

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО КРИТЕРИЯМ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ВАЛИДАЦИИ МЕТОДОВ ОБНАРУЖЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК И СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ*

CAC/GL 74-2010

РАЗДЕЛ 1 — ВВЕДЕНИЕ

1. Молекулярные и иммунологические аналитические методы в настоящее время являются общепризнанными инструментами для определения ДНК и белковых аналитов в пищевых продуктах. Однако для обеспечения повсеместной приемлемости и достоверности результатов, полученных такими методами в разных лабораториях, необходимо, чтобы аналитические методы удовлетворяли определенным критериям качества.

2. Настоящие методические указания содержат установленные критерии для валидации рабочих характеристик методов, разработанных для обнаружения специфических последовательностей ДНК или специфических белков в пищевых продуктах.

3. Информация, касающаяся общих положений по валидации методов анализа конкретных последовательностей ДНК и конкретного белка, приведена в первой части настоящих методических указаний. В документе предусмотрены специальные приложения, содержащие информацию о валидации методов количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР), валидации методов качественной ПЦР и валидации методов, основанных на обнаружении белков.

РАЗДЕЛ 1.1 — ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ

4. Цель настоящего документа — обосновать разработку молекулярных и иммунологических методов обнаружения, идентификации и количественной оценки специфических последовательностей ДНК и специфических белков в пищевых продуктах, которые дают результаты с сопоставимой воспроизводимостью при выполнении в разных лабораториях

5. Кроме того, здесь приведены рекомендации о том, как разработать методы обнаружения и идентификации конкретных последовательностей ДНК и белков в пищевых продуктах путем определения соответствующих критериев валидации, а также о том, соответствует ли метод этим критериям на основе рабочих характеристик метода.

В методических указаниях изложены соответствующие критерии и даны пояснения о том, как учитывать эти критерии, т. е.:

— путем обоснования наиболее релевантных критериев;

— показывая, как узнать, соответствует ли метод заданным критериям или нет.

РАЗДЕЛ 1.2 НАЗНАЧЕНИЕ

6. Настоящие методические указания содержат информацию о критериях валидации методов анализа пищевых продуктов, включающих обнаружение, идентификацию и количественную оценку конкретных последовательностей ДНК и конкретных белков, представляющих интерес, которые могут присутствовать в пищевых продуктах, включая продукты, содержащие материалы, полученные с помощью современных биотехнологий. Эти молекулярные и иммунологические методы используются для широкого спектра областей применения, таких как тесты на биомаркеры в пищевых продуктах, в том числе полученные с помощью современных биотехнологий, и при

* Область применения: продукты питания, полученные с помощью современных биотехнологий, проверка аутентичности пищевых продуктов, видообразование пищевых продуктов и др.

проверке аутентичности пищевых продуктов, и могут использоваться лабораториями, ответственными за анализ пищевых продуктов.

РАЗДЕЛ 2 — ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

7. Комиссия Кодекса Алиментариус уделяет особое внимание приемлемости методов анализа, которые были валидированы путем совместного пробного испытания в соответствии с международно признанным протоколом ISO 5725:1994 или Согласованным протоколом AOAC/IUPAC. В этой области может возникнуть необходимость в проведении официальной валидации в одной лаборатории в качестве временной меры в отсутствие данных совместных пробных испытаний. Однако методы, используемые для анализа последовательностей ДНК и белков, должны быть пригодны для выполнения в различных лабораториях.

Раздел 2.1 — Критериальный подход

8. В настоящих методических указаниях применяется «критериальный подход».

Раздел 2.2 — Общие критерии метода

9. Общие критерии выбора методов анализа были приняты в методическом руководстве Кодекса. Такие критерии применяются в настоящих методических указаниях. Дополнительные критерии описаны в соответствующих приложениях.

Раздел 2.3 — Процесс валидации

10. Валидация метода — это процесс установления рабочих характеристик и ограничений аналитического метода. Результаты процесса валидации описывают, какие аналиты могут быть определены в каких типах матриц при наличии каких влияющих веществ. В результате валидации получают значения прецизионности и правильности определенного аналитического метода в рассматриваемых условиях.

11. Формальная валидация метода — это завершающая стадия длительного процесса, который включает в себя следующие основные этапы:

- **Предварительная валидация метода.** Предварительная валидация должна проводиться в каждом конкретном случае по мере необходимости. Предварительная валидация должна гарантировать, что метод работает таким образом, который позволяет успешно завершить валидационное исследование, т. е. она должна предоставить доказательства пригодности метода для его целевого назначения. Предпочтительно, чтобы предварительная валидация проводилась с привлечением 2–4 лабораторий. Статистические анализы (например, «повторяемость» и «воспроизводимость») должны проводиться в соответствии с процедурой валидации, которая будет использоваться впоследствии.
- **Валидация метода.** Валидация с помощью совместного пробного испытания является дорогостоящим мероприятием и обычно проводится только после того, как метод показал приемлемые рабочие характеристики как в одной лаборатории, так и в ходе предварительного валидационного исследования.

РАЗДЕЛ 3 — КОНКРЕТНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ПО ВАЛИДАЦИИ МЕТОДОВ ОБНАРУЖЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК И БЕЛКОВ

Раздел 3.1 — Разработка метода для формальной валидации

12. Распространенными методологиями анализа на основе ДНК являются методы на основе ПЦР, используемые для обнаружения конкретной (целевой) последовательности ДНК. Все белковые методы используют иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографические полоски. Для анализа на основе ДНК в настоящее время наиболее широко применяется метод ПЦР, хотя при надлежащей валидации могут быть использованы другие методы на основе ДНК, которые достигают той же цели. Здесь рассматриваются как методы, основанные на ДНК, так и методы, основанные на обнаружении белков.

Раздел 3.1.1 — Критерии приемлемости метода (необходимое условие для валидации)

13. Для оценки метода до его валидации требуется информация как о методе, так и об испытаниях метода, как подробно описано в приложении I.

14. В ходе оценки метода необходимо проверить, что выполнены основные предварительные условия для использования метода в целях Кодекса. В этом разделе описываются критерии приемлемости метода, которые должны быть реализованы методом для проведения предварительной проверки и полного совместного пробного испытания.

Раздел 3.1.2 — Применимость метода

15. Чтобы определить, применимы ли те или иные методы, необходимо подтвердить, могут ли они использоваться для целевых пищевых продуктов с требуемыми рабочими характеристиками, и это должно быть четко изложено. В частности, при анализе последовательностей ДНК и белка некоторые методы, которые могут быть применены к одной сырьевой матрице, могут не применяться к сложным матрицам и (или) обработанным пищевым продуктам, поскольку ДНК и белок могут быть изменены.

16. В принципе, метод должен быть применим к рассматриваемой матрице. В случае методов «общего назначения» для идентификации и количественной оценки последовательностей ДНК и белков в ряде пищевых матриц, должен быть доступен по крайней мере один метод экстракции, применимый к общей пищевой матрице.

Раздел 3.1.3 — Основное условие

17. Методы, основанные на ДНК, должны обнаруживать, идентифицировать и могут количественно определять уровни определенной последовательности или последовательностей ДНК. Методы, основанные на обнаружении белков, должны обнаруживать, идентифицировать и могут количественно определять уровень определенного белка в продукте.

18. В настоящее время метод обнаружения на основе ДНК обычно состоит из методологии ПЦР и включает:

- протокол, описывающий метод экстракции, применимый к соответствующей матрице;
- протокол, описывающий условия, включая используемое оборудование, при которых ПЦР может быть использована для определения последовательности ДНК-мишени;
- описание последовательностей олигонуклеотидных праймеров, которые однозначно усиливают последовательность ДНК-мишени;
- если применимо, описание последовательности флуоресцентного олигонуклеотидного зонда, которая однозначно идентифицирует последовательность ДНК-мишени;
- описание последовательностей олигонуклеотидных праймеров, которые амплифицируют последовательность ДНК, специфичную для таксона, которая должна присутствовать в обычной пищевой матрице независимо от присутствия конкретного аналита, чтобы отличить отрицательный результат от неудачных процессов экстракции/амплификации и определить количество ДНК-мишени по отношению к ДНК, специфичной для таксона;
- если применимо, описание последовательности флуоресцентного олигонуклеотидного зонда, которая однозначно идентифицирует последовательность ДНК, специфичной для таксона;
- описание метода, используемого для обнаружения ДНК;
- соответствующие контрольные пробы и стандарты;
- описания вычислений, используемых для получения результата.

19. Методы, основанные на обнаружении белков, обычно состоят из количественного или качественного метода. Обычно это системы иммуносорбентного анализа, которые состоят из следующих компонентов:

- протокола, описывающего метод экстракции, применимый к соответствующей матрице;
- протокола, описывающего условия, включая используемое оборудование, при которых иммуносорбентный анализ может быть использован для определения последовательности ДНК-мишени;
- носителя, покрытого антителами;
- вторичного антитела, конъюгированного с ферментом;
- ферментного субстрата для цветного проявления;
- буфера для промывки и буфера для экстракции пробы;
- описания метода, используемого для обнаружения белка;
- соответствующих контрольных проб и стандартов;
- описания вычислений, используемых для получения результата.

20. Метод должен удовлетворять следующим требованиям.

- Методы, основанные на обнаружении белков, должны обеспечивать однозначное обнаружение, идентификацию и (или) количественную оценку специфического антигена или эпитопа.
- Отборочные методы на основе ДНК используются для обнаружения ДНК-мишени, присутствующей в нескольких организмах. Например, отборочные методы, которые используются для обнаружения нескольких событий трансформации, должны позволять обнаруживать последовательность ДНК-мишени, которая является общей для ряда событий трансформации.
- Специфические методы на основе ДНК, которые используются для однозначного обнаружения, идентификации и (или) количественной оценки конкретного организма, который может быть смешан с аналогичными организмами, должны обеспечивать однозначное обнаружение, идентификацию и (или) количественную оценку последовательности ДНК, которая уникальна или специфична для этого организма. Например, методы, специфичные для мишени, используемые для обнаружения одного события трансформации, должны обеспечивать однозначное обнаружение, идентификацию и (или) количественную оценку последовательности ДНК, которая уникальна или специфична для этого события трансформации. Для проверки аутентичности пищевых продуктов конкретная целевая последовательность (или последовательности) должна однозначно определять таксон по мере необходимости.
- Основанные на ДНК методы, специфичные для таксона, которые используются для обнаружения или относительной количественной оценки ДНК-мишени, должны обеспечивать однозначное обнаружение, идентификацию и количественную оценку последовательности ДНК, которая уникальна или специфична для этого таксона.
- Для целевых и специфичных для таксона методов, используемых при относительной количественной оценке, рекомендуется идентификация амплифицированного фрагмента, например, гибридизацией зонда или любым соответствующим эквивалентным методом.

Раздел 3.1.4 — Единица измерения и представление результатов

21. Соответствующие единицы измерения (например, число копий мишени или молярные эквиваленты), критерии эффективности и представления данных должны быть указаны для каждого

метода до их использования. Для качественного анализа результаты могут быть представлены как присутствующие или не обнаруженные, по этой причине в этом случае не существует единицы измерения.

22. Измерения могут быть явно выражены в виде «вес/вес» или в относительном проценте. Однако ни один из существующих методов (на основе определения ДНК или белка) не способен измерить их напрямую.

Раздел 3.1.5 — Неопределенность измерений

23. Как указано в документе Кодекса «Методические указания по неопределенности измерения» (CAC/GL 54-2004), лаборатории обязаны оценивать неопределенность количественных измерений. Подготовка образцов и аналитические методы являются двумя существенными источниками ошибок, которые следует учитывать при оценке аналитических измерений. Химики-аналитики, использующие методы, которые прошли валидацию согласно настоящим методическими указаниями, должны обладать достаточной информацией, позволяющей им оценить неопределенность получаемого результата.

24. Для получения дополнительной информации см. документ Кодекса «Методические указания по неопределенности измерений» (CAC/GL 54-2004), раздел: *«Использование аналитических результатов: Планы отбора проб, взаимосвязь между результатами анализа, неопределенность измерений, коэффициенты выхода и положения стандарта Кодекса»* в методическом руководстве Кодекса.

Раздел 3.1.6 — Модульный подход к валидации метода

25. «Метод» обозначает все экспериментальные процедуры, необходимые для оценки измеряемой величины в конкретной матрице. Для конкретного материала метод может включать процессы экстракции ДНК или белка и окончательное количественное определение в системе ПЦР или иммуносорбентного анализа, или определение наличия или отсутствия аналита с помощью качественного метода. В таком случае вся цепочка от экстракции до аналитического этапа представляет собой метод. Однако может оказаться возможным использовать один и тот же метод приготовления проб (например, измельчение) в сочетании с одним и тем же процессом выделения ДНК или белка для нескольких различных последующих анализов для экономии средств до тех пор, пока процессы валидированного метода остаются неизменными.

26. В валидированном методе для процессов, допускающих различные варианты реализации, например различные процессы выделения ДНК или белка, целесообразно выполнять замену варианта реализации без проведения дополнительных исследований, которые могут подтвердить, что такая замена не повлияет на рабочие характеристики метода.

Раздел 3.2 — Требования к совместным пробным испытаниям

Раздел 3.2.1 — Общая информация

27. Целью совместного пробного испытания является валидация данных, полученных в результате предыдущего тестирования в ходе предварительной валидации или в ходе одного лабораторного исследования, и определение методологической прецизионности с точки зрения повторяемости и воспроизводимости результатов.

28. Значения любых параметров рабочих характеристик, учтенные в ходе валидационных исследований, следует интерпретировать и тщательно сравнивать. Точные значения и их интерпретация могут зависеть — помимо рабочих характеристик метода, — от степени использования метода.

29. Если совместное пробное испытание было проведено в соответствии с ISO 5725:1994 или с Согласованным протоколом АОАС/IUPAC, то эта информация может быть использована для оценки приемлемости метода.

Раздел 3.2.2 — Минимальные требования к рабочим характеристикам

30. В совместном пробном испытании показатели эффективности метода должны отвечать соответствующим частям критериев приемлемости метода, а также требованиям к рабочим

характеристикам метода (для совместного пробного испытания приведены далее по тексту документа). В частности, следует оценить методы на соответствие критериям чувствительности, а также стандартных отклонений повторяемости/воспроизводимости и правильности результатов.

31. В дополнение к критериям приемлемости метода необходимо оценить на основе экспериментальных данных совместного пробного испытания, как минимум, требования к рабочим характеристикам метода, перечисленные в приложении I.

32. Методы и связанные с ними данные валидации будут регулярно пересматриваться по мере развития научных знаний и практического опыта, накопленного в ходе валидации и совместных пробных испытаний. Настоящие методические указания дополнены практической информацией о рабочих этапах процесса валидации.

Раздел 3.2.3 — Испытываемые материалы для совместных пробных испытаний

33. В общем, метод должен быть применим и испытан на рассматриваемой матрице (т. е. на которой была составлена какая-либо спецификация).

34. Указание в протоколе влияния материалов/матриц на стадию экстракции важно для любого анализа. Когда сообщается о результатах валидационного исследования, важно, чтобы отчет включал подробную информацию о том, какая матрица была проанализирована и использовался ли очищенный белок или ДНК в качестве мишени для анализа.

Раздел 3.2.4 — Специальная информация о валидации методов

35. Специальная информация о валидации количественных и качественных методов ПЦР приведена в приложениях II и III соответственно.

36. Специальная информация о валидации количественных и качественных методов, основанных на обнаружении белков, приведена в приложении IV.

РАЗДЕЛ 4 — ТРЕБОВАНИЯ К КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА

Раздел 4.1 — Качество работы лаборатории

37. Документ CAC/GL 27 содержит методические указания для лабораторий, участвующих в процессах импорта и экспорта пищевых продуктов. Данные методические указания основаны на соблюдении стандарта ISO/IEC 17025, аттестационных испытаний и внутреннем контроле качества, а также использовании методов анализа, прошедших валидацию в соответствии с требованиями Кодекса.

Раздел 4.2 — Эталонный материал

38. Как правило, для валидации метода требуется подходящий эталонный материал. Существует ряд матриц, которые могут быть использованы для разработки эталонных материалов или рабочих стандартов для методов обнаружения последовательностей ДНК и белков. У каждого из них есть свои преимущества и недостатки в зависимости от конкретных целей. Физическая форма эталонного материала определяет его пригодность для использования с любым из этих методов. У измельченных материалов различия в распределении частиц по размерам между эталонными материалами и обычными пробами могут повлиять на эффективность экстракции целевого белка или ДНК и воспроизводимость метода из-за ошибки отбора проб.

39. Эталонным материалом для ДНК-методов может быть матрица, содержащая аналит, ДНК, извлеченная из матрицы, содержащей аналит, плаزمид, содержащая специфическую ДНК, или, если сертифицированные эталонные материалы отсутствуют, материалы контрольных проб, например, из схем аттестационных испытаний. Необходимо тщательно подойти к выбору ДНК — плазмидной или ампликонной, — для включения в плазмиду или ампликон, чтобы гарантировать, что та или другая ДНК будет соответствовать требуемой цели.

40. Эталонными материалами для методов, основанных на обнаружении белков, могут быть, например, сам белок, очищенный от рекомбинантных микробов (таких как *E. coli*), измельченная растительная матрица (обычно лист или зерно) или обработанная пищевая фракция.

РАЗДЕЛ 5 — ТЕХНИЧЕСКАЯ И МЕТОДОЛОГИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Технические и методологические аспекты методов, основанных на ДНК и обнаружении белков, приведены в следующих источниках:

Allmann M, Candrian U, Hoefelein C and Luethy J (1993). Polymerase Chain Reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Lebensm. Unters. Forsch* 196:248-251.

Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H and Van den Eede G (2002). Analytical methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms (GMO's) in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products. *European Food Research and Technology* 214:3-26.

Asensio L (2007). Review: PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18(11): 558-566.

Asensio L, Gonzalez I, Garcia T and Martin R (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19:1-8.

Carnegie, PR (1994). Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas. Biotechnol.* 4(3):146-9.

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P and Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*. 18(10):1211-1215

Методическое руководство Комиссии Кодекса Алиментариус. Использование аналитических результатов: Планы отбора проб, Взаимосвязь между результатами анализа, Неопределенность измерений, Коэффициенты выхода и Положения Стандарта Кодекса.

CAC/GL 54-2004. Методические указания Кодекса по неопределенности измерений.

Colgan S, O'Brien LO, Maher M, Shilton N, McDonnell K and Ward S (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International* 34(5):409-414.

Dahinden I, von Büren M and Lüthy J (2001). A Quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology* 212(2):228-233.

Dieffenbach CW and Dveksler GS (1993). Setting up a PCR laboratory. *PCR Methods Appl.* 3(2):S2-7.

ISO 5725:1996 Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO 21569:2005 Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO 21570:2005. Foodstuffs - Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO/DIS 24276:2006. Foodstuffs - Nucleic acid based methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO/IEC Standard 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization.

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins R, Lipp M, Shan G, Stave J., and V. Pantella (2007). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*. 85: 3, pp 780-786.

- Holst-Jensen A. and Berdal KG (2004). The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *Journal of AOAC International* 87(4):927-36.
- Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.
- Kwok S and Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339(6221):237-238.
- Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D and Song P (2005) Polymerase Chain Reaction Technology as an analytical tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International* 88 (1):36-155.
- Meyer R, Candrian U (1996). PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 29(1-2):1-9.
- Mifflin TE (2007) Setting Up a PCR Laboratory. *Cold Spring Harbor Protocols* 14 (doi:10.1101/pdb.top14)
- Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJP, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JPPF and Zagon J (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42:1157-1180.
- Newton CR, Herbitter A and Gubler U (1995). PCR: Essential Data. Hoboken (NJ): J. Wiley & Sons.
- Olexova L, Dovičovičová L, Švec M, Siekel P, Kuchta T. (2006). Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control* 17(3):234-237.
- Poms, RE; Klein CL, Anklam E (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21(1):1-31.
- Trapmann S, Burns M, Broll H, Macarthur R, Wood RKS, Žel Jana (2009). Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. *EUR - Scientific and technical research series*. Luxembourg: Office for official publications of the European communities.
- Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli, M and Marmiroli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control*. 21(2):143-149.
- Williams R. (2005). Gene tests served up to tell fine foods from fakes. *Nature* 434:262.
- Woolfe M and Primrose S (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22(5):222-6.

ПРИЛОЖЕНИЕ I: ИНФОРМАЦИЯ, ПОДЛЕЖАЩАЯ РАССМОТРЕНИЮ ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДОВ

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

1. Следует предоставить полное и подробное описание всех компонентов метода. Например, для ПЦР и белковых методов следует всесторонне рассмотреть использование нескольких планшетов. Описание также должно включать информацию об области применения метода, и должна быть четко указана единица измерения, а также:

Цель и актуальность метода

2. Цель метода должна быть указана в самом методе. Метод должен соответствовать цели для предполагаемого использования.

Научное обоснование

3. Следует представить обзор научных принципов, на которых основан метод (например, молекулярная биология, лежащая в основе использования метода ПЦР в реальном времени).

Спецификация прогнозирующей/математической модели, необходимой для метода

4. Технические приемы, основанные на ДНК и обнаружении белков, используемые для обнаружения и количественной оценки последовательностей ДНК и белков, базируются на различных принципах. В ПЦР целевая ДНК амплифицируется экспоненциальным образом. Более того, количественная оценка методом ПЦР в реальном времени часто основана на двух независимых ПЦР-анализах: один для ДНК-мишени и один для последовательности ДНК, специфичной для таксона. В отличие от ПЦР, иммуносорбентные анализы включают связывание одного или нескольких слоев антител с каждой исходной молекулой-мишенью, и усиление сигнала пропорционально количеству молекул-репортеров и, если применимо, времени ферментативной реакции.

5. Если получение результатов основано на математической зависимости, это должно быть четко прописано и зафиксировано (например, методом $\Delta\Delta C_t$ или линией регрессии или калибровочной кривой, полученной другими способами). Должны быть предоставлены инструкции по корректному применению модели. Они могут включать, в зависимости от метода, рекомендуемое количество и диапазон анализируемых уровней, минимальное количество повторных проб и (или) разведений, которые должны быть включены в процесс для обычных анализов, или средние значения и доверительные интервалы для оценки адекватности.

СПЕЦИАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ, НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ ДНК-МЕТОДОВ

6. Для ДНК-процедур необходимо, в частности, предоставить следующую дополнительную информацию:

Пары праймеров

7. Общие методы должны предусматривать определенные пары праймеров и последовательность, на которую они нацелены. Рекомендации относительно эффективности/использования набора праймеров должны быть четко сформулированы, в том числе, подходят ли праймеры для скрининга (отбора) и (или) количественной оценки.

• Длина ампликона

8. Обработка пищевых продуктов, как правило, приводит к деградации ДНК-мишени. Длина амплифицированного продукта может влиять на эффективность ПЦР. Поэтому выбор более коротких размеров ампликона (в разумных пределах) увеличит возможность получения положительного сигнала при анализе продуктов высокой степени переработки. В целом длина амплифицированного фрагмента для последовательности ДНК, специфичной для таксона, и последовательности-мишени должна находиться в одинаковом диапазоне размеров.

- **Является ли метод специфичным для прибора или химического вещества**

9. В настоящее время доступно множество различных типов приборов и химических веществ для измерений в режиме реального времени. Эти приборы и химические вещества могут иметь различные характеристики, такие как стабильность реагентов, характеристики нагрева и охлаждения, что влияет на скорость нарастания и влияет на время, необходимое для всего цикла ПЦР.

10. Помимо различий в системе нагрева и охлаждения, существуют различия в технических приемах и программном обеспечении, используемых для индуцирования и последующей регистрации флуоресценции. Обнаружение и количественная оценка флуоресценции также могут варьироваться в зависимости от используемых регистрирующих приборов и программного обеспечения. Качественные методы, как правило, менее специфичны в отношении конкретных приборов, чем количественные методы.

11. Методы, как правило, зависят от приборов и химических веществ и не могут быть перенесены на другое оборудование и химические вещества без оценки и (или) модификации.

- **проводится ли одноплексная или мультиплексная ПЦР-амплификация**

12. Использование более одного набора праймеров в одной реакции называется мультиплексной ПЦР.

13. Представленная информация должна продемонстрировать робастность метода к межлабораторной переносимости. Это означает, что метод должен был быть испытан по крайней мере еще одной лабораторией, помимо лаборатории, разработавшей метод. Это важное предварительное условие для успешной валидации метода.

СПЕЦИАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ, НЕОБХОДИМАЯ ДЛЯ МЕТОДОВ, ОСНОВАННЫХ НА ОБНАРУЖЕНИИ БЕЛКОВ

14. Для процедур, основанных на обнаружении белков, необходимо предоставить следующую дополнительную информацию:

Применимость анализа

15. Обработка пищевых продуктов, как правило, приводит к распаду или денатурации белка-мишени, что может привести к существенному изменению иммунореактивности. Иммуноанализы должны быть оценены на предмет применимости к мишени в обработанных продуктах. Следует предоставить эмпирические результаты испытания метода на применимость к мишени в обработанных пищевых продуктах.

Хук-эффект

16. В иммунохроматографических полосках на основе антител и анализе с использованием планшета хук-эффект (насыщение) может привести к ложноотрицательному результату. Необходимо обстоятельное обоснование того, что диапазон рабочих концентраций в достаточной степени соответствует практическим потребностям целевых аналитических проб. Поэтому следует предоставить эмпирические результаты испытания на хук-эффект в целевых матрицах.

Подтверждающий метод

17. В ходе выполнения иммуноанализов антитела могут вступать в перекрестную реакцию с другими белками, присутствующими в матрице, поэтому необходимо обосновать избирательность анализов. В качестве подтверждающего метода может быть использован другой метод. Могут быть представлены эмпирические результаты испытания обоих методов с использованием аликвот одних и тех же аналитических проб известной концентрации.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА.

Проверка избирательности

18. Требуется ясность относительно использования в методе соответствующих отрицательных контрольных проб, таких как материал животного и растительного происхождения, различные штаммы или последовательность ДНК-мишени, которые следует использовать с этой целью, если они были определены.

19. Следует предоставить эмпирические результаты испытания метода с использованием ДНК из нецелевых видов/сортов и ДНК из материала эталонных видов/сортов. Это испытание должно включать близкородственные материалы и случаи, когда пределы чувствительности действительно могут быть проверены. Кроме того, может быть целесообразно, особенно для последовательности ДНК, специфичной для таксона, испытать другие источники аналогичных продуктов, чтобы снизить вероятность получения ложноположительного результата.

20. Аналогичным образом, для белковых методов следует предоставить эмпирические результаты испытания метода с белками нецелевых и близкородственных видов/разновидностей/признаков, а также очищенный целевой белок и (или) эталонные положительные контрольные материалы.

Проверка стабильности

21. Эмпирические результаты испытания методов (для обнаружения как эталонных последовательностей, так и последовательностей ДНК-мишеней или белков) с различными видами, подвидами, сортами, культурными сортами, линиями клеток животных или штаммами микроорганизмов, в зависимости от обстоятельств, могут быть предоставлены для демонстрации, например, стабильности числа копий и сохранения последовательности ДНК гена, специфичного для таксона, или стабильности экспрессии белка.

22. Для белковых методов следует предоставить эмпирические результаты испытания методов с использованием целевого материала и полученных из него или в результате его переработки продуктов, в зависимости от обстоятельств, для демонстрации стабильности иммунореактивной формы белка.

Проверка чувствительности

23. Следует предоставить эмпирические результаты испытания метода в различных концентрациях для проверки чувствительности метода. Пределы обнаружения (LOD) могут быть определены с использованием проб, состоящих только из отдельных ингредиентов. Для пищевых продуктов, состоящих из нескольких ингредиентов, фактическая чувствительность будет снижена, так как общий экстракт ДНК будет получен из более чем одного ингредиента, так что начальное количество фактической измеряемой величины будет уменьшено.

24. При необходимости пределы обнаружения должны быть определены для каждого метода и матрицы.

Проверка робастности

25. Следует предоставить эмпирические результаты испытания метода с незначительно, но намеренно измененными параметрами.

Эффективность экстракции

26. Следует предоставить эмпирические результаты испытания метода на эффективность экстракции аналита в каждой матрице, чтобы продемонстрировать достаточность и воспроизводимость извлечения. Для количественного определения, возможно, потребуется предоставить метод калибровки при неполной экстракции аналита.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА

Применимость

27. Следует указать матрицу (например, обработанные пищевые продукты, сырье и т.д.), тип проб и диапазон, к которому может быть применен метод. Следует также учитывать соответствующие

ограничения метода (например, влияние других аналитов или неприменимость к определенным ситуациям). Ограничения могут также включать, насколько это возможно, возможные ограничения, обусловленные затратами, оборудованием или специфическими и неспецифическими рисками, связанными с лаборантом и (или) средой.

Эксплуатационные характеристики и практическая применимость метода

28. Необходимое оборудование для применения метода должно быть четко указано в отношении анализа *как такового* и приготовления проб. Следует также предоставить информацию о затратах, практических трудностях и о любых других факторах, которые могут иметь значение для лаборантов.

Проект эксперимента

29. Следует указать проект эксперимента, включая подробную информацию о количестве серий, проб, повторных проб, разведений и т.д.

Требования к навыкам лаборанта

30. Следует предоставить описание практических навыков, необходимых для надлежащего применения предлагаемого метода.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ КОНТРОЛЬНЫЕ ПРОБЫ

31. При необходимости следует информировать о требовании надлежащего использования контрольных проб при применении метода. Следует четко определить контрольные пробы и зафиксировать интерпретацию их значений. Они могут включать положительные и отрицательные контрольные пробы, их подробное содержание, степень, в которой они должны использоваться, и интерпретацию полученных значений.

32. Необходимо указать следующую информацию.

- Используемые виды аналитических контрольных проб:
 - i. Положительные и отрицательные контрольные пробы.
 - ii. Используемый внутренний контрольный образец, если применимо (сопоставимый или несопоставимый).
 - iii. Другие типы контрольных образцов, такие как матричная контрольная проба (для подтверждения добавления пробы в ПЦР) или экстракционная обработка.
- Контрольные пробы.
- Используемые эталонные материалы.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА

33. Следует предоставить данные о критериях, указанных в разделе 2.2 «Общие критерии метода», а также общую оценку того, подходит ли метод для его целевого назначения.

ПРИЛОЖЕНИЕ II: ВАЛИДАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА ПЦР

ВВЕДЕНИЕ

1. ДНК-анализ обычно проводится с помощью ПЦР. Этот технический прием усиливает определенный сегмент ДНК до такой степени, что его количество может быть измерено инструментально (например, с помощью флуорометрических средств). Операции по переработке пищевых продуктов (например, из-за нагрева, ферментов и механической фрагментации) могут привести к деградации или уменьшению общего количества ДНК. Предпочтительно, чтобы методы были разработаны для амплификации относительно коротких последовательностей ДНК, специфичных для мишени или таксона.

2. Количественные определения часто выражаются в процентах отношения последовательности ДНК, специфичной для мишени, к последовательности ДНК, специфичной для таксона. В таком относительном количественном тесте это измерение фактически включает в себя два определения на основе ПЦР — специфичной для последовательности ДНК-мишени и эндогенной, или специфичной для таксона последовательности. Каждое из этих определений имеет свои собственные неопределенности, и, скорее всего, они будут иметь разные характеристики измерения. В большинстве случаев применения последовательность ДНК-мишени будет присутствовать в низких концентрациях, а специфичная для таксона последовательность ДНК будет присутствовать в концентрациях от 10 до 1000 раз выше. Поэтому важно, чтобы оба измерения были должным образом валидированы. В тех случаях, когда измерение выражается непосредственно в процентах, эти факторы следует учитывать при валидации метода. Результаты могут быть представлены в других единицах измерения, таких как число копий.

3. Как следствие, анализ ДНК, особенно в обработанных пищевых продуктах, направлен на обнаружение очень небольшого количества ДНК, специфичной для мишени, часто в диапазоне наногرامмов/граммов или ниже. Результат количественного ПЦР-анализа часто выражается в % как относительное количество ДНК-мишени по отношению к общему количеству ДНК таксона/вида в анализаторе в конкретной пищевой матрице. Пищевая матрица также может содержать значительное количество ДНК многих других видов/таксонов.

4. Валидация методов состоит из двух этапов. Первый этап — это внутрилабораторная валидация всех вышеперечисленных параметров, за исключением воспроизводимости. Второй этап — это совместное пробное испытание, основным результатом которого является оценка повторяемости и воспроизводимости вместе с подробной информацией о переносимости методов между лабораториями. Настоятельно рекомендуется провести небольшое совместное пробное испытание для проверки общей робастности конкретного метода до того, как будут понесены расходы на организацию крупномасштабного пробного испытания. В случае, если требуется какое-либо усовершенствование метода или его описания, это повлечет небольшие расходы до того, как начнется пробное испытание, в то время как неудача полной межлабораторной валидации метода из-за неоднозначного описания метода обойдется очень дорого. Кроме того, можно отметить, что внедрение уже валидированного метода в лаборатории должно включать необходимые эксперименты для подтверждения того, что внедренный метод работает так же хорошо в местных условиях, как и во время межлабораторной валидации. Важно отметить, что валидация метода должна проходить с использованием условий, при которых он будет использоваться.

ВАЛИДАЦИЯ

5. Количественный ПЦР-анализ должен быть валидирован для предполагаемого использования или применения. Для химических аналитических методов был разработан стандарт ISO 5725:1996 или Согласованный протокол АОАС/ИУРАС. Они определяют процедуры, необходимые для валидации метода. Важно подчеркнуть, что все принципы и правила согласованного протокола применимы к количественным методам ПЦР.

6. Ниже будет подробно обсуждаться ряд параметров, используемых в валидации рабочих характеристик количественного ПЦР-анализа. К ним относятся назначение, LOD (предел

обнаружения) и LOQ (предел количественного определения), правильность, прецизионность, чувствительность и робастность. Другими важными факторами являются критерии приемлемости и интерпретация результатов, а также вопрос о единицах, в которых выражаются результаты.

7. Имеет место общенаучная дискуссия об интерпретации процентных значений. Признается, что до сих пор не существует надежной связи между весом и числом копий из-за неопределенности в соотношении веса ингредиента к числу молекул ДНК. Как соотношение веса к весу, так и расчеты соотношения числа копий к числу копий приемлемы при условии, если это ясно указано при представлении результатов.

8. Все перечисленные ниже параметры, включая избирательность и чувствительность, должны оцениваться индивидуально для каждого из участвующих анализов, включая как эталонные, так и целевые ПЦР-анализы. Они даны в алфавитном порядке, их перечисление не является перечислением в порядке важности.

Применимость

9. Следует указать аналиты, матрицы и концентрации, для которых может быть использован метод анализа.

10. От метода экстракции, независимого от матрицы, к которой он должен быть применен, требуется, чтобы он давал ДНК в достаточном количестве, структурной целостности и чистоте, чтобы можно было провести надлежащую оценку рабочих характеристик последующих этапов метода (например, адекватной амплификации ДНК на этапе ПЦР).

11. В ПЦР-анализе в реальном времени значения C_t могут быть использованы для оценки эффективности ПЦР. Эффективность может быть проверена, например, путем настройки серии разведений матричной ДНК и определения значения C_t (порогового числа циклов, при котором измеренный сигнал флуоресценции пересекает заданное пользователем пороговое значение) для каждого разведения. В идеальной ситуации, когда эффективность амплификации составляет 100%, двукратное уменьшение количества матричной ДНК, добавленной в ПЦР, приведет к увеличению значения C_t на единицу. Следовательно, если ДНК разбавлена в 10 раз, теоретическая разница в значениях C_t между разбавленной и неразбавленной ДНК должна составлять приблизительно 3,32. Теоретические цифры могут быть недостижимы в реальных ситуациях. Значительные отклонения от этой зависимости могут указывать на то, что извлеченная ДНК содержит ингибиторы ПЦР, что раствор ДНК не является однородным или количество ДНК настолько низкое, что стохастическое изменение количества ДНК в реакциях дает ненадежные количественные оценки. Это также относится к реакциям ПЦР с конечной точкой, проводимым с использованием флуоресцентных зондов.

Динамический диапазон — диапазон количественной оценки

12. Назначение методов определяет диапазон концентраций, в котором будет надежно определяться аналит. Относительное количество ДНК, специфичной для таксона, по отношению к общей ДНК в экстракте ДНК будет варьироваться в зависимости от того, была ли ДНК извлечена из одного ингредиента или сложной пищевой матрицы. Этот желаемый диапазон концентраций определяет стандартные кривые, и для адекватного определения взаимосвязи между концентрацией и реакцией следует использовать достаточное количество стандартов, когда это применимо, например, с калибровочными кривыми. Следует продемонстрировать, что взаимосвязь между реакцией и концентрацией является непрерывной, воспроизводимой и должна быть линейной после соответствующего преобразования.

13. Диапазон количественного специфичного для мишени метода может быть рассчитан от близкого к нулю до 100 процентов по отношению к ДНК, специфичной для таксона (w/w). Однако, как правило, валидацию метода осуществляют для диапазона концентраций, который имеет отношение к области применения. Если метод валидирован для заданного диапазона значений, диапазон не может быть расширен без дополнительной валидации. Для определенных областей применения (например, анализа пищевых продуктов или зерна) может быть рассмотрено использование геномной

ДНК для получения стандартной кривой (см. ниже обсуждение использования плазмидной ДНК). Несмотря на легкость установления номинального стандарта в 100%, приготовление стандартизированного раствора с гарантированной концентрацией ниже 0,1% представляет трудность. Кроме того, количество целевых сайтов (последовательность ДНК, подлежащая амплификации) становится настолько малым, что начинают преобладать стохастические ошибки и становится возможным менее надежный анализ.

14. ДНК, используемая в качестве калибратора, должна быть прослежена в обратном направлении (в ее метрологическом значении) до эталона самого высокого метрологического порядка, например, сертифицированного эталонного материала. Диапазон устанавливается путем подтверждения того, что процедура ПЦР обеспечивает приемлемую степень линейности и правильности при применении к образцам, содержащим количества аналита в пределах или в крайних пределах указанного диапазона процедуры.

15. Уникальные характеристики количественной ПЦР накладывают особые ограничения на нижний предел динамического диапазона количественной ПЦР. Это связано с трудностью определения значений LOD и LOQ из-за ненормального распределения значений в этом диапазоне.

Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ)

16. Если валидация количественного анализа ПЦР показывает, что анализ может измерять ДНК при концентрации (например) 0,1% с приемлемой правильностью и прецизионностью, то часто нет необходимости определять LOD и LOQ, поскольку метод применяется только выше диапазона, в котором они актуальны. Однако, если метод используется в концентрациях, близких к LOD и LOQ (обычно 0,01–0,05%), то оценка LOD и LOQ станет частью процедуры валидации.

17. При количественной ПЦР распределение значений измерений для холостых проб не является гауссовым и обычно соответствует распределению Пуассона. Если требуется LOD, это должно быть определено экспериментально. Для количественных методов LOD это количество аналита, при котором аналитический метод обнаруживает присутствие аналита по крайней мере в 95% случаев ($\leq 5\%$ ложноотрицательных результатов).

18. Для количественного метода важно знать, близок ли LOQ для конкретной матрицы к измеряемым значениям. LOQ необходимо определить экспериментально, поскольку измерение распределения для количественной ПЦР не является нормальным распределением.

19. На практике для определения LOQ были использованы две процедуры. Первый подход заключается в анализе ряда обычных проб, которые были дополнены (с введенной добавкой) известными количествами аналита. LOQ — это уровень, на котором изменчивость результата соответствует определенным заданным критериям (таким как ± 2 стандартных отклонения (SD) от самой низкой точки данных калибровки и т.д.). Однако экстракция ДНК из некоторых матриц, например крахмалов или кетчупа, может быть затруднена, и, возможно, придется согласиться на более низкую эффективность экстракции. Когда эффективность экстракции низкая, это должно быть указано в данных валидации и в аналитическом отчете. Более полный подход заключается в испытании метода с использованием ряда проб, содержащих известные количества аналита. Это сложнее, поскольку требует доступа к значительному количеству эталонных материалов, которые содержат известный диапазон концентраций интересующих последовательностей ДНК.

Практическая применимость

20. Практическую применимость метода следует оценивать с учетом таких параметров, как: количество проб, которые могут быть обработаны в течение заданного времени, предполагаемые постоянные затраты на реализацию метода и приблизительная стоимость для одной пробы, практические трудности при ежедневном использовании или в определенных условиях, а также другие факторы, которые могут иметь значение для лаборантов.

Стандартное отклонение повторяемости (RSD_r)

21. Относительное стандартное отклонение повторяемости для этапа ПЦР должно составлять $\leq 25\%$ во всем динамическом диапазоне метода.

Стандартное отклонение воспроизводимости (RSD_R)

22. Относительное стандартное отклонение воспроизводимости для этапа ПЦР должно быть ниже 35% на большей части динамического диапазона, за исключением предела количественной оценки, где RSD_R может быть выше.

Робастность

23. Робастность — это показатель способности аналитической процедуры не подвергаться влиянию незначительных, но намеренных изменений параметров метода и служит показателем ее надежности при нормальном использовании. Примеры таких вариаций включают: объемы реакции (например, 29 против 30 мкл), температура отжига (например, $\pm 1^\circ\text{C}$) и (или) другие соответствующие изменения. Эксперименты должны быть выполнены, по крайней мере, с тремя повторами. Реакция анализа в отношении этих небольших изменений не должна отклоняться более чем на $\pm 35\%$ в экспериментах по воспроизводимости от реакции, полученной в исходных условиях.

24. Адекватность испытания робастности процедуры к изменению параметров должна быть продемонстрирована на основе других методов. Например, для метода ПЦР в реальном времени в идеале следует учитывать следующие факторы и их первопричину и (или) источник: различные модели термоциклеров, ДНК-полимеразу, урацил-п-гликозилазу, концентрацию хлорида магния, прямую и обратную концентрацию праймера, концентрацию зонда, температурный профиль, временной профиль, концентрации дезоксирибонуклеозидтрифосфата (включая дезоксиуридинтрифосфат, если применимо).

Чувствительность

25. Для количественного метода ПЦР должна быть получена линейная зависимость C_t в виде логарифмической функции от матричной концентрации во всем диапазоне метода. Следует указать коэффициент корреляции, Y -пересечение и наклон линии регрессии. % остатка для каждого из калибраторов предпочтительно должен составлять $\leq 30\%$.

26. Помимо представления параметров кривой, предлагается определить, какой диапазон значений наклона является приемлемым для проведения количественной оценки, поскольку также важно рассчитать эффективность реакции. (Например, от -2,9 до -3,3 для обнаружения ДНК или соответствующих оптимальных значений, которые указывают на эффективность амплификации, близкую к 100%).

27. В тех случаях, когда ΔC_t -метод используется лабораторией вместо количественного метода, основанного на калибровке, обязанностью химика-аналитика будет гарантировать, чтобы общее количество ДНК находилось в пределах диапазона, для которого был валидирован анализ.

Избирательность

28. Избирательность метода должна быть продемонстрирована путем предоставления экспериментальных данных. Демонстрационные испытания должны включать анализ проб, содержащих смесь целевой ДНК (мишени) и нецелевой ДНК, где действительно испытываются пределы обнаружения (если это соответствует динамическому диапазону). Поскольку метод должен быть избирательным для ДНК-мишени, он должен давать положительный результат только при использовании пищевой матрицы, содержащей ДНК-мишень.

29. Праймеры и зонды должны были быть проверены в соответствующих базах данных последовательностей на предмет возможных гомологий с другими последовательностями, потенциально присутствующими в определенных матрицах, в соответствии с предполагаемым использованием. После такой оценки следует экспериментально продемонстрировать избирательность.

30. Для анализов, селективных по ДНК-мишени. Экспериментальные доказательства избирательности для ДНК-мишени должны включать:

- Анализы по крайней мере десяти образцов из разных партий или партий пищевых продуктов или ингредиентов, в которых отсутствуют последовательности ДНК-мишеней, хотя образцы должны содержать ДНК, специфичную для таксона. Все эти анализы должны дать

отрицательный результат. Например, если ДНК-мишень соответствует определенному событию трансформации растений с рекомбинантной ДНК, пробы могут быть получены из других (нецелевых) событий трансформации, а также из растений с нерекомбинантной ДНК, принадлежащих к одному и тому же виду.

- Следует протестировать соответствующее количество проб ДНК из каждого источника.
- Для каждой пробы ДНК следует проанализировать две повторные пробы, которые должны дать результаты в пределах Ct равном 0,5.

31. Результаты испытаний должны четко указывать на то, что никаких существенных показаний приборов или химических влияний не наблюдается.

32. Для анализа последовательностей ДНК, специфичных для таксона. Экспериментальные доказательства избирательности таксона должны включать:

- Анализы по меньшей мере десяти образцов из разных партий или партий пищевых продуктов или ингредиентов, полученных из организмов, принадлежащих к интересующему таксону, но классифицированных в разных категориях таксонов. Все эти анализы должны дать положительный результат. Например, если специфичность таксона предположительно соответствует виду растения, такому как кукуруза, пробы могут соответствовать сортам кукурузы с различным генетическим происхождением.
- Анализы по меньшей мере десяти проб из разных партий или партий аналогичных пищевых продуктов или ингредиентов, полученных из организмов, не принадлежащих к интересующему таксону, которые могут присутствовать в соответствующих пищевых матрицах. Все эти анализы должны дать отрицательный результат. Например (и продолжая предыдущий пример), если первые десять анализов были применены к различной кукурузной муке, во второй группе анализов может быть уместно провести анализ пшеничной/соевой/рисовой муки.
- Следует протестировать соответствующее количество проб ДНК из каждого источника.
- Для каждой пробы ДНК следует проанализировать две повторные пробы, которые должны дать результаты в пределах Ct равном 0,5.

33. Результаты испытаний должны четко указывать на то, что никаких существенных показаний приборов или химических влияний не наблюдается.

Правильность

34. Правильность любого метода должна определяться путем сравнения результатов, полученных в ходе анализа эталонного материала, с известным или присвоенным значением для этого эталонного материала. Следует учитывать влияние матрицы проб, особенно когда матрица проб отличается от матрицы эталонного материала.

35. Значение правильности $\pm 25\%$ в отношении этапа ПЦР должно быть приемлемым во всем динамическом диапазоне.

БИБЛИОГРАФИЯ К ПРИЛОЖЕНИЮ II

AOAC (2002). International Methods Committee: Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.

Cankar K, Štebih D, Dreo T, Žel J, Gruden K (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6(37).

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P and Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18(10):1211-1215.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Huebner P, Waiblinger HU, Pietsch K and Brodmann P (2001). Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International* 84(6):1855-1864.

Kay S and Van den Eede G (2001). The limits of GMO detection. *Nature Biotechnology* 19(5):504.

Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli, M and Marmiroli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control*. 21(2):143-149.

ПРИЛОЖЕНИЕ III: ВАЛИДАЦИЯ КАЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА ПЦР

Введение

1. Качественная ПЦР, насколько это представляется возможным, должна быть валидирована тем же способом, каким она будет использоваться в обычных анализах, — это означает, что чувствительность метода должна быть такой, чтобы он мог надежно обнаружить положительно определенную пробу и не приводил к значительному количеству ложноположительных результатов.

2. По самой своей природе качественные результаты испытаний относятся к идентификации выше/ниже предела обнаружения. Как и предел обнаружения для количественных методов, предел обнаружения для качественного метода может быть определен как концентрация, при которой положительно определенная проба дает положительный результат по крайней мере в 95% случаев. Это приводит к частоте ложноотрицательных результатов 5% или менее. Это также выражается в виде соотношения или процента.

Показатель ложноположительных результатов

3. Это вероятность того, что известная отрицательная испытательная проба была классифицирована методом как положительная. Для удобства этот показатель может быть выражен в процентах:

% ложноположительных результатов =

$$= 100 \times \frac{\text{количество неправильно классифицированных известных отрицательных проб}}{\text{общее количество известных отрицательных проб}}$$

Показатель ложноотрицательных результатов

4. Это вероятность того, что известная положительная испытательная проба была классифицирована методом как отрицательная. Для удобства этот показатель может быть выражен в процентах:

% ложноотрицательных результатов =

$$= 100 \times \frac{\text{количество неправильно классифицированных известных положительных проб}}{\text{общее количество известных положительных проб}}$$

Примечание. Поскольку существуют различные определения, используемые для показателей ложноположительных и ложноотрицательных результатов, в отчете о валидации следует уточнить, какое из них было использовано.

5. Чтобы продемонстрировать показатель ложноотрицательных результатов для качественного анализа, необходимо проанализировать серию проб с постоянной известной концентрацией положительно определенного материала в пуле отрицательно определенного материала и оценить результаты. Важно отметить, что концепция доверительных интервалов и статистической неопределенности также должна применяться к риску ложноположительных и (или) ложноотрицательных результатов. Желаемый уровень достоверности определяет размер и количество пулов, которые необходимо испытать.

Робастность

6. Как и в случае любого валидированного метода, следует предпринять целесообразные усилия, чтобы продемонстрировать робастность анализа. Это включает тщательную оптимизацию и исследование влияния небольших изменений в методе по техническим причинам, как описано в приложении для количественной ПЦР.

ПРИЛОЖЕНИЕ IV: ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА, ОСНОВАННОГО НА ОБНАРУЖЕНИИ БЕЛКА КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

1. Приведенное ниже описание процедуры является лишь одной из нескольких возможностей для проведения иммунологического анализа на выявление интересующих белков.
2. Например, в типичном ИФА для белков измеряют количество репортерного вещества в результате ферментативной реакции. Стандартная кривая формируется путем построения графика оптической плотности (OD) на оси Y относительно концентрации стандартов на оси X, получения кривой доза-реакция с использованием уравнения второго порядка или другой требуемой модели подбора кривой из метода. Чтобы получить точное количественное значение, OD для анализируемых растворов пробы должна соответствовать линейной части калибровочной кривой. Если OD слишком высока, раствор пробы необходимо разбавлять до тех пор, пока OD не попадет в диапазон количественной оценки анализа. Концентрация белкового аналита в исходной пробе рассчитывается путем корректировки на каждый коэффициент разбавления, который был введен при подготовке пробы для нанесения на микропланшет. Для расчета коэффициента разбавления используется начальный вес пробы и объем экстракционной жидкости, а также все последующие разведения.
3. Для демонстрации рабочих характеристик анализа могут быть использованы различные контрольные пробы. Холостая проба, такая как пустая лунка или буферный раствор, может быть запущена в анализ параллельно для определения любой фоновой реакции, которая при необходимости может быть вычтена из реакций на пробу и калибровку. Отрицательная контрольная проба (т. е. раствор экстракта матрицы, для которого известно отсутствие аналита) должен использоваться для демонстрации любой неспецифической реакции или интерферирующих влияний матрицы, возникающих при анализе. Для демонстрации точности испытания можно запустить в анализ положительную контрольную пробу или экстракт матрицы с введенной добавкой известного количества аналита. Стандарты и пробы могут быть запущены в анализ с соответствующим количеством повторов для оценки прецизионности испытания. Холостые пробы, отрицательные контрольные пробы, положительные контрольные пробы, эталонные материалы и повторные пробы могут быть запущены в анализ на каждом микропланшете для контроля вариаций между планшетами.

ЭТАЛОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4. Когда это применимо, эталонный материал состоит из той же матрицы, что и целевая аналитическая проба, подлежащая испытанию. Обычно он включает в себя отрицательные контрольные и положительные эталонные материалы. Например, если испытываемой матрицей является соевая мука, стандартизированным положительным эталонным материалом будет соевая мука, содержащая известную долю интересующего белка. Как вариант, может быть использован чистый образец или экстракт интересующего белка, при условии, что использование таких белковых эталонных материалов было валидировано на рассматриваемой матрице. В некоторых случаях эталонная матрица может быть недоступна. Доступ к эталонным материалам важен при разработке, валидации и использовании иммуноанализов для анализа белков в пищевой матрице. Для соблюдения нормативных требований и требований к испытаниям следует использовать наиболее доступные эталонные материалы.
5. Там, где доступны продукты питания или пищевые ингредиенты с аналитом и без него, довольно просто приготовить контрольную пробу с известной долей целевого материала. В других случаях создание контрольных проб для определенных матриц и аналитов может быть затруднено. Стабильность и однородность являются важными аспектами. Например, если испытываемая матрица состоит из смеси материалов, лаборанту необходимо будет объединить материалы таким образом, чтобы получить однородную контрольную пробу с известным количеством белка. Стабильность этих материалов необходимо будет оценить в условиях хранения и испытаний.

ВАЛИДАЦИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА, ОСНОВАННОГО НА ОБНАРУЖЕНИИ БЕЛКА

6. Принципы валидации методов, определенные в согласованном стандарте ISO/IUPAC/AOAC, применимы к белковым методам.

7. Параметры валидации количественного метода включают точность/правильность, избирательность, эффективность экстракции, чувствительность, диапазон количественной оценки, прецизионность, робастность, применимость и практичность.

8. Точность демонстрируется путем измерения выхода аналита из проб с введенной добавкой, состоящей из известного количества аналита, и сообщается как среднее значение выхода на нескольких уровнях в количественном диапазоне.

9. Выход интересующих белков должен определяться путем сравнения результатов, полученных в ходе анализа эталонного материала, с известным или присвоенным значением для этого эталонного материала. Следует учитывать влияние матрицы проб, особенно когда матрица проб отличается от матрицы эталонного материала. Выход должен составлять от 70 до 120%.

10. Эффективность экстракции — это показатель того, насколько эффективен данный метод экстракции при отделении белкового аналита от матрицы. Она выражается в процентах аналита, выделенного из пробы. Может быть трудно достоверно продемонстрировать эффективность процедуры экстракции. Возможно, что не существует альтернативного метода обнаружения, с которым можно сравнить результаты иммуноанализа. Один из подходов к повышению эффективности экстракции заключается в демонстрации выхода целевого белкового аналита из каждого типа пищевой фракции путем исчерпывающей экстракции, т. е. многократного получения выхода из пробы до тех пор, пока не будет обнаружено больше белка.

11. Промежуточная прецизионность описывает, насколько велика вариация в пределах анализа. Это может быть оценено путем определения разницы между повторными пробами (% коэффициента вариации), анализируемыми при различных концентрациях на стандартной кривой, и на объединенной вариации (RSD_r), полученной из значений поглощения в стандартах из независимых анализов, проведенных в разные дни. Промежуточная прецизионность описывает, насколько велики различия между отдельными анализами, и может быть измерена путем анализа контрольных проб на каждом микропланшете. Требуемые пробы для контроля качества будут состоять из двух пулов экстрактов: одного экстракта из целевых проб, содержащих аналит, и одного экстракта из контрольных проб. Если белок стабилен в экстракте, его можно хранить замороженным, а часть размораживать и анализировать на каждом микропланшете. Промежуточная прецизионность может быть оценена за какое-то время и выражена в процентах коэффициента вариации.

12. Относительное стандартное отклонение повторяемости (RSD_r) должно составлять $\leq 25\%$ во всем динамическом диапазоне метода.

13. Относительное стандартное отклонение воспроизводимости результатов (RSD_R) должно быть ниже 35% при целевой концентрации и на большей части динамического диапазона, за исключением предела количественной оценки, где оно может быть больше.

14. Согласованность результатов разных разведений или линейность используются для подтверждения того, что анализ способен давать эквивалентные результаты независимо от того, где в количественном диапазоне стандартной кривой интерполируется OD пробы. Для проведения этих экспериментов пробы, которые являются положительными для целевого белка, в идеальном случае разбавляются таким образом, чтобы по крайней мере три разведения приводили к значениям, охватывающим количественный диапазон кривой. Коэффициент вариации скорректированных результатов от нескольких разведений экстракта одной пробы в идеале должен составлять $\leq 20\%$.

Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ)

15. Стоит отметить, что если установлено, что LOD или LOQ намного ниже диапазона, в котором предполагается использовать метод, точное определение не требуется. Это было бы справедливо, например, когда LOD находится в диапазоне 1 нг/кг, в то время как диапазон валидации метода распространяется только на концентрации в диапазоне мкг/кг.

16. Общепринятой практикой при оценке LOD является предположение, что это уровень сигнала холостой пробы, увеличенный в три раза по сравнению со стандартным отклонением холостой пробы. Этот метод дает в лучшем случае приблизительную оценку и основывается на нормальном гауссовом распределении холостых измерений вокруг нуля. Как правило, этот подход приемлем для таких методов, как ИФА, но LOD лучше всего определять экспериментально. В качестве альтернативы LOD обычно определяется как концентрация, равная наименьшему стандарту, используемому в анализе, если с этим стандартом будет систематически получено положительное значение.

17. Для количественного метода важно знать, близок ли LOQ для конкретной матрицы к измеряемым значениям.

Перекрестная реактивность

18. Перекрестная реактивность — это степень, в которой аналоги или другие молекулы могут связываться с подлежащими обнаружению антителами, и поэтому ее следует охарактеризовать и описать в методе. Отсутствие перекрестной реактивности следует оценивать с использованием экспериментальных результатов испытания метода с белками или молекулами из нецелевых и близкородственных таксонов, очищенного целевого белка или эталонных положительных контрольных материалов. Потенциал влияния помех со стороны реагентов и лабораторного оборудования можно оценить путем анализа экстрактов из материала, не содержащего аналита.

Влияние матрицы

19. Если на реакцию метода влияет вещество в конечном экстракте, отличное от конкретного белкового аналита, неспецифическая реакция называется влиянием матрицы. Одним из способов контроля за влиянием матрицы является демонстрация того, что аналитический метод дает аналогичные результаты для экстракта как с матрицей проб, так и без нее. При таком подходе свобода от влияния матрицы должна быть продемонстрирована во всех матрицах, для которых будет использоваться анализ. Другим подходом (хотя и менее предпочтительным) к контролю за влиянием матрицы может быть приготовление стандартных растворов в экстрактах из матрицы, не содержащей аналита. Это обеспечит согласованность любых влияний матрицы между стандартами и пробами.

Робастность

20. Робастность — это показатель способности аналитической процедуры не подвергаться влиянию незначительных, но намеренных изменений параметров метода и служит показателем ее надежности при нормальном использовании. Примеры таких изменений включают: объемы реакции, температуру инкубации (например, $\pm 1^\circ\text{C}$ для инкубации в печи и $\pm 4^\circ\text{C}$ для инкубации при «комнатной температуре») и (или) другие соответствующие изменения. Эксперименты должны быть выполнены, по крайней мере, с тремя повторами, и необходимо рассчитать количество выхода. Реакция анализа в отношении этих небольших изменений не должна отклоняться более чем на $\pm 30\%$ от реакции, полученной в исходных условиях.

КАЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ

21. Иммунохроматографические полоски являются удобными инструментами для проведения испытаний на месте или в полевых условиях, хотя для качественного тестирования также могут использоваться другие иммуносорбентные анализы, такие как традиционные методы ИФА. Для обеспечения надежных результатов анализы должны быть валидированы, а описание рабочих характеристик должно включать чувствительность, избирательность, применимость, предел обнаружения, робастность, влияние матрицы и, если применимо, хук-эффект.

ВАЛИДАЦИЯ КАЧЕСТВЕННОГО МЕТОДА, ОСНОВАННОГО НА ОБНАРУЖЕНИИ БЕЛКА

22. К качественному испытанию, основанному на обнаружении белка, применяются те же принципы, что и к качественному ПЦР-тестированию. Поэтому эти подходы, включая расчет показателей ложноположительных и ложноотрицательных результатов, могут быть применены к методам, основанным на обнаружении белков. В целом, из-за надежного характера методов, основанных на обнаружении белков на иммунохроматографических полосках, их выполнение не дублируется для

каждой пробы. Однако при тестировании методом ИФА (из-за его количественного характера) обычно используются дубликаты лунок.

Применимость

23. Следует указать аналиты, матрицы и концентрации, для которых может быть использован метод анализа.

24. Экстракция белка может быть ключевым фактором в эффективности белкового метода, и используемые буферы также могут влиять на рабочие характеристики этапа обнаружения. Таким образом, требуется тщательная оптимизация для обеспечения надежности методов обнаружения белка. Для метода должны быть установлены критерии определения LOD. Для подтверждения LOD качественных анализов могут использоваться уровни обогащения, близкие к LOD, при условии, что один из используемых уровней соответствует критерию быть выше, но близким к LOD. Несмотря на то, что такие процедуры могут дать представление об эффективности метода, пробы с внесением с хорошо известными характеристиками (если таковые имеются) являются наилучшей матрицей для определения применимости метода.

Практическая применимость

25. Практическую применимость метода следует оценивать с учетом таких параметров, как: количество проб, которые могут быть обработаны в течение заданного времени, предполагаемые постоянные затраты на реализацию метода и приблизительная стоимость для одной пробы, практические трудности при ежедневном использовании или в определенных условиях, а также другие факторы, которые могут иметь значение для лаборантов.

БИБЛИОГРАФИЯ К ПРИЛОЖЕНИЮ IV

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins GR, Lipp M, Shan G, Stave JW and Pantella V. (2006). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *AOAC International* 89:913-928

Guidelines for the Validation and Use of Immunoassays for Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients. Lipton et al., *Food and Agricultural Immunology*, 2000, 12, 153-164.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

ISO 21572:2004. Foodstuffs-Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products-protein based methods. Geneva: International Organization for Standardization.

Mihaliak CA and Berberich SA (1995). Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration, in: Nelson JO, Karu AE and Wong RB (eds.) *Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies. ACS Symposium Series 586:288-300.*

Stave JW (1999). Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO: future needs. *Food Control* 10:367-374.

Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, Magin KM, Astwood JD, Bhakta NS, Leach JN, Sanders PR and Fuchs RL (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready(R) soybeans. *Food Control* 10(6):407-414.

USDA (2004). U.S. Department of Agriculture/Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration Directive 9181.2. [Online] <http://archive.gipsa.usda.gov/reference-library/directives/9181-2.pdf>.

ПРИЛОЖЕНИЕ V КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ АНАЛИТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ ПЦР

1. Как минимум, следующие критерии приемлемости являются общими для всех количественных методов ПЦР и применимы к каждому запуску ПЦР:

- Среднее значение повторных положительных контрольных проб ДНК-мишени при соответствующей концентрации отклоняется менее чем на 3 стандартных отклонения от заданного значения. Когда это применимо, контрольная проба ДНК-мишени определяется как эталонная ДНК или ДНК, извлеченная из сертифицированного эталонного материала или известного как положительная проба, представляющая исследуемую последовательность или организм. Контрольная проба предназначена для демонстрации того, каким должен быть результат анализа испытательных проб, содержащих целевую последовательность.
- Контрольные пробы в реагентах для амплификации не должны приводить к усилению сигнала выше фонового шума. Контрольная проба в реагентах для амплификации определяется как контрольная проба, содержащая все реагенты, за исключением извлеченной матричной ДНК испытательной пробы. Вместо матричной ДНК в реакцию добавляют соответствующий объем реагента, не содержащего нуклеиновых кислот (например, воду или буфер).

2. Чтобы принять результат неизвестной пробы, относительное стандартное отклонение повторных проб должно составлять $\leq 35\%$.