|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ**  **(ЕАСС)**  **EURO-AZIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION**  **(EASC)** | | |
|  | **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ**  **СТАНДАРТ** | **ГОСТ ISO 21572**  *(проект KZ, первая редакция)* |
| **Продукты пищевые**  **МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И ПРОИЗВОДНЫХ ПРОДУКТОВ**  **Методы, основанные на протеине** | | |
| (ISO 21572:2019, IDT) | | |
| *Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его принятия* | | |

**Минск**

###### Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

**202**

**Предисловие**

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

**Сведения о стандарте**

1 ПОДГОТОВЛЕН РГП «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № от 20 г.).

За принятие стандарта голосовали:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Краткое наименование страны  по МК (ИСО 3166) 004–97 | Код страны  по МК (ИСО 2166) 004–97 | Сокращенное наименование национального органа по стандартизации |
|  |  |  |

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту   
ISO 21572:2019 Продукты пищевые. Анализ с применением молекулярных биомаркеров. Иммунохимические методы обнаружения и количественного определения белков (Foodstuffs - Molecular biomarker analysis - Immunochemical methods for the detection and quantification of proteins, IDT)

Международный стандарт ISO 21572:2019 разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, Продовольственные продукты, Подкомитетом SC 16, Горизонтальные методы для молекулярного биомаркерного анализа

Перевод с английского языка (en)

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в национальном органе по стандартизации

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

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылки на международные стандарты актуализированы

Степень соответствия – идентичная (IDT)

###### 5 ВЗАМЕН ГОСТ ISO 21572-2009

*Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.*

*В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты».*

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Содержание** | | | |  |
|  | | | |  |
| Введение | | | | 6 |
| 1 | Область применения | | | 8 |
| 2 | Нормативные ссылки | | | 8 |
| 3 | Термины и определения | | | 8 |
| 4 | Принцип | | | 9 |
| 5 | Реактивы | | | 9 |
| 6 | Лабораторное оборудование | | | 9 |
| 7 | Отбор проб | | | 9 |
| 8 | Процедура | | | 9 |
|  | 8.1 | Общие положения | | 9 |
|  | 8.2 | Приготовление раствора образца | | 10 |
|  | 8.3 | Экстракция | | 10 |
|  | 8.4 | Подготовка калибровочных кривых, положительных контрольных проб и стандартных образцов | | 11 |
|  | 8.5 | Процедура анализа | | 11 |
| 9 | Интерпретация и представление результатов | | | 11 |
|  | 9.1 | Общие положения | | 11 |
|  | 9.2 | Количественный и полуколичественный анализ | | 12 |
|  | 9.3 | Качественный анализ | | 12 |
| 10 | Специфические факторы, которые могут повлиять на результаты | | | 12 |
|  | 10.1 | Общие положения | | 12 |
|  | 10.2 | Особые примечания | | 13 |
|  |  | 10.2.1 | Избирательность | 13 |
|  |  | 10.2.2 | Эффективность экстракции | 14 |
|  |  | 10.2.3 | Эффект матрицы образца | 14 |
|  |  | 10.2.4 | Применимость анализа | 14 |
|  |  | 10.2.5 | Хук эффект (эффект сползания или высокой дозы) | 15 |
|  |  | 10.2.6 | Параллельность/линейность | 15 |
|  |  | 10.2.7 | Предел обнаружения | 15 |
|  |  | 10.2.8 | Предел измерения при количественном анализе | 15 |
| 11 | Подтверждающий метод | | | 16 |
| 12 | Протокол испытаний | | | 16 |
| Приложение А (информационное) Обнаружение белков методом ИФА (Иммуноферментный анализ) | | | | 18 |
| Приложение В (информационное) Обнаружение белка или белков с помощью устройства, основанное на принципе растекания жидкости в радиальном направлении (LFD) | | | | 33 |
| Библиография | | | | 43 |

**Введение**

Аналитические методы, основанные на высокоспецифичных иммунохимических связывающих взаимодействиях, стали ключевыми инструментами для анализа различных химических и макромолекулярных анализируемых веществ, включая белки. Методы, использующие эти способы, широко распространены в научных и нормативных кругах. Иммунохимические методы анализа наиболее часто используются для выявления (наличия или отсутствия) и/или количественно определяют специфические белковые анализируемые вещества, такие как аллергенные белки, маркерные белки заболеваний или недавно обнаруженные белки в биотехнологических культурах.

Перед анализом образцы, как правило, должны быть измельчены или обработаны таким образом, чтобы облегчить экстракцию анализируемого вещества из матрицы образца. Важным шагом в развитии аналитического метода является выбор подходящего экстракционного буфера, который не мешает производительности аналитического метода и который обеспечивает соответствующий уровень стабильности анализируемого вещества в процессе аналитической обработки.

Процесс иммунохимического анализа обычно включает, по меньшей мере, два этапа:

- связывание или захват интересующего анализируемого вещества, присутствующего в образцах, с антителом, нацеленным специфически к анализируемому веществу;

- обнаружение комплекса антитело - анализируемое вещество с использованием метода, который сигнализирует о специфическом взаимодействии.

После того, как аналитический метод был разработан и оптимизирован, он должен быть подтвержден для демонстрации того, что его производительность надежна и пригодна для предполагаемого использования и характеризует метод ограничения. Это включает в себя проведение нескольких экспериментов с реальными образцами для оценки таких параметров как точность, прецизионность, чувствительность, селективность и пределы обнаружения или количественной оценки. Утверждение также позволяет установить критерии эффективности метода, в соответствии с которыми рутинная эффективность аналитической работы можно сравнить, чтобы обеспечить последовательное представление приемлемых аналитических результатов.

В настоящем стандарте приводится набор общих процедур и аналитических решений для использования иммунохимических методов анализа белков-мишеней. В настоящем стандарте рассматриваются аспекты обработки образцов, экстракция, настройка анализа, интерпретация и представление результатов, а также соответствующие параметры выполнения анализа. Включены два приложения, содержащие примеры процедур, которым можно следовать, когда анализ исследуемых белков (POI) в различных фоновых матрицах с использованием методов, основанных на иммуноферментных анализах (Elisa) и устройстве, основанном на принципе растекания жидкости в радиальном направлении (электрофорез) (LFDs).

|  |
| --- |
| **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ** |
| **Продукты пищевые**  **МЕТОДЫ АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И ПРОИЗВОДНЫХ ПРОДУКТОВ**  **Методы, основанные на протеине** |
|  |

**1 Область применения**

Настоящий стандарт устанавливает критерии выполнения иммунохимических методов обнаружения и/или количественного определения специфических белков или исследуемых белков [POI] в установленной матрице.

Рассмотренные методы применимы для анализа белков из различных типов образцов. Некоторые использования этих методов включают, но не ограничиваются анализом белков, участвующих в выращивании сельскохозяйственных культур и производстве пищевых продуктов, пищевой промышленности, маркетинге пищевых продуктов, безопасности пищевых продуктов, биотехнологии или индексации заболеваний.

**2 Нормативные ссылки**

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный документ по стандартизации. Для датированной ссылки применяет только указанное издание ссылочного документа, для недатированной ссылки применяет последнее издание ссылочного документа (включая его изменения).

ISO 16577 Molecular biomarker analysis — Terms and definitions (Биомаркерный молекулярный анализ. Термины и определения)

**3 Термины и определения**

В настоящем стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями.

Примечание – ISO и IEC ведут терминологические базы данных для использования в стандартизации по следующим адресам:

- IEC Electropedia: доступно на <http://www.electropedia.org/>

- Платформа интернет-просмотра ISO: доступно на <http://www.iso.org/obp>

**3.1 конъюгат** (conjugate): Соединение, полученное путем объединения двух или более веществ.

Примечание - Конъюгаты антител с флуорохромами (окрашенными частицами), веществами с радиоактивной меткой или ферментами часто используются в иммунологическом анализе.

**Проект, первая редакция**

**4 Принцип**

Искомый белок экстрагируется в соответствии с процедурой, описанной для конкретной специфической матрицы и для определения или измерения концентрации исследуемых белков (POI) в образце используется специфическое антитело. Для обнаружения специфических белков в ингредиентах, основной принцип белкового метода заключается в том, чтобы:

- взять репрезентативную выборку матрицы;

- извлечь белки;

- обнаружить и / или количественно определить специфический белок, полученный из исследуемой матрицы.

**5 Реактивы**

При анализе используются только реактивы с известной аналитической степенью чистоты и только деионизованная и дистиллированная вода или вода, прошедшая очистку, или ее эквивалент.

Прочие реактивы, такие как антитела, конъюгаты, субстрат, стоп-растворы и компоненты буферных растворов, являются специфическими для данного метода. Необходимо обязательно изучить методику для получения дополнительной информации по специфическим реактивам, таким как стандартные образцы белка или стандартные образцы известного состава, антитела, иммобилизованные на твердой фазе или в свободном состоянии, контрольные и анализируемые образцы.

Реактивы указаны в A.4.2, A.4.3, B.4.2 и B.4.3.

**6 Лабораторное оборудование**

Используемые инструменты и оборудование определены в А.5 и В.5.

**7 Отбор проб**

Отбор проб не является частью метода, указанного в настоящем стандарте. Приложения А и В предусматривают инструкции по отбору проб согласно соответствующим методам. Рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны пришли к договоренности по данному вопросу.

**8 Процедура анализа**

**8.1 Общие положения**

Условия хранения и срок годности устройств, основанных на принципе растекания жидкости в радиальном направлении (электрофорез) (LFDs), антител, конъюгата, субстрата и т.д. должны быть четко указаны поставщиком.

Следует использовать лабораторное оборудование с низким связыванием белков (полипропиленовые пробирки) во избежание адсорбции белков в процессе всей процедуры. Для использования настоящего стандарта в испытательных лабораториях должны соблюдаться общие требования контроля качества (касающиеся калибровки оборудования, измерения с повторами, использования контрольных образцов, стандартных образцов, построения калибровочных кривых). Необходимо выполнить тщательную очистку всего оборудования, имевшего прямой контакт с образцом для предотвращения контаминации. Дополнительную информацию см. в ISO/IEC 17025.

**8.2 Приготовление раствора образца**

Приготовление растворов образца проводится сразу после отбора репрезентативного образца. Процедуры приготовления растворов приводятся в приложениях А и В.

При необходимости перед отбором для анализа образцы измельчаются в соответствии с рекомендациями метода. Порошок/мука обладают свойством набухания, поэтому для данных материалов может потребоваться больше объема раствора для экстракции, если в методе изготовителя не указана данная информация. Если проба используется не сразу, следует выполнять лабораторную процедуру для хранения (например -20° или ниже).

Необходимо взвесить достаточное количество (определено в А.6.6.1 и В.6.2.1) репрезентативного испытательного образца с целью получения необходимого количества анализируемого образца, из которого будет проводиться экстракция. Добавить раствор для экстракции, гомогенизировать или размешать.

Лабораторные образцы, содержащие большое количество жира, могут быть негомогенными, в этом случае следует отбирать для экстракции больший объем образца. Соответствующее руководство приводится в приложениях А и В.

**8.3 Экстракция**

Необходимо использовать процедуру экстракции, соответствующую для матрицы. Условия экстракции/разведения образцов для анализа, контрольных и стандартных образцов, подробно описаны в приложении А для ИФА (Иммуноферментный анализ) и Приложения B для LFDs. Необходимо соблюдать меры предосторожности при применении процедуры экстракции, проверенные для матрицы. Извлеченные образцы должны сразу использоваться или обрабатываться в соответствии с установленным порядком хранения.

**8.4 Подготовка калибровочных кривых, положительных контрольных проб и стандартных образцов**

Для подготовки калибровочных кривых, положительных контрольных проб и стандартных образцов для Приложения А, рекомендуется использовать стандартные образцы с совпадающей матрицей образца или стандартные образцы, проверенные для данной матрицы. Калибровочные кривые не требуются для качественного применения, например, для LFDs. Положительные и отрицательные контрольные пробы могут быть подготовлены по усмотрению лаборанта.

**8.5 Процедура анализа**

Для количественного испытания следует отобрать требуемое количество ячеек, (ИФА (Иммуноферментный анализ)) для анализируемого образца(ов), в том числе холостые пробы, положительные и отрицательные контрольные пробы, и добавлять к каждой из них, по меньшей мере, двойной объем и тщательно разбавленный, так чтобы соответствовать анализу.

Для качественного или полуколичественного испытания следует отобрать требуемое количество тестов (ИФА (Иммуноферментный анализ) или LFDs) необходимые для анализируемых образцов, включая пустые образцы, положительные и отрицательные контрольные пробы. Стабильность конечного сигнала может варьироваться. Необходимо своевременно регистрировать результаты, как указано в Приложениях А и В.

В соответствии с выбранным методом следовать инструкциям каждого метода для анализа образцов, включая контрольные образцы, стандартные образцы и/или стандарты измерения (при необходимости). Провести реакцию в указанном диапазоне температур и времени. При необходимости прекратить реакцию в соответствии с методом, описанным в А.6.6.2.7 и В.6.4.2. Например, если метод ИФА (Иммуноферментный анализ) требует сбора данных на спектрофотометре, необходимо выполнить этот шаг. В случае качественных испытаний следуйте инструкциям комплекта оборудования. Как правило, они интерпретируются визуально

**9 Интерпретация и представление результатов**

**9.1 Общие положения**

Интерпретируемые показатели могут варьироваться в зависимости от того, был ли использованный метод качественным, полуколичественным или количественным.

Для количественных методов коэффициент изменения (*CV*) значений оптической плотности, полученных при измерении повторов анализируемого образца, в целом не должен превышать 15 %. Коэффициент изменения для концентраций, рассчитанных по измерению повторов анализируемого образца, в целом не должен превышать 20 %.

Если превышено предельное значение коэффициента изменения, анализы необходимо повторить на заново подготовленном растворе анализируемого образца. Для определения коэффициента изменения в данном случае следует провести как минимум три определения (использование трех лунок микропланшета для одного образца).

Отрицательные результаты следует регистрировать как «отрицательный результат с данным пределом обнаружения» и предел обнаружения (LOD) следует зарегистрировать.

Положительные результаты со значениями ниже предела измерения для количественного анализа следует интерпретировать как «положительный результат со значением выше предела обнаружения, но ниже предела измерения». Пределы количественного анализа и выявления следует зарегистрировать.

**9.2 Количественный и полуколичественный анализ**

Для количественного и полуколичественного анализа необходимо определить следующие параметры:

- исходные значения для растворов анализируемого образца,

- пустого образца,

- стандартного образца или анализируемого стандартного образца,

- отрицательного контрольного образца,

- % *CV* коэффициент вариации (в процентах) между повторами;

- % *CV* коэффициент вариации (в процентах) для стандартов;

- % *CV* коэффициент вариации (в процентах) для контрольных образцов.

В соответствии с ISO/IEC 17025, следует включать в протокол испытания неопределенность результата измерения.

Не следует включать в отчет результаты количественного анализа, полученные путем экстраполяции выше или ниже калибровочной точки.

**9. 3 Качественный анализ**

Для качественных испытаний, включая все перечисленные методы, соответствующие параметры описаны в приложениях А и В. Всегда следует регистрировать LOD. Отрицательные результаты должны быть зарегистрированы как «отрицательные на пределе обнаружения».

Положительные результаты должны также зарегистрировать LOD.

**10 Специфические факторы, которые могут повлиять на результаты**

**10.1 Общие положения**

Критерии эффективности, перечисленные в методе из Приложения А, данная подборка характеристик эффективности, полученная для каждого метода при его разработке, валидации и обычном использовании. Данные параметры должны быть получены и оценены для каждого метода и позволяют подтвердить достоверность полученных с помощью метода данных, а также судить о качестве анализа. Каждый раз при работе определенным методом необходимо вычислить критерии эффективности метода и сравнить их значения с установленными.

Если полученное значение (коэффициент вариации повторных измерений) не соответствует параметрам метода, это означает, что полученный результат нестандартен и требует дополнительного анализа данных. Перечень этих параметров следует рассматривать в целом. Если при определенных обстоятельствах отдельные параметры не соответствуют установленным значениям, результаты все равно могут быть учтены в целом. При несоответствии некоторых критериев установленным значениям следует указать в отчете, а также определить, требуются ли провести корректировку полученных данных или повторить исследование одного или нескольких образцов. Такие решения должны приниматься на основе заключения исследователя, анализирующего все критерии.

В отличие от метода, описанного в Приложении A, критерии эффективности анализа LFD, как описано в Приложении B, оцениваются в ходе разработки метода производителем набора. Метод должен быть оценен на повторяемость в лаборатории перед использованием на тестируемых образцах. Неработающие наборы не должны использоваться.

**10.2 Особые примечания**

10.2.1 Избирательность

Для каждого исследуемого белка (POI) или анализируемого вещества (белок) и для каждого исследуемого материала образца необходимо показать достаточную избирательность метода. Следует по возможности оценить перекрестную реактивность с аналогами анализируемого вещества (белков со сходной последовательностью или структурой). Для подтверждения отсутствия исследуемого белка (POI) в образце без исследуемого белка (POI), необходимо провести исследование образцов, содержащих и не содержащих исследуемый белок (POI) в должных разведениях, а затем сравнить результаты.

Как правило, данные проверки осуществляются в процессе разработки и проверки метода, поэтому нет необходимости их выполнения при обычном исследовании образцов методом, прошедшим проверку. Избирательность тест-наборов, основанных на методах ИФА (Иммуноферментный анализ) или LFD должна быть указана изготовителем тест-набора (в листках-вкладышах изготовителя продукта).

10.2.2 Эффективность экстракции

Необходимо уделить особенное внимание оценке влияния параметров процессов, использованных в приготовлении конкретного лабораторного образца.

Для обеспечения максимальной чувствительности иммунологического анализа эффективность экстракции должна быть наивысшей, особенно для количественных методов. Эффективность анализа зависит от матрицы. Поэтому для каждой матрицы следует определить и документировать эффективность экстракции.

Следует доказать воспроизводимость процедуры экстракции и представить метод расчета калибровочной кривой при неполной экстракции.

10.2.3 Эффект матрицы образца

Область применения метода однозначно и точно определяет матрицы, для которых допустимо применение данного метода иммунологического анализа. Использование стандартных образцов с соответствующей матрицей позволяет производить непосредственное сравнение между стандартными образцами и исследуемыми образцами. Тем не менее, если образцы должны анализироваться по стандартным образцам, которые не относятся к этой матрице, следует оценить эффект матрицы следующим образом.

Необходимо приготовить отрицательный экстракт для каждого образца (матрицы) исследуемого методом и экстракт положительного контрольного образца с известной концентрацией. Приготовить серию разведений положительного контрольного образца в экстракте отрицательного контрольного образца и сравнить полученные кривые доза-эффект с калибровочной кривой метода. Если эти две кривые отличаются, имеет место эффект матрицы. Необходимо использовать материал стандартов, наиболее точно воспроизводящий матрицу исследуемых образцов. Кривая разведений положительного контрольного образца известной концентрации тоже должна учитываться при в качестве опорной информации. Форма калибровочной кривой не должна изменяться из-за эффекта матрицы.

10.2.4 Применимость анализа

Обработка пищевых продуктов обычно приводит к ухудшению или денатурации исследуемых белков (POI), что может привести к существенному изменению иммунореактивности. Иммунохимический метод анализа должен быть оценен на предмет применимости к исследуемым белкам POI в обработанных продуктах.

10.2.5 Хук – эффект

В анализе LFD на основе антител и в формате планшета эффект зацепления (насыщения) может привести к ложноотрицательному результату. Необходима полная демонстрация того, что диапазон рабочих концентраций удобно охватывает практическую потребность в испытательных образцах исследуемых белков (POI).

10.2.6 Параллельность/линейность

Для количественного анализа ожидаемый диапазон линейности иммунологического анализа должен быть четко представлен в области применения метода для каждой анализируемой матрицы. Взаимосвязь отклика прибора на известную концентрацию исследуемых белков POI может быть нелинейной и должна устанавливаться для каждого количественного иммунохимического метода анализа изготовителем. Взаимосвязь, как правило, гиперболическая, если концентрация исследуемых белков POI нанесена на линейную шкалу или сигмоидальная с логарифмической концентрационной шкалой. Либо 4-параметрическая логистическая или 5-параметрическая модель логистической регрессии обеспечивают наилучшее соответствие для калибровочной кривой ИФА (Иммуноферментный анализ), при этом линейный участок в центре сигмоидальной кривой представляет оптимальную область для количественного анализа. Другие регрессионные модели (например, линейная, квадратичная, логит, логарифмическая, сплайн-аппроксимация, полином третьего порядка) также могут подходить для соответствия ограниченным участкам калибровочной кривой.

Минимум четыре калибровочных точки, отражающие пригодную для использования часть кривой, должны оцениваться для целей количественной оценки, хотя для логистического соответствия с 4 параметрами требуется не менее пяти точек, а для логистического соответствия с 5 параметрами требуется как минимум шесть точек.

10.2.7 Предел обнаружения

Не следует принимать в расчет результаты, лежащие ниже предела обнаружения. В случае получения таких значений в протоколе испытаний следует указывать в соответствии с применимым методом, приведенным в разделах 9.1 по 9.3.

10.2.8 Предел измерения при количественном анализе

Следует четко определить предел измерения при количественном анализе для каждой серии калибровочных стандартов (или разведений).

Предполагаемая концентрация в анализируемом экстракте исследуемого образца должна быть получена путем интерполяции, но не экстраполяции значений калибровочных стандартов.

Не следует принимать в расчет результаты, значения которых лежат ниже предела измерения или вне диапазона концентраций калибровочных стандартов.

**11 Подтверждающий метод**

Для оценки достоверности метода анализа можно провести измерение расщепленных аналитических образцов известной концентрации, с помощью других аналитических методов, например, вестерн-блот, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), масс-спектрометрия (МС) или функциональный анализ. Результаты, полученные разными методами, затем сравниваются качественно или количественно. Это особенно важно для методов иммунологического анализа, поскольку антитела могут проявлять перекрестную специфичность к другим соединениям, присутствующим в матрице.

**12 Протокол испытаний**

Протокол испытания должен содержать, по крайней мере, следующие данные:

a) вся информация, необходимая для идентификации лаборатории;

b) вся информация, необходимая для идентификации лабораторного образца;

c) ссылка на настоящий стандарт, и на используемый метод анализа, а также пометка о том, был ли анализ качественный, количественный или полуколичественный;

d) предел обнаружения (LOD);

e) верхняя и нижняя границы диапазона измерения количественного анализа;

f) дата и тип используемой процедуры пробоподготовки (если она известна);

g) дата приема образца;

h) дата начала проведения анализа или другая информация такого рода;

i) объем анализируемого образца;

j) объем экстракта исследуемого образца;

k) результаты и единицы измерения, использованные в отчете о результатах;

l) информация о любых специфических ситуациях, произошедших во время исследования;

m) если известно, ограничения должны быть также перечислены, такие как возможные перекрестные реактивы или избирательность каждого метода;

n) любое действие, не описанное в методе или рассматриваемое как дополнительное, но, возможно, оказывающее эффект на результаты анализа.

**Приложение А**

*(информационное)*

**Обнаружение белков методом ИФА (Иммуноферментный анализ)**

**А.1 Общие положения**

ИФА (Иммуноферментный анализ) успешно и регулярно используется для качественного или количественного определения белковых анализируемых веществ.

Большинство коммерческих методов ИФА (Иммуноферментный анализ) применимы к образцам, где мало или вообще не было проведено обработки и переработки, и, таким образом, исследуемые белки (POI) не были денатурированы. Нагревание, обработка паром и сушка - это лишь несколько примеров условий, которым пищевые ингредиенты подвергаются во время обработки, которые денатурируют белки и, таким образом, влияют или значительно уменьшают способность иммунологических реактивов, используемых в ИФА (Иммуноферментный анализ), связываться со специфическими белками в неестественном состоянии. Следует регистрировать избирательность метода, поскольку в некоторых случаях ИФА также будут реагировать с аналогичными белками.

Методы ИФА (Иммуноферментный анализ) обычно используются качественным образом для испытания на присутствие или отсутствие и для количественной оценки. Применимость к различным матрицам (зерно, лист) и культурам четко определена производителем набора в документации набора и должна подтверждаться валидацией метода производителя. Предел обнаружения (LOD) определяется по этим параметрам. Предел обнаружения (LOD) для набора ИФА (Иммуноферментный анализ) обычно устанавливается производителем набора, чтобы соответствовать выражению в наименее выраженной разновидности. Изучена перекрестная реактивность с другими белками. Наборы ИФА коммерчески доступны по всему миру.

Альтернативное использование наборов на других культурах и матрицах (например, пищевых продуктах) должно поддерживаться независимой проверкой и определением LOD лабораторией, проводящей испытания не по утвержденным показаниям.

**А.2 Область применения**

В настоящем приложении представлен общий пример процедуры использования ИФА для определения наличия исследуемых белков (POI) и количественного определения количества исследуемых белков (POI), присутствующего в образце. Настоящий метод применим к образцам, в которых мало или вообще не проводилась обработка или переработка и, таким образом, исследуемые белки (POI) не денатурируются. Например, высокие температуры, при которых обрабатываются пищевые ингредиенты, могут влиять на способность обнаруживать исследуемые белки (POI). Каждый производитель должен снабдить процедуру ИФА набором и указать, какую матрицу можно испытывать с использованием ИФА, а также критерии приемлемости и отклонения, которые были установлены путем разработки и проверки метода.

**А.3 Принцип**

Прямой иммуноферментный анализ ИФА типа «сэндвич». используется для обнаружения исследуемых белков POI следующим образом и как показано на рисунках с A.1 по A.4.

- Этап 1. Поверхность планшета для микротитрования покрыта специфическим захватывающим антителом.

- Этап 2. Когда добавляется интересующий образец, захватывающее антитело связывается с антигеном. Несвязанные компоненты образца удаляются промывкой.

- Этап 3. После промывки добавляют поликлональное антитело, соединенное ковалентной связью (например) с пероксидазой из хрена (HRP), которое специфично для второго антигенного участка на связанном исследуемом белке (POI).

- Этап 4. После промывания добавляют хромогенный субстрат тетраметилбензидина (ТМБ) для пероксидазы хрена. Пероксидаза хрена генерирует цветовой сигнал, который пропорционален концентрации антигена в линейном диапазоне. Чтобы остановить развитие цвета, добавлено раствор для остановки. Степень получаемого цвета измеряется на длине волны 450 нм.



**Рисунок А.1 – Шаг 1**



**Рисунок А.2 – Шаг 2**



**Рисунок А.3 – Шаг 3**



**Рисунок А.4 – Шаг 4**

**А.4 Реактивы**

**А.4.1 Общие положения**

Если не указано иное, необходимо использовать для анализа реактивы только с определенной (известной) степенью чистоты и деионизованную или дистиллированную воду.

Любое отклонение от рассчитанных критериев производительности может означать нарушение стабильности реактива. Например, нельзя использовать помутневшие буферные или мутные растворы конъюгата.

Все компоненты набора должны храниться при температуре от 2 °С до 8 °С. Срок годности компонентов набора указывается датой истечения срока годности.

Исходный раствор конъюгата антител (A.6.3.1) и рабочий раствор конъюгата антител (A.6.3.2) можно хранить при температуре от 2 ° C до 8 ° C в соответствии с инструкциями набора для разбавления и хранения. Разбавленный промывочный буфер также следует хранить в соответствии с инструкциями производителя или в соответствии с установленными в лаборатории стандартными процедурами.

**А.4.2 Реактивы и материалы, обычно входящие в испытательный набор**

А.4.2.1 Буферный раствор

А.4.2.2 Буферный для анализа

А.4.2.3 Стрипованный микропланшет или пластины с покрытием.

Не все наборы содержат лунки или пластины с покрытием. Покрытие лунок или пластин с антителами может быть выполнено пользователем в качестве дополнительного этапа. Пользователи должны следовать инструкциям производителя по приготовлению буфера для нанесения покрытия и этапов нанесения покрытия на лунку или пластину

А.4.2.4 Конъюгированное детектирующее антитело.

А.4.2.5 Буферный раствор для разведения конъюгата.

А.4.2.6 Хромогенный субстрат.

А.4.2.7 Стоп-раствор.

А.4.2.8 Промывочный буферный концентрат.

А.4.2.9 Отрицательные и положительные стандартные образцы с соответствующей матрицей

А.4.3 Реактивы, не поставляемые с испытательным комплектом

А.4.3.1 Спирт, например метиловый (концентрация 70 % по объему) или этиловый (концентрация 95 % по объему).

А.4.3.2 Моющее средство, для ультразвуковой бани, необязательно.

**А.5 Лабораторное оборудование**

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

A.5.1 Холодильник, настроенный на рабочий диапазон приблизительно от 2 °C до 8 °C.

А.5.2 Конические центрифужные полипропиленовые пробирки, герметизируемые, например, 15 мл.

А.5.3 Пластиковая упаковка или алюминиевая фольга (дополнительно).

А.5.4 Пластиковая лента для закрепления стрипов в процессе промывания микропланшетов (дополнительно).

А.5.5 Бутыль для промывки, например, на 500 мл.

А.5.6 Прецизионные пипетки, с объемом, например, 20 - 500 мкл.

А.5.7 Малый пробоотборный встряхиватель.

А.5.8 Весы, с пределом взвешивания 0,01 г.

А.5.9 Центрифуга, с ускорением не менее 5000г.

А.5.10 Микропланшетное считывающее устройство, способное считывать поглощение при 450 нм или длине волны, указанной в наборе.

А.5.11 Инкубаторная печь или водяная баня, способные поддерживать 37 ° C (если требуется).

А.5.12 Сито с размером ячейки 450 мкм или аналогичное.

А.5.13 Сито с размером ячейки 150 мкм (100 меш) или аналогичное.

А.5.14 Многоканальная автоматическая пипетка, например, для объемов 50-300 мкл (необязательно).

А.5.15 Ванночки для реактивов для использования с многоканальной пипеткой (необязательно).

А.5.16 Автоматический промыватель планшетов (необязательно).

А.5.17 Штатив для центрифужных пробирок на 15 мл (необязательно).

А.5.18 Ультразвуковая баня (необязательно).

**А.6 Процедура**

Предупреждение - Следует соблюдать меры предосторожности при работе с растворами кислот или тетраметил- бензидина (ТМБ). Достаточно естественной вентиляции.

**А.6.1 Ограничения процедуры**

Для образцов, прошедших термическую обработку, или пищевой продукции сложного состава данный метод может не подходить по назначению, если он специально не предназначен для матрицы.

Тест-система на основе метода ELISA разработана для получения оптимальной производительности при комнатной температуре в диапазоне от 15°С до 30 °С. Поглощение образца известного состава должно превышать 0,8 единиц оптической плотности (OD) и не должно выпадать за пределы диапазона линейности измерения спектрофотометра (верхнее предельное значение у разных моделей спектрофотометров отличается). При температурах выше 30 °С значения оптической плотности будут возрастать быстрее; при этом, возможно, потребуется сократить время инкубации с субстратом. При низких температурах (ниже 15 °С) следует увеличить время инкубации с субстратом.

**А.6.2 Отбор проб**

А.6.2.1 Пробоподготовка

Из гомогенного лабораторного образца отбирается анализируемый образец в достаточном количестве для проведения анализа в повторе.

При анализе необработанных соевых бобов рекомендуется отобрать 2 000 г образца и измельчить достаточно мелко, чтобы полученные частицы могли пройти через сито. Размер частицы не должен превышать 150 мкм для проведения количественного анализа и 450 мкм - для качественного. Для предотвращения перекрестной контаминации этап просеивания следует проводить с особой тщательностью. Не допускать чрезмерного нагрева образца. Для одновременного размешивания и измельчения образца можно использовать блендер. При работе с твердым материалом образцов (целые соевые бобы) следует отобрать около 100 г, измельчить и просеять через сито с размером ячейки 450 мкм (А.5.12). При просеивании через сито с размером ячейки 450 мкм должно пройти не менее 90 % образца. При проведении качественного анализа полученный материал можно использовать напрямую. Если требуется провести количественный анализ, то полученный материал следует просеять через сито с размером ячейки 150 мкм (А.5.13). Считается, что материал, просеянный через сито с размером ячейки 450 мкм, является гомогенным. Поэтому следует просеивать через сито с размером ячейки 150 мкм только количество материала, необходимое для получения анализируемого образца.

Аналогичная процедура подходит для крупного зерна, такого как кукуруза или соя. Некоторые образцы могут состоять из материала, который должен обрабатываться в замороженном виде или уже быть гомогенатом.

А.6.2.2 Меры по предотвращению перекрестной контаминации при пробоподготовке

А.6.2.2.1 Общие положения

Тест-система на основе метода ELISA представляет собой чувствительную методику, позволяющую определять очень низкие концентрации белка. Поэтому тщательная очистка всего обору-дования, использованного при работе с образцами сои, между пробоподготовкой разных групп образцов является необходимой. Рекомендуемая процедура в A.6.2.2.2 и A.6.2.2.3 включает в себя первый этап физического удаления максимально возможного количества частиц материала. Второй этап, заключающийся в промывке спиртом, предназначен для денатурации и получения неактивного состояния всех белков, оставшихся в оборудовании

Данная процедура типична для блендеров, которые нельзя стирать в процессе промышленной стирки.

А.6.2.2.2 Очистка блендера или мельницы

Необходимо проводить очистку щеткой с мягким ворсом.

Необходимо промывать спиртом не менее двух раз (спирт можно хранить в распылителе или промывочной бутыли, из которых удобно проводить обработку). Затем тщательно промыть водой.

Дать просохнуть на воздухе или, если необходимо скорое повторное использование оборудования, воспользоваться бытовым феном для сушки волос.

Необходимо периодически мыть щетку и замачивать ее в растворе спирта (А.4.3.1). Обязательно высушить щетку перед повторным использованием, протереть лоскутом мягкой ткани или лабораторной салфеткой.

А.6.2.2.3 Очистка сита

Сито может забиваться порошком сои. Для удаления осевшего материала необходимо сильно выколотить сито о твердую поверхность.

Прочистить щеткой с мягким ворсом, замочить сито в спирте не менее чем на 5 мин, а затем тщательно промыть водой. Дать просохнуть на воздухе или, если необходимо скорое повторное использование сита, воспользоваться бытовым феном для сушки волос.

В качестве альтернативного метода можно использовать ультразвуковую баню с последующей просушкой на воздухе.

Необходимо периодически мыть щетку и замачивать ее в растворе спирта (А.4.3.1). Высушить щетку перед повторным использованием, протереть лоскутом мягкой ткани или лабораторной салфеткой.

А.6.2.2.4 Очистка рабочего места

Необходимо избегать загрязнения рабочего места соевой пылью. Не допускать попадания соевой пыли, образовавшейся в ходе пробоподготовки одной группы образцов, в оборудование, которое будет использоваться при пробоподготовке следующих групп. Для оптимальной производительности необходимо проводить анализ в отдельном помещении и для предотвращения возможной контаминации соевой пылью измельчение образца и пробоподготовку следует проводить в отдельном помещении.

**А.6.3 Приготовление конъюгата антител**

А.6.3.1 Основной раствор конъюгата антител

Приготовить конъюгат антител (А.4.2.4) в соответствии с руководством пользователя.

Хранить основной раствор конъюгата антител при температуре от 2 °С до 8 °С до истечения срока годности тест-системы.

А.6.3.2 Рабочий раствор конъюгата антител

Добавить основного раствора конъюгата антител (А.6.3.1) к буферному раствору для разведения конъюгата (А.4.2.5).

Хранить рабочий раствор конъюгата антител при температуре от 2 °С до 8 °С до истечения срока годности тест-системы.

**А.6.4 Приготовление буферного раствора**

Развести концентрированный раствор буферного раствора в соответствии с инструкциями производителей или в соответствии с лабораторной стандартной рабочей процедурой (SOP).

**А.6.5 Процедура анализа**

Перед проведением анализа все используемые реактивы должны быть нагреты до комнатной температуры.

Достать стрипы с нанесенными антителами (А.4.2.3) и держатель стрипов из фольгированного пакета. Каждый раз, когда достается необходимое количество стрипов и держатель, необходимо запечатывать пакет. Для стандартов известного состава и отрицательных стандартов требуется десять-двенадцать лунок. Для каждого микропланшета следует использовать собственные стандартные и контрольные образцы. Схема процедуры анализа приводится в А.7.

**А.6.6 Проведение анализа**

А.6.6.1 Экстракция из анализируемой части образца и из стандартных образцов

Экстракция из анализируемых образцов, отрицательных и положительных контрольных стандартных образцов проводится в одинаковых условиях в повторах.

Типичный процесс иллюстрируется следующим образом.

Взвесить (0,5 ± 0,01) г каждого стандартного образца и анализируемого образца в отдельные полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 15 мл. Взвешивание стандартных образцов проводится в порядке увеличения концентрации анализируемого вещества в них. Затем взять навески анализируемых образцов. Для предотвращения контаминации использовать очищенные шпатели (протереть шпатель лоскутом ткани, смоченным в спирте (А.4.3.1), а затем просушить) или одноразовые шпатели для каждого стандартного образца и анализируемого образца.

Добавить буферного раствора для экстракции (А.4.2.1) в каждую центрифужную пробирку.

Размешать анализируемую часть образца или стандартный образец в буферном растворе для экстракции путем сильного встряхивания и взбалтывания (на вортексе) до образования гомогенной смеси.

Примечание - Смешивание обезжиренной соевой муки и изолята соевого белка с буферным раствором для экстракции занимает продолжительный промежуток времени, зачастую превышающий 15 мин. Соевая мука с полным содержанием жира гораздо быстрее образует гомогенную смесь (менее чем за 5 мин).

Провести центрифугирование полученных смесей при приблизительно 5 000 д в течение 15 мин при 4 °С.

Аккуратно отобрать примерно по 1 мл супернатанта из каждого раствора образца и стандарта и перенести в отдельные чистые полипропиленовые центрифужные пробирки.

Стабильность образца раствора должна быть обесппечена. Растворы образцов можно хранить при температуре от 2 °С до 8 °С, но не более одного рабочего дня.

Перед проведением анализа развести растворы исследуемых и стандартных образцов в рабочем буферном растворе для сои (А.4.2.2).

Результаты этапов экстракции приведены в Таблице А.2.

А.6.6.2 Процедура иммунологического анализа ELISA

А.6.6.2.1 Общие положения

Анализ на основе метода ELISA можно проводить в различных форматах, используют любое количество 8-луночных стрипов. Рекомендуется использовать схему случайного заполнения лунок микропланшета, т. е. не вносить анализируемые и стандартные образцы в одни и те же лунки при каждом анализе, что позволит исключить эффект положения лунки в стрипе (если таковой имеется).

Все реакции следует проводить как минимум в двух повторностях для каждого анализируемого или стандартного образца и рассчитывать среднее значение поглощения. Каждый анализ необходимо проводить с растворами для отрицательного контроля метода, отрицательного и положительного стандартных образцов. Контрольный анализ или пробный образец должны быть описаны в инструкциях. Если производитель не рекомендует реагент, используйте буферный раствор для разбавителя в качестве контрольного раствора для анализа. Для пробного образца используйте разбавленный контрольный раствор, не содержащий POI.

Начав процедуру анализа, следует выполнить все этапы без прерывания работы. Схема проведения иммунологического анализа ELISA приводится в таблице А.З.

Чтобы установить коэффициент вариации в этом случае, должны быть выполнены как минимум три анализа (например, значения из трех лунок). Данные три анализа могут включать анализ нескольких экстрактов одного и того же образца.

А.6.6.2.2 Инкубация

Используя автоматическую микропипетку, внести по 100 мкл разведенных растворов исследуемых и стандартных образцов, а также контрольную пробу для метода в соответствующие лунки. Для предотвращения перекрестной контаминации использовать отдельные одноразовые наконечники для пипетки при каждом шаге ее использования. Накрыть планшет пластиковой или алюминиевой пленкой (А.5.3) для предотвращения контаминации и испарения.

Перед началом инкубации рекомендуется осторожно встряхнуть микропланшет с целью перемешивания его содержимого. Для этого необходимо взяться за короткие стороны микропланшета указательным и большим пальцами и подвигать его из стороны в сторону.

Инкубировать микропланшет при 37 °С в течение 1 ч.

А.6.6.2.3 Промывание микропланшета

Промыть буферным раствором для промывки согласно инструкции или проверить на SOP.

Промывание микропланшета ВРУЧНУЮ: Опорожнить лунки, перевернув планшет над раковиной или подходящей емкостью для отходов. Заполнить каждую лунку доверху, используя бутыль для промывания, содержащую рабочий буферный раствор для промывки, и дать постоять 60 с, затем снова опорожнить лунки микропланшета (см. выше). Повторить процедуру промывания три раза. Удалить остатки жидкости и пузырьки из лунок, постучав перевернутым микропланшетом по нескольким слоям фильтровальной бумаги, уложенной на рабочий стол.

Если используется многослойная пластина, рекомендуется предотвратить выпадение стрипов из держателя, зафиксировав их клейкой лентой.

Автоматическое промывание микропланшета: По завершении периода инкубации удалить содержимое лунок микропланшета, используя автоматический промыватель, а затем заполнить каждую лунку рабочим буферным раствором для промывки. Повторить этапы опорожнения/заполнения лунок три раза. Затем опорожнить все лунки и постучать перевернутым микропланшетом по нескольким слоям фильтровальной бумаги, уложенной на рабочий стол, для удаления остатков жидкости и пузырьков.

Пластинчатые шайбы могут автоматизировать один или несколько из этих шагов

Не дать лункам микропланшета полностью высохнуть, так как это может повлиять на резуль-таты анализа.

Примечание - Плохое промывание микропланшета может привести к ошибочным результатам. В любом случае, при использовании ручного или автоматического метода промывки следует убедиться в том, что каждая лунка микропланшета была заполнена одинаковым объемом буферного раствора для промывки одинаковое количество раз по сравнению с остальными лунками.

А.6.6.2.4 Внесение конъюгата антител

Используя автоматическую микропипетку, внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата антител (А.6.3.2) в каждую лунку микропланшета. Накрыть планшет для предотвращения контаминации и испарения.

Микропланшет смешивают (при необходимости) и инкубируют (со встряхиванием или без него в соответствии с инструкциями производителя или проверенной SOP).

А.6.6.2.5 Промывание

По завершении периода инкубации повторить этап промывания (описан в А.6.6.2.3).

А.6.9.2.6 Внесение субстрата

Используя автоматическую микропипетку, внести по 100 мкл хромогенного субстрата (А.4.2.6) в каждую лунку микропланшета. Аккуратно встряхнуть микропланшет с целью перемешивания его содержимого и инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин.

Необходимо вносить хромогенный субстрат в лунки микропланшета без перерывов и соблюдать последовательность и временной интервал при пипетировании.

А.6.6.2.7 Добавление стоп-раствора

По завершении периода инкубации внести стоп-раствора (А.4.2.7) в каждую лунку микропланшета. Добавить стоп-раствор в той же последовательности, что и при внесении хромогенного субстрата. Аккуратно встряхивать микропланшет для остановки цветовой реакции и равномерно распределить стоп-раствор.

Необходимо вносить стоп-раствор в лунки микропланшета без перерывов. Избегать воздействия солнечного света на микропланшет, в противном случае возможно изменение интенсивности окрашивания.

**А.6.7 Регистрация поглощения**

Измерьте поглощение или интенсивность хромогена в каждой лунке, используя планшетным спектрофотометром для микротитрования, снабженный фильтром или монохроматором, соответствующим длине волны, необходимой для хромогенной системы ELISA (см. Таблицу A.1). Регистрация поглощения должна быть произведена в течение 30 мин после добавления стоп-раствора.

Поглощение для примера фермента HRP и субстрата TMB, представленного в этом приложении, следует измерять с помощью планшет-ридера, снабженного фильтром 450 нм.

Зарегистрировать полученные результаты и рассчитать средние значения поглощения в повторах или использовать соответствующую компьютерную программу.

**Таблица А.1 – Типичные хромогенной системы для ферментов**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ферменты** | **Субстраты** | **Длина волны (нм)/ Цвет** |
| Пероксидаза хрена  (HRP) | 3,3'-диаминобензидин (DAB) | 405/желтый |
| 3,3 ', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) | 450 (652)/желтый (синий) |
| 2,2'-азинобис [3-этилбензотиазолин-6-сульфокислота] (ABTS) | 410 (650)/зеленый (синий) |
| о-фенилендиамин дигидрохлорид (OPD) | 490 (450)/зеленый (оранжевый) |
| Щелочная фосфатаза  (AP) | Сочетание нитро-синего хлорида тетразолия (NBT) и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата (BCIP) | синий |
| п-нитрофенилфосфат (PNPP) | 405/желтый |
| Глюкозооксидаза (GO) | Нитро-синий тетразолий хлорид (NBT) | черный/коричневый |
| β-галактозидазы | 5-бром-4-хлор-3-индоил- β -D-галактопиранозид (BCIG или X-Gal) | синий |

**Таблица А.2 - Схема экстракции**

|  |  |
| --- | --- |
| **Процедура** | **Описание** |
| Навеска 0,5 г | Сделать навески анализируемых образцов, контрольного образца для метода, контрольных стандартных образцов |
| Добавление 4,5 мл | Добавить буферный раствор для экстракции (А.4.2.1) |
| Смешивание | Смешать анализируемую часть образца с буферным раствором для экстракции и встряхивать до образования гомогенной смеси; для соевой муки с нормальным содержанием жира - менее 5 мин, для обезжиренной соевой муки и изолята соевого белка - более 15 мин |
| Центрифугирование при 5 000 *д* | Центрифугировать образец при 5 000 *д* в течение 15 мин, желательно при 4 °С. Отобрать супернатант и перенести его в чистую пробирку |
| Разведение:  1→300 или 1→10 в зависимости от материала исследуемого образца | Развести полученные растворы анализируемого образца, отрицательного контрольного образца метода и контрольных стандартных образцов |

**Таблица А.З - Схема проведения анализа методом ELISA**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Процедура** | **Объем** | **Описание** |
| Внесение | 100 мкл | Внести разведенные растворы анализируемого образца, отрицательного контрольного образца метода и контрольных стандартных образцов в соответствующие лунки и перемешать |
| Инкубация |  | Инкубировать 1 ч при 37 °Са |
| Промывание |  | Промыть 3 раза буферным раствором для промывки (А.6.4) |
| *Окончание таблицы А.3* | | |
| **Процедура** | **Объем** | **Описание** |
| Внесение | 100 мкл | Внести конъюгат антител (А.4.2.4) в каждую используемую лунку и перемешать |
| Инкубация |  | Инкубировать 1 ч при 37 °Са |
| Промывание |  | Промыть 3 раза буферным раствором для промывки (А.6.4) |
| Внесение | 100 мкл | Внести конъюгат антител (А.4.2.6) в каждую используемую лунку и перемешать |
| Инкубация |  | Инкубировать 1 ч при 37 °Са |
| Добавление | 100 мкл | Добавить стоп-раствор (А. 4.2.7) в каждую используемую лунку и перемешать |
| Регистрация поглощения |  | Измерьте поглощение или интенсивность хромогена в каждой лунке с помощью планшетного спектрофотометра, оснащённый фильтром или монохроматором, соответствующим длине волны, необходимой для хромогенной системы ELISA. |
| а Время и температура инкубации будут основываться на рекомендациях производителя и условиях, установленных во время проверки. | | |

**А.8 Анализ данных**

Данные должны быть зарегистрированы.

Для построения калибровочной кривой следует использовать значения поглощения контрольных стандартных образцов. Значение поглощения контрольного образца метода (контрольный образец) следует вычесть из всех значений поглощений разведенных растворов анализируемых и контрольных образцов. Для построения калибровочной кривой следует использовать усредненные по двум повторностям исправленные значения поглощения каждого контрольного стандартного образца. Концентрацию анализируемого вещества в исследуемом образце интерполируют по полученной калибровочной кривой, используя усредненные значения поглощения соответствующих разведенных растворов анализируемых образцов.

Кривая должна обеспечивать линейную функцию при преобразовании. Анализы ELISA часто показывают нелинейную линию без трансформации, и, таким образом, программы подбора кривой дают лучший результат.

**А.9 Критерии приемки результатов анализа**

Каждый проведенный анализ должен соответствовать критериям приемлемости результатов, перечисленным в таблице А.4. Анализ включает в себя следующее: отрицательный контрольный образец метода, положительные контрольные стандартные образцы, отрицательные контрольные стандартные образцы и образцы неизвестного содержания. Прогон состоит из контрольного образца, положительных стандартных образцов, отрицательных стандартных образцов (контрольный образец) и неизвестных образцов. Все растворы анализируемых и контрольных образцов используются в повторностях. Если анализ не соответствует критериям приемлемости результатов, его следует переделать. Растворы анализируемых образцов, не прошедшие по критериям приемлемости результатов, должны быть исследованы повторно. Отдельные образцы испытательного раствора, которые не соответствуют критериям приемки ни в одном прогоне, должны быть повторно проведены повторно.

**Таблица А.4 - Критерии приемки результатов анализа а**

|  |  |
| --- | --- |
| Отрицательный контрольный образец метода (буферный раствор) | А 450 нм < 0,30 |
| Стандартный образец 0 % ГМО | А 450 нм < 0,30 |
| Стандартный образец 2,5 % ГМО | А 450 нм > 0,8 |
| Все положительные контрольные стандартные образцы, OD | Коэффициент вариации OD повторностей < 15 % |
| Анализируемые образцы, раствор | Коэффициент вариации OD повторностей < 20 % |
| а Применительно к обнаружению пероксидазы хрена (ОПХ) в примере сэндвич-ELISA длина волны составляет 450 нм. | |

**Приложение В**

*(информационное)*

**Обнаружение белка или белков с помощью устройства, основанное на принципе растекания жидкости в радиальном направлении (LFD)**

**B.1 Общие положения**

LFD (также известные как стрипы или щупы для анализа растекания капли жидкости в радиальном направлении) успешно и регулярно используются для качественного или полуколичественного обнаружения антигенов, включая, например, новые белки, экспрессируемые в культурах, полученных из современной биотехнологии (ГМО, биоинженерия).

Большинство коммерческих методов LFD применимы к образцам, в которых мало или вообще не проводилась обработка, и, таким образом, POI не были денатурированы. Нагревание, варка на пару и сушка - это лишь несколько примеров процессов, при которых пищевые ингредиенты подвергаются во время обработки, которые денатурируют белки и, таким образом, влияют или значительно уменьшают способность иммунологических реагентов, используемых в LFD, связываться со специфическими белками в их не неестественные состояния. Как правило, следует разрабатывать конкретные отдельные приложения, если это необходимо, для обнаружения POI в обработанных фракциях, таких как питание. Следует сообщать о селективности метода, поскольку в некоторых случаях LFD также будут реагировать с аналогичными белками.

В случаях полуколичественного применения для обнаружения специфического антигена метод может применяться только к образцам пищи, состоящим исключительно из продуктов, в которых может быть обнаружен белок. Методы LFD обычно используются качественным образом для тестирования присутствия или отсутствия, хотя были разработаны подходы для получения количественных результатов. Достоверность результатов высока, и данными методами обычно определяют пороговые пределы. Данные методы могут быть легко преобразованы для полуколичественных применений, комбинируя их с планами отбора проб и статистикой[2] для полевых применений[3].

LOD для комплекта LFD обычно устанавливается производителем комплекта, чтобы соответствовать экспрессии в наименее экспрессирующей разновидности. Изучена перекрестная реактивность с другими белками. Комплекты LFD коммерчески доступны во всем мире. Заявления на другие (то есть не зернистые) белоксодержащие матрицы, такие как лист, четко определены производителем набора в документации, которая является частью набора, и должны подтверждаться данными проверки метода производителя.

Альтернативное использование наборов на других культурах и матрицах (например, пищевых продуктах) должно поддерживаться независимой валидацией и определением LOD лабораторией, проводящей нестандартные испытания.

**В.2 Область применения метода**

В данном приложении указывается LFD для определения POI, которые присутствуют в устойчивых к гербицидам или вредных организмах культурах или ингредиентах, обработанных из биотехнологических культур. В данном приложении приводятся общие рекомендации для методов LFD для обнаружения POI в определенной матрице и, в общем, рассматриваются существующие процедуры для методов на основе LFD.

**B.3 Принцип**

**B.3.1 Общие положения**

Как показано на рисунке B.1, типичный LFD состоит из нитроцеллюлозной мембраны (1) на подложке (2) с двумя линиями: тестовая линия (3) иммобилизует антигенспецифическое захватывающее антитело (4) и контроль линия (5) иммобилизует антитела другого типа, которые распознают меченые антиген-специфические конъюгатные антитела (6).



Условные обозначения

1 нитроцеллюлозная мембрана

2 подложки

3 тестовая линия

4 антигенспецифическое захватывающее антитело

5 контрольная линия

6 антитело, специфичное к конъюгату на основе антитела, меченного золотом

7 конъюгат на основе антигенспецифического антитела, меченного золотом

8 подушка для конъюгата на основе антитела, меченного золотом

9 образец и буферная подушка

10 впитывающая подушка

11 экстракт положительного образца

12 антиген-мишень/белок, представляющий интерес (POI)

13 комплекс антигена к конъюгату на основе антитела, меченного золотом

14 сэндвич-образование с захватом антител

15 несвязанное конъюгированное антитело, захваченное антиконъюгатным антителом.

Примечание - Адаптировано из ссылки [4].

**Рисунок B.1 - Схема и описание устройства, основанное на принципе растекания жидкости в радиальном направлении (LFD)**

Антигенспецифическое детектирующее антитело конъюгируют с золотом (7) и сушат в волокнистой подушке (подушке для конъюгата антител или золотой подушке (8)). Оптимизированные буферы, необходимые для выполнения испытания, включены в подушку для образцов (9). На противоположном конце стрипа также содержит впитывающую прокладку (10), выполненную из волокна, которая обеспечивает необходимое впитывание для протекания жидкостей через нитроцеллюлозную мембрану. Если стрип погружают в экстракт положительного образца (11), антиген-мишень (12) в образце сначала связывается со специфичным антителом, меченного золотом (13) и протекает через мембрану. Когда он проходит над испытательной линией, он образует «сэндвич» с захватывающим антителом (14), присутствующим в испытательной линии. Это приводит к образованию видимой розовато-красной линии, и результат интерпретируется как положительный. Избыточное антитело, меченое золотом (15) далее перемещается, и когда оно проходит над контрольной линией, оно распознается иммобилизованными антителами в этой линии и учитывает развитие второй линии. Вторая линия, часто называемая «контрольной линией», служит внутренним контролем. Контрольные и контрольные линии могут быть различной интенсивности. Устройство является отрицательным, если наблюдается только контрольная линия. Этот отрицательный результат не следует рассматривать как доказательство отсутствия аналита. Изучите пп. 9.1 для получения дополнительной информации о результатах отчетности.

**B.3.2 Визуализированные результаты испытаний по LFD**

Примеры положительных, отрицательных и недействительных результатов, полученных с помощью LFD, показаны на рисунке B.2. Развитие контрольной линии в течение требуемого времени реакции показывает, что LFD функционировал должным образом. Любой LFD, который не развивает контрольную линию (на рисунке B.2, он находится ближе всего к вершине полосы), должен быть отброшен, и испытательная часть должна быть снова проанализирована с использованием новой испытательного стрипа. Если экстракт образца содержал POI, вторая линия (на рисунке B.2, тестовая линия находится ближе всего к стрелкам) будет развиваться на LFD в течение требуемого времени реакции. Результаты испытаний следует интерпретировать в соответствии с инструкциями производителя для POI. Если после требуемого времени реакции тестовая линия не наблюдается, результаты следует интерпретировать в соответствии с инструкциями производителя для POI. Если результаты интерпретируются как отрицательные, то есть тестовая часть не содержит POI, тогда POI может присутствовать на уровнях ниже LOD или POI был изменен, что делает его необнаружимым (например, тестовая часть была сильно обработана, например, обезжиренной мукой).



**Рисунок B.2 - Пример результатов устройства, основанного на принципе растекания жидкости в радиальном направлении (LFD)**

**B.4 Реагенты и оборудование для испытаний**

**B.4.1 Общие положения**

Любое отклонение от определенных критериев эффективности может указывать на недостаточную стабильность реагента. Экстракция может быть выполнена с использованием поставляемого или подготовленного буфера или, в случае, когда буферный раствор включен в стрип, образец может быть экстрагирован в воде. Вода, содержащая большое количество меди, железа и других двухвалентных катионов, не должна использоваться для экстракции образцов или для приготовления буферного раствора.

LFD должны храниться в соответствии со спецификациями производителя. Обычно они могут храниться при комнатной температуре или, в некоторых случаях, храниться в холодильнике для увеличения срока годности и будут работать в соответствии с принципами, изложенными в данном приложении, в течение периода, равного одному году с даты отгрузки продукта или даты истечения срока годности, отмеченной на упаковке продукта. Длительное воздействие отклоняющихся условий, особенно высоких температур или влажности, отрицательно повлияет на результаты теста. В тех случаях, когда контейнеры с полосками хранятся в холодильнике, дайте им нагреться до комнатной температуры перед открытием, чтобы предотвратить конденсацию. Влагопоглотитель обычно присутствует в канистре. Поэтому важно хранить полоски в оригинальных контейнерах производителя с осушителем.

B.4.2 Реагенты и оборудование, которые могут быть предоставлены с испытательным комплектом.

B.4.2.1 Тест-полоски в закрытом контейнере (LFD).

В.4.2.2 Пробирки для проб, объемом 1,5 мл или меньше, по мере необходимости.

В.4.2.3 Переносные пипетки.

В.4.2.4 Буферный раствор для экстракции.

В.4.3 Реагенты и оборудование, не входящие в комплект для испытаний

В.4.3.1 Деионизированная или дистиллированная вода или вода, которая была очищена или эквивалентна.

В.4.3.2 Лабораторный блендер.

В.4.3.3 Банки для блендера или другие бутылки, которые можно приспособить к блендеру.

В.4.3.4 Штатив для пробирок.

В.4.3.5 Градуированный цилиндр, 250 мл.

В.5 Лабораторное оборудование

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

В.5.1 Холодильник

В.5.2 Лабораторные весы.

В.5.3 Малый пробоотборник (необязательно).

В.5.4 Пипетки.

B.5.5 Считыватель LFD (необязательно).

В.5.6 Штатив для пробирок для пробирок.

**B.6 Процедура**

Предупреждение - С образцами следует обращаться в перчатках. Стандартной лабораторной вентиляции достаточно. Поверхности должны быть очищены от растительных остатков или частиц от ранее измельченных материалов. Дополнительные меры предосторожности см. В B.6.4. Прочитайте и следуйте инструкции производителя для каждого комплекта.

**B.6.1 Ограничения процедуры**

LFD ограничены качественными или полуколичественными применениями. Кроме того, LFD ограничены образцами, которые экспрессируют белок-мишень на уровнях, достаточных для экстрагирования для установления LOD, и которые однозначно можно интерпретировать как положительные с высоким уровнем достоверности. Для термически обработанных, экструдированных и составных образцов данная корреляция может быть неприменима, поскольку белок становится разложенным и денатурированным и, таким образом, не распознаваемым антителами захвата и/или обнаружения в этих условиях.

Использование блендера, отличного от того, который указан производителем набора, должно быть проверено до замены, и, возможно, придется установить новые параметры.

Другие соображения о неэффективности для LFD включают в себя следующее.

- Осаждение золотого конъюгата при разработке испытания может стать причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Конъюгаты коллоидного золота типа, используемого в большинстве LFD для обнаружения POI, могут быть осаждены чрезмерным содержанием соли или pH. Частично агрегированное золото может быть неспецифично приведено на тестовой линии, что дает ложноположительный результат. Если золото более сильно агрегируется, можно предотвратить попадание части его в мембрану, что приводит к снижению сигнала и, таким образом, к получению ложноотрицательного результата. Высокоосажденное золото никогда не попадет в мембрану, что приведет к неверному анализу.

- Когда LFD подвергаются воздействию неподходящих условий хранения, особенно высокой влажности, могут возникать ложноположительные и ложноотрицательные результаты из-за агрегации коллоидного золота и/или потери активности антител. LFDs, как правило, изготавливаются при низкой влажности и упаковываются с осушителем для поддержания их сухости. Пока тестовое устройство остается сухим, LFD могут быть стабильными в течение многих месяцев. Срок годности должен указываться производителем для каждой партии.

- Нарушение потока жидкости может давать как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты и может происходить, когда отношение извлечения буфера (или воды) к образцу слишком низкое, образец слишком тонко измельчен или масло или другой компонент образца препятствуют течению. Материал в виде частиц может засорить мембрану, предотвращая попадание золота в стрип. Частично засоренные мембраны могут вызывать неспецифическое связывание на тестовой линии или препятствовать промыванию достаточного количества образца мимо тестовой линии, что приводит к слабому ложноположительному или трудно интерпретируемому результату.

- Большинство LFD имеют ограничение на объем образца и глубину, на которой они вставляются в образец. При слишком глубоком погружении в жидкость прокладка конъюгата вступает в непосредственный контакт с экстрактом пробы, конъюгат золота высвобождается в жидкость, и испытательная линия будет отсутствовать или станет очень слабой. Когда некоторые LFD используются с высококонцентрированной растительной тканью, хлорофилл может неспецифично связываться с тестовой линией, что приводит к появлению светло-зеленой линии (вместо положительной розовой линии). Неопытный аналитик может интерпретировать такой тест как положительный.

LFD предназначены для обеспечения оптимальной производительности при температуре окружающей среды, то есть от 15-30 ° C. Чувствительность LFD указана производителем в его «руководстве пользователя» или «вкладыше продукта». Следует избегать попыток измерить экспрессию белка ниже этого уровня чувствительности (т. е. требования производителя LOD).

**B.6.2 Отбор образца**

В.6.2.1 Подготовка образцов

Следует соблюдать осторожность, чтобы избежать чрезмерного нагрева образца во время измельчения. Действие блендера смешает и размалывает образец. Следуйте рекомендациям пользователя производителя тест-набора по размеру банки, соотношению измельченного образца к объему буфера и времени измельчения для извлечения образца. Размер частиц 450 мкм или менее подходит для LFD. Для подготовки образца может быть использована следующая процедура.

а) Взвесьте образец в контейнер соответствующего размера.

b) Закройте защитной крышкой контейнер, прикрепленный к блендеру.

c) Измельчите образец на высокой скорости в течение указанного времени или пока все зерна не будут раздроблены и образец не станет однородным.

d) Добавьте воды (B.4.3.1) в соответствии с рекомендациями производителя для каждого комплекта.

e) Закройте и энергично встряхните контейнер, пока весь образец не станет влажным (следуйте рекомендациям производителя; обычно от 20-30 с, в зависимости от количества и типа зерна/семян).

е) Образец начнет оседать сразу. Удалите жидкость из контейнера для образцов через 10–20 с.

g) Наберите достаточно жидкости, чтобы наполнить пипетку для переноса и до линии в верхней части расширяющейся части колбы пипетки. Перенести экстракт в реакционную пробирку, обычно в верхнюю часть конической пробирки, или около 0,5 мл. В некоторых случаях производитель может иметь более конкретные объемы, которые следует использовать.

h) Используйте новую пипетку для переноса и реакционную пробирку для каждого образца.

Подготовка образца сильно зависит от параметров, указанных каждым производителем стрипов, особенно от отношения веса образца к объему буфера для экстракции.

В.6.2.2 Меры по предотвращению загрязнения во время подготовки образца

B.6.2.2.1 Общие положения

LFD могут быть очень чувствительными и обычно разрабатываются для обнаружения очень небольших количеств белков. По этой причине крайне важно, чтобы все оборудование, используемое для обработки образцов, тщательно очищалось между партиями образцов. Процедуры, приведенные в B.6.2.2.2 и B.6.2.2.3, включают в себя первый этап физического удаления как можно большего количества частиц. Второй шаг - денатурировать и сделать нереакционноспособным любой белок, который остается на оборудовании.

B.6.2.2.2 Очистка измельчителя или блендера

В идеальной ситуации детали блендера и банки тщательно очищаются от остатков пыли перед приготовлением второго образца. Чистить щеткой с мягкой щетиной. Промыть спиртом, когда это применимо. Рекомендуется два полоскания или распыления. Затем промойте теплой водой. Дайте оборудованию высохнуть на воздухе. Периодически, после мытья кисти, вымачивайте в спиртовом растворе. Всегда чистите и сушите щетку перед последующим использованием. Перед использованием протрите все оборудование чистой одноразовой мягкой тканью или лабораторными полотенцами.

В определенных ситуациях, если тестируется большое количество отрицательных образцов, необходимо хорошо промыть колбы водой между использованиями и более тщательно очищать после положительного образца.

В.6.2.2.3 Чистота рабочей зоны

Избегайте попадания пыли в рабочую зону. Не позволяйте пыли от одной обработки загрязнять оборудование для последующей обработки. Для оптимальной работы используйте LFD в помещении, отделенном от помещения, где проводятся шлифовка и подготовка, чтобы избежать возможного загрязнения пылью. Чтобы удержать пыль, шлифование может выполняться в зоне с отрицательным давлением воздуха.

B.6.3 Процедура анализа

Оставьте LFD и образцы для достижения комнатной температуры, если они хранились в холодильнике.

Поместите 0,5 мл или объем, как указано производителем подготовленного экстракта образца в соответствующую пробирку для образцов, как рекомендовано производителем. Некоторые наборы требуют определенного объема, поэтому важно использовать оборудование из того же комплекта, что и стрипы, если таковые имеются.

Поместите подушечку для образцов LFD на дно пробирки и дайте ей инкубироваться в течение 5 минут или в соответствии с предписаниями производителя. Если стрип размещен правильно, жидкость будет вытекать к верхней части полоски посредством капиллярного воздействия.

При необходимости используйте образцы положительного и отрицательного контроля.

Интерпретация результатов заключается в следующем:

а) отсутствие линии на полосе указывает на неверный результат;

b) появление на полосе только контрольной линии указывает на отрицательный результат;

c) появление двух полос на полосе указывает на положительный результат как минимум для одного POI;

d) появление более двух линий на полосе указывает на положительный результат для более чем одного POI.

**B.6.4 Испытание производительности**

В.6.4.1 Извлечение тестовой части и стандартного образца

Если используются эталонные материалы с отрицательной и положительной матрицей, то они должны быть извлечены при тех же условиях, что и для испытательных участков.

B.6.4.2 Считывание стрипов LFD

Убедитесь, что стрелки на крышке фильтра направлены в трубу так, чтобы впитывающая или резервуарная подушка находилась сверху.

Часто проверяйте дисплей результатов после добавления стрипов пробирку.

По крайней мере, одна линия, линия управления, должна всегда развиваться примерно на один сантиметр вниз от впитывающей площадки. Линия от розового до красного цвета в этом положении указывает на то, что устройство работает нормально.

Линия от розового до красного, появляющаяся под контрольной линией, является тестовой линией и указывает на положительный результат. Если LFD отображает две розовые или красные линии, тест завершен, и образец является положительным для этой конкретной черты.

Если примерно через 5 минут (или в соответствии с указаниями изготовителя) на тест-полоске видна четко видимая контрольная линия, а положительная испытательная линия не обнаружена, тогда испытательный образец является отрицательным и о нем следует сообщать в соответствии с пунктом 12.

Полоски следует интерпретировать только после завершения инкубации образца. Образцы и впитывающие прокладки могут быть отрезаны, если полоса должна быть заархивирована. Можно заархивировать изображение полос в цифровом виде, так как стабильность реагирующих полос не определяется производителем для архивных целей.

**B.7 Статистические приложения для порогового анализа**

Тестирование на порог является распространенным применением при обработке зерна и контроле качества семян [4]. Когда тестируемые образцы содержат дискретные частицы, такие как семена и зерно, можно использовать качественные методы с планами статистической выборки, чтобы определить, является ли содержание POI выше или ниже указанных пороговых значений с высокой статистической достоверностью.

Примечание - Для разработки плана статистического тестирования можно использовать веб-сайт Министерства сельского хозяйства США, Службы сельскохозяйственного маркетинга, Федеральную службу зерновой инспекции (USDA/AMS/FGIS) H или приложение электронной таблицы Seedcalc, предоставленное на веб-сайте Международной ассоциации по тестированию семян (ISTA) M.

**B.8 Статус**

При разработке метода производительность проверяется в условиях хранения, указанных производителем.

**Библиография**

[1] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий).

[2] Remund K.M., Dixon D.A., Wright D.L., Hoden L.R. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. Seed Science Research. 2001, 11(2), pp. 101–119 (Ремунд К.М., Диксон Д.А., Райт Д.Л., Ходен Л.Р. Статистические соображения при тестировании чистоты семян на трансгенные признаки. Семеноведение. 2001, 11 (2), с. 101-119).

[3] Lipp M., Anklam E., Stave J. Validation of an Immunoassay for Detection and Quantification of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions Using Reference Materials: Interlaboratory Study. Journal of AOAC International. 2000, 83(4), pp. 919–927 (Липп M., Анклам Э., Стейв ДЖ. Валидация иммуноанализа для выявления и количественного определения генетически модифицированной сои в пищевых продуктах и пищевых фракциях с использованием стандартных материалов: межлабораторное исследование. Журнал AOAC International. 2000, 83 (4), с. 919-927)

[4] Grothaus G.D., Bandla M., Currier T., Giroux R., Jenkins G.R., Kipp M., Shan G., Stave J.W., Pantella V. Immunoassays as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *JAOAC International*. 2006, 89(4), pp. 913–928 (Гротаус Г.Д., Бандла М., Курьер Т., Жиру Р., Женкинс Г.Р., Кипп М., Шан Г., Стайв Дж. В., Пантелла В. Иммуноанализ как аналитический инструмент в сельскохозяйственной биотехнологии. JAOAC International. 2006, 89 (4), с. 913-928)

[5] US Department of Agriculture. Agricultural Marketing Service, Federal Grain Inspection Service (USDA/AMS/FGIS). Available at: https: //www .gipsa .usda .gov/fgis/fgis .aspx (Министерство сельского хозяйства США. Служба сельскохозяйственного маркетинга, Федеральная служба по надзору за зерном (USDA/AMS/FGIS). Доступно на сайте: https: // www. gipsa.usda. gov/fgis/fgis. аspx)

[6] International Seed Testing Association. Available at: https: //www .seedtest .org (Международная ассоциация тестирования семян. Доступно на сайтеу: https: // www.seedtest.org)

**Приложение Д.А**

*(информационное)*

**Сведения о соответствии ссылочного международного документа межгосударственному стандарту**

**Таблица ДА.1**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Обозначение ссылочного международного документа по стандартизации | Степень соответствия | Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта |
| ISO 16577:2016 Molecular biomarker analysis — Terms and definitions (Биомаркерный молекулярный анализ. Термины и определения) | IDT | [отсутствует](https://www.egfntd.kz/rus/tv/390780.html?sw_gr=-1&sw_str=ISO%20105-A02&sw_sec=-1) |

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**МКС 67.050 (IDT)**

**Ключевые слова:** иммунохимические методы обнаружения белков, количественные определения специфических белков, анализ белков, конъюгат, отбор проб, реактивы, иммуноферментный анализ

.

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

**МКС 67.050 (IDT)**

**Ключевые слова:** иммунохимические методы обнаружения белков, количественные определения специфических белков, анализ белков, конъюгат, отбор проб, реактивы, иммуноферментный анализ

.

РАЗРАБОТЧИК

РГП «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» Комитета технического регулирования и метрологии Министерства торговли и интеграции Республики Казахстан

|  |
| --- |
| **Заместитель** |
| **Генерального директора И. Хамитов** |
|  |
| **Начальник** |
| **Центра стандартизации А. Кудайбергенова** |
|  |
| **Руководитель рабочей группы Е. Кулешова** |
|  |
| **Заместитель** |
| **Руководителя рабочей группы С. Кайликперова** |
|  |
| **Главный специалист** |
| **Информационного центра по ТБТ/СФС А. Басымбеков** |