНК в парафине. Высокий уровень артефактов С:Г>Т:А SNVs, найденные в CpG динуклеотидов ДНК из парафина, убедительно указывают на дезаминирование основания 5-метилцистозина.

Качество ДНК FFPE для анализа на основе ДНК может быть оценено с помощью ПЦР-реакции с наборами праймеров, которые производят короткие и длинные фрагменты (100, 200, 300 и 400 БП) из неперекрывающихся целевых сайтов в конкретном гене, таком как GAPDH. Образцы могут быть классифицированы на основе наибольшего из возможных обнаруженных продуктов ПЦР, а именно 100, 200, 300 и 400 БП.

Минимизация артефактов последовательности имеет решающее значение для точного обнаружения активных мутаций в фиксированных формалином тканях. Предлагаемые стратегии минимизации артефактов последовательности обобщены в [таблице В. 1](#bookmark91)! [38](#bookmark122)!.

**Таблица В. 1-стратегии минимизации артефактов последовательностей ДНК FFPE**

|  |  |
| --- | --- |
| Шаг | Стратегия |
| Выделение ДНК | Оценка чистоты опухоли и выявление патологоанатомом участков, обогащенных опухолью.  Макро-диссекция или вырезание сердцевины из обогащенных опухолью участков.  Использование достаточного количества ткани, когда это возможно, чтобы гарантировать выделение достаточного количества ДНК для последующего молекулярного тестирования.  Термическая обработка для удаления индуцированных формальдегидом сшивок и облегчения последующего переваривания тканей протеиназой.  Расширенная обработка протеиназой К для переваривания тканей и удаления белков, сшитых с ДНК. |
| Оценка ДНК | Оценка количества двухцепочечной ДНК с помощью флуорометрии.  Количественная оценка амплифицируемых шаблонов с использованием qPCR или цифровой ПЦР, особенно для массивно-параллельного секвенирования. Используйте размеры ампликонов, соответствующие среднему размеру ампликонов секвенирующего анализа. |
| Подготовка библиотеки образцов | Удаление урацила In vitro перед ПЦР-амплификацией ДНК FFPE.  Использование анализов, генерирующих короткие ампликоны, для увеличения количества шаблонов для ПЦР.  Обогащение цели на основе захвата позволяет распознавать исходные шаблоны в последовательном чтении с использованием их уникальных начальных и конечных сайтов.  Использование праймеров, специфичных для каждой нити ДНК-шаблона, в подходе обогащения мишеней на основе ампликона.  Молекулярная маркировка ДНК-шаблонов для идентификации артефактов последовательности. |
| ПЦР-амплификация | Использование специфических ДНК-полимераз (например, Pfu и KAPA), которые имеют низкую эффективность обхода повреждений ДНК, таких как урацил и абазные участки.  Используйте высокоточную ДНК-полимеразу для уменьшения ошибок полимеразы. |
| Валидация вариантов последовательностей из МП на основе ампликона | Запуск каждого теста в двух экземплярах, чтобы использовать отдельные пулы шаблонов.  Использование ортогональных методов для клинически значимых мутаций. |

**Приложение Г**

(информативное)

**Образец микро РНК**

Качество образцов РНК для анализа микроРНК можно оценить по концентрации, измеренной спектрофотометром, и чистоте, проанализированной электрофорезом.

Целостность может быть проанализирована в соответствии с [приложением А](#bookmark85) в качестве дополнительной ценности качества. В целом количество микроРНК невелико, например, РНК примерно 1 нг или менее получают из 300 мл плазмы крови или сыворотки [39](#bookmark119)!![40](#bookmark120)]. Целостность согласно [приложению А](#bookmark85) не применяется к показателю для представления качества образца РНК, извлеченного из плазмы крови, поскольку он не содержит рРНК. В частности, использование сыворотки в качестве материала для малой экстракции РНК приведет к малому профилю РНК, который сильно отличается от профиля пациента, так как активация тромбоцитов во время свертывания крови индуцирует процессы, значительно изменяющие профиль.

Процесс квалификации необходим, потому что образец микроРНК очень чувствителен к РНКазе, которую трудно инактивировать. Поскольку даже мельчайших количеств достаточно для деградации образца, процесс квалификации перед измерением помогает обеспечить качество результатов измерений.

# Библиография

1. ИСО 22174: 2005, *микробиология пищевых продуктов и кормов для животных***-***полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения пищевых патогенов* **—** *общие требования и определения*
2. ИСО 20395: 2019, *Биотехнология***-***требования к оценке эффективности  
   методов количественной оценки целевых последовательностей нуклеиновых кислот***-***qPCR и dPCR*
3. ИСО/TS 20658, *медицинские лаборатории***-***требования к сбору, транспортировке, приему и обработке образцов*
4. Японский Комитет по клиническим лабораторным стандартам. Утвержденное руководство по управлению качеством образцов для молекулярных методов: закупка, транспортировка и подготовка образцов. <http://jccls.org/english/preview.html>
5. Японский Комитет по клиническим лабораторным стандартам. Утвержденное руководство по управлению качеством образцов для молекулярных методов (Часть 2) новые технологии и контроль качества образцов. 2017. <http://jccls.org/english/preview.html>
6. ИСО 20166, *молекулярные диагностические исследования in vitro***-***технические требования к процессам предварительного обследования тканей  
   , фиксированных формалином и внедренных в парафин (FFPE).*
7. ИСО 20184, *молекулярные диагностические исследования in vitro***-***технические условия для предварительных исследований замороженных тканей*
8. ИСО 20186, *молекулярные диагностические исследования in vitro***-***технические условия для предварительных исследований венозной цельной крови*
9. ИСО 3534-1, *Статистика***-***словарь и символы*-*Часть 1: общие статистические термины и термины, используемые в теории вероятностей*
10. Руководство ИСО/МЭК 99: 2007
11. ИСО 17511: 2020, *медицинские изделия для in vitro диагностики***-***требования к установлению метрологической прослеживаемости значений, присвоенных калибраторам, материалам контроля истинности и образцам человека*
12. ИСО 18113-1, *медицинские изделия для in vitro диагностики* **—** *информация, предоставленная производителем — ( маркировка)* **-** *Часть 1: термины, определения и общие требования*
13. ИСО 16578: 2013, *молекулярный анализ биомаркеров* **—** *Общие определения и требования к обнаружению специфических оследовательностей нуклеиновых кислот с помощью микрочипов*
14. ИСО/МЭК 17043, *оценка соответствия***-***общие требования к тестированию квалификации*
15. 21CFR CFR-Code of Federal Regulations Title 21: препараты in vitro диагностики для использования человеком 809.3; 2018
16. *Clsi* Quality System Regulations for Laboratory Developed Tests: практическое руководство для лаборатории, документ CLSI QSRLDT. Wayne, PA: институт клинических и лабораторных стандартов; 2015
17. Методы секвенирования нуклеиновых кислот CLSI в диагностической лабораторной медицине одобрены. Руководство-второе издание. Документ CLSI MM09-A2. Wayne, PA: институт клинических и лабораторных стандартов; 2015
18. ИСО 16577: 2016, молекулярный анализ биомаркеров-термины и определения
19. ИСО 24276: 2006 / Amd. 1: 2013, пищевые продукты-методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и производных продуктов — общие требования и определения/ - поправка 1
20. 42 CFR CFR - кодекс федеральных нормативных актов раздел 42: установление и проверка эксплуатационных характеристик. 494. 1253; 2018
21. ИСО 15714: 2019, *метод оценки УФ-дозы для воздушно-капельных микроорганизмов, проходящих через внутрипроводные устройства ультрафиолетового бактерицидного облучения*
22. ИСО 23833: 2013*, Микропучковый анализ* — *электронно-зондовый микроанализ (EPMA)* - *словарь*
23. ИСО 9000: 2015, *Системы менеджмента качества* — *основы и словарь*
24. CLSI, верификация и валидация мультиплексных анализов нуклеиновых кислот, 2-е издание; clsi директива MM17. Wayne, PA: институт клинических и лабораторных стандартов; 2018
25. ИСО 20837: 2006, *микробиология пищевых продуктов и кормов для животных*-*полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения пищевых патогенов* — *требования к пробоподготовке для качественного обнаружения*
26. Matsuda Y, Fujii T, Suzuki T, Yamahatsu K, Kawahara K, Teduka K, Kawamoto Y, Yamamoto T, Ishiwata T, Naito Z, сравнение методов фиксации для сохранения морфологии, РНК и белков из имплантированных в парафин раковых клеток человека мышиных моделей. JHistochem Cytochem. 59(1), 2011, с. 68-75
27. Шринивасан м, Седмак Д, Джуэлл с, влияние фиксаторов и тканевой обработки на содержание и целостность нуклеиновых кислот. Am J Pathol. 161, 2002, с. 1961-71
28. Shabihkhani м, Луси, ГМ, Вэй Б, Mareninov с Лу й, Винтерс ВН, певица Е. Ю., Cloughesy ТФ, Ен ч, заготовка, хранение и контроль качества замороженной крови и биообразцы ткани в патологии, биорецепторы, и настройки биобанка. Clin Biochem., 47(4-5), 2014, с. 258-66
29. Линнарссон С., последние достижения в методах секвенирования ДНК-общие принципы пробоподготовки. Ехр сотового рез., 316(8), 2010, с. 1339-43
30. Комптон куб., Робб Дж, Андерсон МВт, ягоды АБ, гг пение птиц, цветение кДж, Брантон ПА, Крозерс отель JW, Кушман-Vokoun утра, Хикс Д., кури Джей Ди, лазер Джей Маршалл КБ, Misialek МДЖ, место рождения К., Новак Я. А., Олсон Д Пфайфер Джей Ди, а Шейд, Вэнс гр, прогулка ээ, Йохе СЛ Preanalytics и точности патологии: патология практики для обеспечения молекулярной целостности больного раком биообразцы для точной медицины. Arch Pathol Lab Med. 2019 Nov; 143(11):1346-1363
31. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T., The RIN: номер целостности РНК для присвоения значений целостности измерениям РНК. BMC Mol Biol. 2006 Jan 31; 7:3
32. Канани П., Шукла Ю. М., Моди А. Р., Субхаш Н., Кумар С. стандартизация эффективного протокола выделения РНК из Cuminum cyminum. Журнал Университета короля Сауда-31(4), 2019, 1202-1207
33. Vermeulen J, De Preter K, Lefever S, Nuytens J, De Vloed F, Derveaux S, Hellemans J, Speleman F, Vandesompele J., измеримое влияние качества РНК на экспрессию генов по результатам количественной ПЦР. Нуклеиновые кислоты рез. 2011 май; 39(9):Е63. doi: 10,1093/нар/gkr065
34. Chung JY, Cho H, Hewitt SM, the paraffin-embedded RNA metric (PERM) для РНК, выделенной из фиксированной формалином парафиновой ткани. Биотехника. 2016; 60(5) :239-44
35. Integrity Number R. N. A. — RIN) - стандартизация контроля качества РНК [https://www.agilent .com/cs / библиотека / приложения / 5989-1165EN. pdf](https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf)
36. Integrity Number D. N. A. (DIN) с системой TapeStation Agilent 2200 и анализом геномной ДНК Agilent ScreenTape. <https://www.agilent.com>
37. Groelz Д Viertler С., Д. Пабст, Детман Д, К. Затлоукал, влияние условий хранения на качество нуклеиновых кислот, встраиваемых в парафин тканей. PLoS One. 2018; 13( 9): e0203608
38. Do H, Добрович А., артефакты последовательности в ДНК из фиксированных формалином тканей: причины и стратегии для минимизации. Clin Chem. 2015, 61(1):64-71
39. Косака Н., Есиока Ю., Хагивара К., Томинага Н., Очия т.(2013) , циркулирующие микроРНК: методы и протоколы, методы молекулярной биологии, том 1024, стр. 1-9

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| УДК \_\_\_\_\_\_\_ | ОКС 11.040.20 | IDT |
| Ключевые слова: | | |

Директор \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Руководитель разработки \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_