

## МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Методы амплификации нуклеиновых кислот основаны на следующих подходах:

1) амплификация целевого фрагмента нуклеиновой кислоты с использованием, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР), лигазной цепной реакции (ЛЦР) или изотермической амплификации рибонуклеиновой кислоты (РНК);

2) амплификация сигнала гибридизации с использованием, например, метода разветвленной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК); в этом случае амплификация сигнала достигается без повторяющихся циклов амплификации нуклеиновой кислоты.

В настоящей общей фармакопейной статье описаны требования к методам амплификации нуклеиновых кислот на примере типичного метода ПЦР для последующего детектирования амплифицированных фрагментов ДНК подходящим методом. Фрагменты РНК, после обратной транскрипции в комплементарную ДНК и последующей амплификации полученного фрагмента ДНК, могут быть детектированы подходящим методом.

Альтернативные методы амплификации нуклеиновых кислот могут применяться при условии, что они соответствуют требованиям к качеству испытаний, приведенным в данной общей фармакопейной статье.

Настоящая общая фармакопейная статья устанавливает требования к подготовке образца, амплификации *in vitro* фрагментов ДНК и детектированию специфического продукта ПЦР.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Типичная ПЦР представляет собой трехстадийную циклическую процедуру, позволяющую проводить *in vitro* амплификацию определенных фрагментов ДНК или РНК (после обратной транскрипции в комплементарную ДНК).

Основные стадии амплификации ДНК:

– денатурация двуцепочечной нуклеиновой кислоты (матричной ДНК, фрагментов ДНК), когда двуцепочечная ДНК под действием высокой температуры переходит в одноцепочечное состояние;

– специфический отжиг праймеров (синтетических олигонуклеотидов противоположной направленности, фланкирующих целевой участок ДНК) с комплементарным участком молекулы ДНК в подходящих реакционных условиях;

– элонгация нуклеотидной цепи, комплементарной матричной, путем достраивания второй цепи ДНК с 3'-конца праймера под

воздействием ДНК-полимеразы при подходящей температуре (синтез фрагментов ДНК).

В дальнейшем повторяющиеся стадии денатурации, специфического отжига и элонгации ведут к получению и накоплению амплифицируемого фрагмента, ограниченного праймерами с двух концов.

Специфический продукт ПЦР, называемый ампликоном, может быть детектирован различными методами соответствующей специфичности и чувствительности.

Мультиплексная ПЦР проводится с использованием нескольких пар праймеров сконструированных для одновременной амплификации различных целевых фрагментов ДНК в одной реакции.

## ИСПЫТУЕМЫЙ ОБРАЗЕЦ

В связи с высокой чувствительностью ПЦР испытуемые образцы должны быть оптимальным образом защищены от внешней контаминации нуклеиновыми кислотами и ампликонами. Отбор проб, хранение и транспортировку испытуемого образца производят в условиях, минимизирующих разрушение матричной ДНК. В случае проведения испытания по определению матричной РНК необходимо принять особые меры предосторожности ввиду высокой чувствительности РНК к деструктивному воздействию рибонуклеаз. Следует учитывать, что некоторые добавляемые реактивы, например, антикоагулянты или консерванты, могут оказывать влияние на ход определения.

## МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЯ

### **Предотвращение контаминации**

В связи с риском контаминации следует строго разграничивать рабочие зоны в зависимости от используемых материалов и применяемой технологии, учитывать передвижение персонала, использование средств индивидуальной защиты, перемещение материалов, подачу воздуха и процедуры деконтаминации.

При проведении испытания следует разделять такие зоны, как:

- зона первичной подготовки (зона, в которой работы осуществляют только с материалами, не содержащими нуклеиновых кислот, способных быть матрицей, например, с праймерами, буферными растворами и т.д.);
- зона для пробоподготовки (зона, в которой осуществляют работу с реактивами, образцами и т.д.);
- зона ПЦР-амплификации (амплифицируемый материал обрабатывается в закрытой системе);

– зона детектирования (единственная зона, в которой операции с амплифицируемым материалом производятся в открытой системе).

В случае использования закрытой системы строгое разделение зон не обязательно.

### **Подготовка образцов**

Для подготовки образцов к постановке ПЦР используют различные физико-химические процедуры экстракции и (или) обогащения. Подлежащая амплификации целевая ДНК должна быть экстрагирована или высвобождена из испытуемого материала таким образом, чтобы амплификация в выбранных реакционных условиях была осуществима. Используемая методика должна быть эффективной и воспроизводимой.

Добавки, присутствующие в испытуемом материале, могут оказывать влияние на ход ПЦР. Для контроля присутствия ингибиторов в испытуемом материале следует использовать образцы для внутреннего контроля, описанные в разделе *Контрольные образцы для проверки правильности хода испытания* настоящей общей фармакопейной статьи.

В случае РНК-матриц следует уделять внимание предотвращению проявления рибонуклеазной активности.

### **Амплификация**

Амплификацию целевого фрагмента нуклеиновой кислоты методом ПЦР проводят при оптимальных для каждого цикла заданных условиях (температурный профиль для денатурации двуцепочечной ДНК, отжига и элонгации; время инкубации при выбранных температурах; скорость элонгации). Эти условия зависят от различных параметров, например:

- длины и состава праймера и целевого фрагмента;
- типа ДНК-полимеразы, состава буферной смеси и реакционного объема, используемых при амплификации;
- типа используемого устройства для амплификации и показателей теплопроводности между прибором, реакционной емкостью и реакционной смесью.

### **Детектирование**

Ампликон, образовавшийся в результате ПЦР, можно идентифицировать по размеру, последовательности нуклеотидов, химической модификации или комбинации этих параметров. Для обнаружения и определения размера фрагмента могут быть использованы методы гель-электрофореза (с использованием агарозного или полиакриламидного гелей или капиллярного электрофореза) или колоночной хроматографии (например, ВЭЖХ). Для обнаружения и определения характеристик последовательности нуклеотидов могут быть использованы специфическая гибридизация зондов, содержащих комплементарную мишени последовательность нуклеотидов, или

расщепление амплифицированного материала, отражающее наличие мишень-специфических сайтов ферментативной рестрикции. Для обнаружения и определения характеристик химической модификации может быть использовано, например, введение в ампликоны флуорофора с дальнейшей детекцией флуоресценции, возникающей в результате возбуждения.

Детектирование ампликонов может быть достигнуто с помощью зондов, помеченных для последующего хемилюминесцентного, радиоизотопного или иммуноферментного детектирования.

## ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат испытания является достоверным лишь при условии получения однозначно положительных результатов для образцов положительного контроля (контролей) и однозначно отрицательных результатов для образцов отрицательного контроля (контролей). В связи с исключительно высокой чувствительностью метода ПЦР и риском контаминации, положительные результаты должны подтверждаться двукратным полным повторением процедуры испытания по возможности с новой аликвотой образца. Образец считается положительным, если хотя бы одно из двух повторных испытаний дает положительный результат.

При определении нуклеиновой кислоты, для которой установлен измеримый порог количественного определения, необходимо использовать методики для количественного определения.

## ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИСПЫТАНИЯ

### **Валидация методик для количественного определения методом ПЦР**

Программа валидации должна включать квалификацию оборудования. Следует учитывать положения, изложенные в общей фармакопейной статье *Валидация аналитических методик*.

Для валидации ПЦР-испытания применяют подходящие стандартные образцы предприятия, калиброванные относительно Международных стандартных образцов целевой последовательности нуклеотидов, где применимо.

#### *Определение наименьшего положительного значения*

При валидации испытания должно быть определено наименьшее положительное значение, определяемое как минимальное количество целевых матричных нуклеиновых кислот в объеме образца, которые могут быть обнаружены в 95 % испытаний. Наименьшее положительное значение зависит от таких взаимосвязанных факторов, как объем экстрагированного образца и эффективность методологии экстракции,

транскрипция целевой РНК в комплементарную ДНК, процесс амплификации и детектирования.

При определении предела обнаружения системы следует учитывать наименьшие положительные значения для каждой целевой матричной нуклеиновой кислоты и результаты проведения испытания выше и ниже этих значений.

#### *Системы для количественного определения*

При валидации проводится оценка методики количественного определения по следующим характеристикам: правильность, прецизионность, специфичность, предел количественного определения, линейность, диапазон применения и устойчивость (робастность) аналитической методики.

#### **Контроль качества реактивов**

Все реактивы, имеющие критическое значение для используемой методики, должны проходить контроль перед использованием в рутинных испытаниях. Их пригодность или непригодность должна основываться на заранее установленных критериях качества.

Праймеры являются важнейшими компонентами испытаний методом ПЦР, поэтому следует уделять особое внимание их строению, чистоте и пригодности для испытаний. Праймеры могут быть модифицированы (например, конъюгированием с флуорофором или антигеном) для возможности детектирования ампликона специфическими методами при условии, что такие модификации не приведут к ингибированию правильного и эффективного протекания процесса амплификации целевого фрагмента.

#### **Контрольные образцы для проверки правильности хода испытания**

##### *Образцы для внешнего контроля*

При постановке ПЦР для минимизации риска контаминации и обеспечения соответствующей чувствительности при каждом испытании используют следующие внешние контрольные образцы:

- образец положительного контроля: образец содержит определенное количество копий целевого фрагмента, близкое к пороговому наименьшему положительному значению, установленное индивидуально для каждой системы и выраженное кратно по отношению к наименьшему положительному значению данной системы;
- образец отрицательного контроля: образец аналогичный основной матрице, для которой доказано отсутствие целевой последовательности нуклеотидов. Используется для выявления ложноположительного сигнала.

##### *Образцы для внутреннего контроля*

При отсутствии других указаний в частной фармакопейной статье,

образцы для внутреннего контроля представляют собой определенные последовательности нуклеиновых кислот, содержащие сайты связывания с праймерами (праймеры для таких последовательностей добавляются в реакционную смесь дополнительно).

Образцы для внутреннего контроля должны амплифицироваться так же эффективно, как и испытуемая последовательность нуклеотидов, но ампликоны должны иметь четко определяемые отличия. Тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), используемой в качестве внутреннего контроля, должен быть тем же, что и в испытуемом образце.

Образцы для внутреннего контроля предпочтительно добавлять к испытуемому образцу до выделения нуклеиновой кислоты; чтобы можно было их использовать для общего контроля процесса (экстракция, обратная транскрипция, амплификация, детектирование).

#### *Образец для контроля порога количественного определения*

Для контроля порога количественного определения готовят образец, содержащий концентрацию определяемого компонента в испытуемом образце максимально близкую, но не превышающую пороговую линию. Образец для контроля порога количественного определения содержит компонент, калиброванный предпочтительно в Международных единицах, и используется параллельно при каждом количественном определении.

#### **Внешняя оценка качества**

Участие во внешних программах оценки качества представляет собой важную процедуру обеспечения качества испытания методом ПЦР для каждой лаборатории и каждого аналитика.

*Нижеследующие разделы приводятся для информации.*

## **ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С В ПУЛАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ**

### **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**

Большинство аналитических методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, представляют собой испытания на наличие нуклеиновых кислот.

Существует также некоторое количество методик количественного определения. Для определения контаминации пулов плазмы РНК вирусом гепатита С (*hepatitis C virus*) (*HCV*) адекватными являются испытания, которые могут быть рекомендованы для контроля предельного содержания примесей.

В данном разделе описаны способы валидации только для

аналитических методик качественного анализа амплификации нуклеиновых кислот, предназначенных для оценки контаминации пулов плазмы РНК *HCV*. Для этой цели двумя наиболее важными характеристиками для валидации аналитической методики являются специфичность и предел обнаружения. Кроме того, должна быть оценена устойчивость (робастность) аналитической методики.

Однако данный раздел также может быть использован в качестве основы для валидации всей процедуры амплификации нуклеиновых кислот.

В соответствии с данным разделом за аналитическую методику принимают всю процедуру от экстракции нуклеиновой кислоты до детектирования амплифицированного продукта.

При использовании в аналитической методике или ее части коммерческого набора, валидацию пользователя можно заменить документированным подтверждением валидации вышеуказанных положений, проведенной производителем набора. Тем не менее, пользователем должна быть подтверждена эффективность набора в отношении его предполагаемого использования (т.е. предел обнаружения, устойчивость (робастность), перекрестная контаминация).

### *СПЕЦИФИЧНОСТЬ*

Специфичность представляет собой способность к однозначной оценке присутствия нуклеиновой кислоты в смеси с компонентами, присутствие которых можно ожидать.

Специфичность аналитических методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, зависит от выбора праймеров, выбора зонда (для анализа конечного продукта) и обоснованности условий проведения испытания (как для стадии амплификации, так и для стадии детектирования).

При разработке праймеров и зондов должна быть исследована их специфичность в отношении детектирования только РНК *HCV* путем сравнения выбранной последовательности нуклеотидов с последовательностями нуклеотидов, опубликованными в банках данных. В случае *HCV* праймеры (и зонды) обычно выбирают из областей 5'-некодирующего участка генома *HCV*, которые консервативны для всех генотипов.

Амплифицированный продукт должен однозначно идентифицироваться одним из методов, например, проведением амплификации с вложенными праймерами (гнездовая ПЦР), испытанием с использованием ферментов рестрикции, секвенированием или гибридизацией со специфическим зондом.

Для валидации специфичности аналитической методики испытание

должно быть проведено в отношении не менее 100 образцов РНК *HCV*-отрицательных пулов плазмы, для которых должно быть доказано отсутствие реакции. Например, подходящие образцы пулов, не дающих реакции, могут быть получены в Европейском директорате по качеству лекарственных средств и здравоохранению при Совете Европы.

Способность аналитической методики к обнаружению всех генотипов *HCV* также зависит от выбора праймеров, зондов и параметров методики. Эта способность должна быть подтверждена с использованием характеризованных панелей сравнения. Однако, ввиду сложности получения некоторых генотипов (например, генотипа 6), должны быть на подходящем уровне детектированы генотипы преобладающих типов (например, в Европе – генотипы 1 и 3).

### *ПРЕДЕЛ ОБНАРУЖЕНИЯ МЕТОДИКИ*

За предел обнаружения данной аналитической методики принимают наименьшее количество нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть детектировано, но не обязательно определено как точное значение.

Аналитическая методика амплификации нуклеиновых кислот, используемая для детекции РНК *HCV* в пулах плазмы, как правило, дает не количественные результаты – либо положительный, либо отрицательный. Рекомендуются определение предела обнаружения, но в практических целях для аналитической методики на основе амплификации нуклеиновых кислот должно быть определено наименьшее положительное значение. Наименьшее положительное значение (в соответствии с определением, приведенным в данной общей фармакопейной статье) представляет собой минимальное количество целевых матричных нуклеиновых кислот в испытуемом объеме образца, которые могут быть определены в 95 % испытаний. Минимальное положительное значение зависит от распределения вирусных геномов в индивидуальных испытуемых образцах и такого фактора, как эффективность фермента, что может привести к получению различных наименьших положительных значений для отдельных испытаний.

Для определения наименьшего положительного значения ряд разведений стандартного образца предприятия или *СО ФЕАЭС вируса гепатита С*, калиброванного в сравнении с Международным стандартным образцом *HCV* Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), должен быть подвергнут испытанию в разные дни для проверки вариабельности результатов анализа. Для проведения статистического анализа результатов должно быть испытано не менее трех независимых рядов разведений в достаточном количестве повторностей для получения 24 результатов испытания для каждого разведения.



Например, в лаборатории в разные дни могут быть проведены испытания трех рядов разведений в восьми повторностях для каждого из них, четырех рядов разведений в шести повторностях для каждого из них или шести рядов разведений в четырех повторностях для каждого из них. Для того чтобы число разведений не было слишком большим, следует провести предварительное испытание (например, с использованием логарифмических (lg) разведений образца пула плазмы) с получением предварительного наименьшего положительного значения (т.е. наибольшего разведения, дающего положительный результат). После этого диапазон разведений может быть выбран в области полученного предварительного значения (с использованием, например, логарифмического (lg) фактора разведения 0,5 или менее и отрицательного пула плазмы для матрицы разведения). Концентрация РНК *HCV*, которая может быть детектирована в 95 % испытаний, может быть вычислена с использованием соответствующих методов статистической оценки.

Эти результаты также могут служить для оценки изменчивости результатов, получаемых данной аналитической методикой в ходе испытания и в разные дни.

### **УСТОЙЧИВОСТЬ (РОБАСТНОСТЬ)**

Устойчивость (робастность) аналитической методики – мера ее способности выдерживать воздействие незначительных изменений параметров, являющаяся показателем надежности методики при обычном использовании.

Оценка надежности аналитической методики должна проводиться на этапе ее разработки. Устойчивость (робастность) должна показать надежность аналитической методики с учетом определенных вариаций параметров. Для методов амплификации нуклеиновых кислот небольшие изменения параметров методики могут иметь решающее значение. Однако в ходе разработки устойчивость (робастность) методики может быть подтверждена небольшим изменением концентраций реагентов (например, магния хлорида, праймеров или нуклеотидов). Для подтверждения устойчивости (робастности) не менее 20 РНК *HCV*-отрицательных пулов плазмы, отобранных случайным образом и инфицированных РНК *HCV* с получением конечной концентрации, в три раза превышающей заранее определенное наименьшее положительное значение, должны быть испытаны и признаны положительными.

Проблемы с устойчивостью (робастностью) могут возникнуть также в связи с методиками, в которых стадия ультрацентрифугирования предшествует экстракции вирусной РНК. Поэтому для испытания устойчивости (робастности) таких методик не менее 20 пулов плазмы,

содержащих различные уровни РНК *HCV*, но не содержащих специфических антител к *HCV*, должны быть испытаны и признаны положительными.

Предотвращение перекрестной контаминации должно быть подтверждено путем точного детектирования панели не менее чем из 20 образцов, попеременно заполненной образцами отрицательных пулов плазмы и отрицательных пулов плазмы, инфицированных высокими концентрациями *HCV* (не менее 100-кратного наименьшего положительного значения или не менее  $10^4$  МЕ/мл).

### *ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИСПЫТАНИЯ*

Для таких биологических методов, как амплификация нуклеиновых кислот, существует вероятность возникновения специфических проблем, которые могут повлиять как на валидацию, так и на интерпретацию результатов. Методики испытаний должны быть четко описаны в форме стандартных операционных процедур. В них следует указывать:

- способ отбора проб (тип упаковки и т.д.);
- приготовление мини-пулов (где применимо);
- условия хранения до испытания;
- четкое описание условий испытания, включая меры предосторожности против перекрестной контаминации и деградации вирусной РНК, используемых реактивов и стандартных образцов;
- четкое описание используемого оборудования;
- детальные формулы для вычисления результатов, включая статистическую обработку.

В качестве удовлетворительной проверки соответствия системы и надежности аналитической методики, когда бы она ни использовалась, может быть рекомендован подходящий образец для контроля хода испытания (например, подходящее разведение *СО ФЕАЭС вируса гепатита С* или образец плазмы, инфицированной *HCV*, калиброванный в сравнении с Международным стандартным образцом *HCV ВОЗ*).

*Квалификация оборудования.* Соответствующая программа квалификации монтажа и функционирования должна быть реализована для каждой критически важной части используемого оборудования. После замены критически важного оборудования (например, терморегуляторов) должна быть документально подтверждена функциональность аналитической процедуры путем проведения параллельного испытания в отношении 8 повторных образцов пула плазмы, инфицированных РНК *HCV* с получением конечной концентрации, соответствующей ранее определенному наименьшему положительному значению. Все результаты должны быть положительными.

*Квалификация аналитика.* В отношении каждого аналитика, принимающего участие в испытании, должна действовать соответствующая квалификационная программа.

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ДНК ВИРУСА В19 В ПУЛАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ

### *ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ*

Согласно требованиям Фармакопеи, пулы плазмы, используемые при производстве определенных продуктов, должны быть проверены на содержание ДНК вируса В19 (В19V) в концентрации не выше допустимой. Для этого предпочтительно использовать методики амплификации с количественным определением нуклеиновых кислот. Наиболее важными характеристиками для валидации таких методик являются: правильность, прецизионность, специфичность, предел количественного определения, линейность и диапазон применения. Кроме того, должна быть оценена устойчивость (робастность) аналитической методики.

В разделе описаны способы валидации методик амплификации нуклеиновых кислот для определения контаминации пулов плазмы ДНК В19V. Однако данный раздел также может быть использован в качестве основы для валидации в целом процедуры амплификации нуклеиновых кислот.

В соответствии с данным разделом за аналитическую методику принимают всю процедуру от экстракции нуклеиновой кислоты до детектирования амплифицированного продукта.

В случае использования в аналитической методике или ее части коммерческого набора, валидацию можно заменить документированным подтверждением валидации вышеуказанных характеристик от производителя набора. При этом пользователем должна быть подтверждена эффективность набора в отношении его предполагаемого использования (т.е. прецизионность, правильность, диапазон применения, устойчивость (робастность)).

### *ПРАВИЛЬНОСТЬ*

Правильность представляет собой близость совпадения между найденным значением и значением, которое определено как условно правильное либо принято как значение сравнения. Правильность количественного определения зависит от калибровочного графика и от отклонений на различных стадиях количественного определения. Хотя рекомендовано определять правильность во всем специфицированном

диапазоне, наиболее важно подтвердить правильность в диапазоне около предельного значения концентрации (количество). В случае количественного определения ДНК *B19V* в пулах плазмы рекомендуется оценивать правильность методики путем количественного определения не менее 5 концентраций (с логарифмическим (lg) коэффициентом разведения 0,5) *СО ФЕАЭС вирусной ДНК B19* для метода амплификации нуклеиновых кислот или иного стандартного образца, калиброванного в Международных единицах в сравнении с Международным стандартным образцом ВОЗ ДНК *B19V*, в диапазоне рекомендованного на данный момент порогового значения 10,0 МЕ/мкл ДНК *B19V* (т.е.  $10^5$  МЕ/мл,  $10^{4,5}$  МЕ/мл,  $10^4$  МЕ/мл,  $10^{3,5}$  МЕ/мл и  $10^3$  МЕ/мл) не менее чем в трех повторностях для каждого разведения. Правильность должна быть документирована для различных концентраций в процентах, определенных в сравнении с известным количеством ДНК *B19V*. Необходимо отражать уровень технологии соответствующего метода количественного определения, который следует также определять, например, с помощью совместных испытаний.

### **ПРЕЦИЗИОННОСТЬ**

Прецизионность представляет собой близость совпадения между сериями измерений, полученных в многочисленных испытаниях различных проб одного и того же гомогенного образца. Прецизионность определяется на трех уровнях:

– повторяемость выражает точность при одних и тех же условиях испытания в течение короткого промежутка времени; она оценивается с использованием одной методики количественного определения, с помощью которой трижды испытывают подходящие разведения положительных образцов с ДНК *B19V*, калиброванных в Международных единицах и охватывающих весь диапазон применения методики количественного определения; коэффициент вариации рассчитывают для индивидуальных образцов;

– промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность выражает внутрилабораторную вариабельность; она устанавливается оценкой повторов (как рутинный количественный анализ) подходящих разведений положительных образцов с ДНК *B19V*, калиброванных в Международных единицах и охватывающих весь диапазон применения методики количественного определения, в различной обстановке (т.е. различные дни, различные аналитики, различное оборудование, различные реактивы); коэффициент вариации рассчитывают для индивидуальных образцов;

– воспроизводимость выражает точность между различными лабораториями (межлабораторная прецизионность); она оценивается

путем участия в совместных количественных изучениях содержания ДНК *B19V*.

### *СПЕЦИФИЧНОСТЬ*

Специфичность представляет собой способность к однозначной оценке присутствия нуклеиновой кислоты в смеси с компонентами, присутствие которых можно ожидать. Специфичность аналитических методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, зависит от выбора праймеров, выбора зонда (для испытания конечного продукта) и обоснованности условий проведения испытания (как для стадии амплификации, так и для стадии детектирования).

При разработке праймеров и зондов должна быть исследована их специфичность в отношении детектирования только ДНК *B19V* путем сравнения избранной последовательности нуклеотидов с последовательностями нуклеотидов, опубликованными в банках данных. Не должно обнаруживаться значительное сходство с последовательностями нуклеотидов, не относящимися к *B19V*.

Амплифицированный продукт должен однозначно идентифицироваться одним из методов, например, проведением амплификации с вложенными праймерами (гнездовая ПЦР), анализом с использованием ферментов рестрикции, секвенированием или гибридизацией со специфическим зондом.

Для проверки специфичности аналитической методики испытание должно быть проведено в отношении не менее 20 ДНК *B19V*-отрицательных пулов плазмы, для которых должно быть показано отсутствие реакции.

*Генотипы парвовируса B19.* Международный комитет по таксономии вирусов классифицирует представителей 3 генотипов как штаммы человеческого парвовируса *B19*. Генотип 1 представляет прототип *B19V*, генотип 2 представляет вирусные последовательности нуклеотидов типа *A6*, и генотип 3 представляет *V9*-подобные последовательности нуклеотидов. При проведении выравнивания с использованием соответствующей последовательности нуклеотидов генотипа *B19V*, доступной из баз данных последовательностей нуклеиновых кислот, праймеры и зонды должны быть выбраны с таким расчетом, чтобы была возможность обнаружения и количественного определения в равной степени различных генотипов парвовируса *B19*. Для проверки выбранного подхода следует использовать стандартные образцы. Так как получение биологических препаратов сравнения может быть затруднено, соответствующие препараты плазмид или синтетических нуклеиновых кислот также могут служить в качестве источника охарактеризованных целевых фрагментов. Однако они не

могут быть использованы для валидации процедуры экстракции.

### *ПРЕДЕЛ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ*

Предел количественного определения представляет собой минимальное количество нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть количественно определено с требуемой правильностью и прецизионностью. Предел количественного определения методики, основанной на амплификации нуклеиновых кислот *B19V*, оценивают при изучении правильности и межлабораторной прецизионности путем ограничения разведений. Определяют наименьшую концентрацию целевой матричной нуклеиновой кислоты, которая может быть определена количественно с достаточной правильностью и прецизионностью.

### *ЛИНЕЙНОСТЬ*

Линейность методики количественного определения – возможность получения результатов, прямо пропорциональных концентрации нуклеиновой кислоты. Линейность методики, основанной на амплификации нуклеиновых кислот *B19V*, оценивают по характеристикам повторяемости и промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности путем испытания повторностей разведенных образцов с концентрациями, охватывающими весь диапазон применения методики. Определяют интервал, расположенный между верхней и нижней концентрациями целевой матричной нуклеиновой кислоты, при которых получаемые результаты прямо пропорциональны ее содержанию.

### *ДИАПАЗОН ПРИМЕНЕНИЯ*

Диапазон количественного определения – интервал, расположенный между наибольшей и наименьшей концентрациями (количеством) нуклеиновой кислоты в образце, для которого было показано, что методика имеет приемлемый уровень прецизионности, правильности и линейности. Диапазон применения методики амплификации нуклеиновых кислот *B19V* оценивают по характеристикам повторяемости и промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности путем испытаний повторностей разведенных образцов. Определяют интервал, расположенный между наибольшей и наименьшей концентрациями целевой матричной нуклеиновой кислоты, который может быть выражен с приемлемой степенью правильности и прецизионности.

### *УСТОЙЧИВОСТЬ (РОБАСТНОСТЬ)*

Устойчивость (робастность) аналитической методики – мера способности методики выдерживать воздействие незначительных изменений параметров, являющаяся показателем надежности этой методики при обычном использовании. Оценка надежности аналитической методики должна проводиться на этапе ее разработки. Она должна показать надежность аналитической процедуры с учетом определенных вариаций параметров. Для методов амплификации нуклеиновых кислот небольшие изменения параметров методики могут иметь решающее значение. Однако, в ходе разработки методики ее устойчивость может быть подтверждена небольшим изменением концентраций реактивов, например, магния хлорида, праймеров или нуклеотидов. Для подтверждения устойчивости аналитической методики не менее 20 ДНК *B19V*-отрицательных пулов плазмы, инфицированных ДНК *B19V* до получения конечной концентрации около наименьшего значения, должны быть испытаны с получением приемлемых количественных значений.

Предотвращение перекрестной контаминации должно быть подтверждено путем точного детектирования панели не менее чем из 20 образцов, попеременно заполненной образцами пулов плазмы без ДНК *B19V* или с концентрацией ниже порогового значения (10 образцов) и пулов плазмы, инфицированных высокими концентрациями ДНК *B19V* (не менее 100-кратного наименьшего значения, 10 образцов).

### *ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ИСПЫТАНИЯ*

Для таких биологических методов, как амплификация нуклеиновых кислот, имеется вероятность возникновения специфических проблем, которые могут повлиять как на валидацию, так и на интерпретацию результатов. Методики испытаний должны быть четко описаны в форме стандартных операционных процедур. В них следует указывать:

- способ отбора проб (тип упаковки и т.д.);
- приготовление мини-пулов производителем (где применимо);
- условия хранения до испытания;
- четкое описание условий испытания, включая меры предосторожности против перекрестной контаминации и деградации вирусных нуклеиновых кислот, используемых реактивов и стандартных образцов;
- четкое описание используемого оборудования;
- детальные формулы для вычисления результатов, включая статистическую обработку.

Для проверки соответствия системы обеспечения качества и надежности аналитической процедуры может быть использован подходящий образец для контроля хода испытания (например, плазма,

инфицированная образцом ДНК вируса *B19V*, калиброванным в Международных единицах в сравнении с *СО ФЕАЭС вирусной ДНК B19 для метода амплификации нуклеиновых кислот*).

*Квалификация оборудования.* Соответствующая программа квалификации монтажа и функционирования должна быть реализована для каждой критически важной части используемого оборудования. После замены критически важного оборудования (например, терморегуляторов) должна быть документально подтверждена функциональность путем проведения параллельного испытания с использованием 8 образцов пула плазмы, инфицированного ДНК *B19V* с получением конечной концентрации около наименьшего значения. Все результаты должны быть приемлемыми и должны отражать возможности методики количественного определения, как было определено при валидации.

*Квалификация аналитика.* В отношении каждого аналитика, принимающего участие в испытании, должна действовать соответствующая квалификационная программа.