

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Научная статья

УДК 681.2: 006.91-027-21

<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-45-54>



Я лично видел что-то похожее на животное, но я не могу быть абсолютно уверен, что это не минерал. Я думаю, что речь шла скорее об энергии, чем о материи. Условно говоря, проще всего было бы описать все это как явление, парящее где-то на границе размеров и обозначений, на стыке цвета, формы, запаха, массы, длины и ширины, контуров, теней, темноты и т. д. и т. п. вперед.

*Славомир Мрожек, «Strep-Tease»**

Стандартные образцы качественных свойств биологических субстанций

В. В. Морозова^{1,2} , Е. В. Кулябина¹ , В. Ю. Морозов³, Т. В. Кулябина¹ 

¹ ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы», Москва, Россия
e-mail: lerapuri@gmail.com

² California State University, Fresno, California, USA

³ АО «Волга», Балахна, Нижегородская область, Россия

Аннотация: Метрологическая прослеживаемость результатов исследований качественных свойств биологических субстанций является на сегодняшний день нерешенной задачей. В первую очередь, это связано с отсутствием ГСО качественных свойств, отсутствием требований и практик применения в области метрологии инструментов, обеспечивающих прослеживаемость результатов исследований качественных свойств, каковыми являются и последовательность нуклеотидов нуклеиновых кислот, ДНК, РНК, и цвет мочи, и буквенные коды.

В ходе проведенного исследования обоснована актуальность разработки теории, требований и практики применения в российской метрологии инструментов обеспечения прослеживаемости результатов исследований качественных свойств. Приведены различия между процессом измерений и процессом исследований качественных свойств. Предложен проект цепи метрологической прослеживаемости результата исследований качественных свойств к международному протоколу гармонизации с учетом того факта, что первичных эталонов качественных свойств не существует, так же как и не существует первичных референтных методик измерений качественных свойств. Приведены методы установления аттестованных характеристик стандартных образцов фрагмента митохондриальной ДНК человека и инактивированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2, в том числе дополнительных характеристик качественного свойства «последовательность нуклеотидов нуклеиновых кислот». Таким образом, установлено, что неопределенность качественных свойств может быть выражена как вероятность или уровень доверия. Стандартные образцы качественных свойств представляют большой интерес в качестве средств метрологического обеспечения достоверности идентификации качественных свойств биологических субстанций, к которым в том числе относится последовательность нуклеотидов ДНК (гены) человека.

Основная значимость исследования состоит в создании предпосылок к применению приведенных в работе выводов для создания новой ветви метрологии, которая будет относиться к созданию методов и средств обеспечения достоверных результатов определений качественных свойств веществ и материалов.

* Bettencourt da Silva R., Ellison S. L. R (eds.) Eurachem / CITAC Guide: Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. First Edition, Eurachem. 2021. Available from: <https://www.eurachem.org>

Ключевые слова: качественные свойства, стандартные образцы качественных свойств, метрологическая прослеживаемость качественных свойств, JCTLM, критерии оценки качества стандартных образцов качественных свойств

Ссылка при цитировании: Стандартные образцы качественных свойств биологических субстанций / В. В. Морозова [и др.] // Эталоны. Стандартные образцы. 2023. Т. 19, № 3. С. 45–54.
<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-45-54>

Статья поступила в редакцию 18.01.2023; одобрена после рецензирования 06.02.2023; принята к публикации 25.04.2023.

REFERENCE MATERIALS

Research Article

Reference Materials for Nominal Properties of Biological Substances

Valeria V. Morozova^{1, 2} , Elena V. Kulyabina¹ , Vitaly Yu. Morozov³, Tatiana V. Kulyabina¹ 

¹All-Russian Scientific Research Institute of Metrological Service, Moscow, Russia
e-mail: lerapuri@gmail.com

²California State University, Fresno, California, USA

³JSC «Volga», Balakhna, Nizhny Novgorod region, Russia

Abstract: Metrological traceability of the research results of the nominal properties of biological substances is currently an unsolved problem. This is primarily due to the absence of CRMs for nominal properties, the lack of requirements and practices in the field of metrology for tools that ensure the traceability of the research results of nominal properties, such as the nucleotide sequence of nucleic acids, DNA, RNA, and the color of urine, and letter codes.

In the course of the research, the relevance of the development of the theory, requirements, and practice of using tools in Russian metrology to ensure the traceability of the research results of nominal properties is substantiated. Differences between the process of measurements and studies of nominal properties are given. A project of a metrological traceability chain of the research results of nominal properties to the international harmonization protocol is proposed, taking into account the fact that there are no primary standards of nominal properties, and there are no primary reference methods for measuring nominal properties. Methods for establishing the certified characteristics of reference materials of a fragment of human mitochondrial DNA and the inactivated strain «GK2020/1» of the coronavirus SARS-CoV-2, including additional characteristics of the nominal property «nucleotide sequence of nucleic acids», are presented. Thus, it has been established that the uncertainty of nominal properties can be expressed as a probability or level of confidence. In turn, reference materials of nominal properties are of high interest as a means of metrological assurance of the reliability of identification of the nominal properties of biological substances, which include the DNA nucleotide sequence (genes) of a human being. The main significance of the research is to create prerequisites for the application of the findings given in the work to create a new branch of metrology, which will be related to the creation of methods and means to ensure reliable results for determining the nominal properties of substances and materials.

Keywords: nominal properties, reference materials for nominal properties, metrological traceability of nominal properties, JCTLM, criteria for assessing the quality of reference materials for nominal properties

For citation: Morozova V. V., Kulyabina E. V., Morozov V. Yu., Kulyabina T. V. Reference materials for nominal properties of biological substances. *Measurement Standards. Reference Materials*. 2023;19(3):45–54.
<https://doi.org/10.20915/2077-1177-2023-19-3-45-54>

The article was submitted 18.01.2023; approved after reviewing 06.02.2023; accepted for publication 25.04.2023.

Введение

Метрология со дня основания этой науки была наукой об измерениях, способах и средствах достижения требуемой точности измерений. Вот уже более чем полвека как существуют новые области человеческого знания, в которых термин «измерения» не применим, а используются термины «испытания», «исследования», которые обычно ассоциируются с методами научного познания, но не методами измерений. Речь идет об исследованиях генома человека [1], сравнении результатов исследований с известными цветовыми шкалами, анализе форм, гладкости поверхности, зубчатости края различных типов клеток и т. д. Во всех приведенных примерах ученые сталкиваются с необходимостью сравнивать результаты исследований между собой, обеспечивать прослеживаемость полученных значений, при этом не измеряя их, то есть, не соотнося с единицами физических величин международной системы единиц SI. Происходит это потому, например, что при расшифровке генома человека самым важным свойством является последовательность нуклеотидов ДНК человека, которую невозможно измерить путем сравнения с единицей длины, или концентрации, или любой другой единицей физической величины. Прослеживаемость обеспечивается до элементарного нуклеотида – аденина, гуанина, цитозина и тимина. То есть в основе такой системы прослеживаемости лежат фундаментальные константы в виде азотистых оснований, из которых состоит любой живой объект – человек, животное, растение, в конце концов вирусы, которые не считаются живыми, но состоят опять же из нуклеотидов (только в их случае нуклеотид урацил заменяет тимин).

Исследования «качественных свойств» пищевых продуктов обусловлено необходимостью обеспечения народонаселения качественными продуктами питания. Например, когда покупатель точно знает, что он приобретает продукт с точным соответствием заявленного состава, указанного на этикетке производителем, или уверен в том, что заплатил именно за дорогие полезные морепродукты и их же приобрел, а не нечто всего лишь внешне похожее. Употребление продуктов, содержащих фальсификат, может привести к серьезным последствиям, в частности, к ухудшению здоровья человека вплоть до летального исхода.

При выполнении поручений органов суда и прокуратуры в клинической и лабораторной медицине исследования «качественных свойств» зачастую имеют ключевое значение. Например, при установлении отцовства, где точное определение последовательности

нуклеотидов ДНК испытуемого человека играет важнейшую роль. Или, например, для достоверной идентификации коронавируса SARS-CoV-2, имеющей решающее значение для ограничения распространения вируса и для снижения социального и экономического бремени [2, 3].

Теоретический анализ литературы и анализ реализованных практических работ показывает, что проблема исследований качественных свойств последовательности нуклеотидов нуклеиновых кислот, РНК, ДНК рассматривалась достаточно широко ведущими национальными метрологическими институтами (Национальный институт стандартов и технологий США (NIST)¹ [4, 5], Национальный метрологический институт Китая (NIM China)², Национальный метрологический институт Южной Кореи (KRISS) [6]). В то же время целый ряд конкретных (методических) вопросов, связанных с исследованием качественных свойств «последовательности нуклеотидов нуклеиновых кислот, РНК, ДНК», остается мало разработанными. К этим вопросам можно, прежде всего, отнести до сих пор рассматриваемые в России вопросы широкого применения терминологии, связанной с качественными свойствами, вопросы разработки и аттестации методик определения таких свойств, создания, испытаний и утверждения типа стандартных образцов таких свойств.

Полученные результаты литературного обзора указывают на необходимость дополнительных исследований для лучшего понимания, формулировки требований и практики применения в области метрологии инструментов обеспечения прослеживаемости результатов исследований «качественных свойств», каковыми является и последовательность нуклеотидов нуклеиновых кислот, ДНК, РНК, и цвет мочи, и буквенные коды.

Цель данного исследования – выявление и анализ основных факторов, влияющих на создание средств и методов метрологического обеспечения исследований «качественных свойств», обеспечение их прослеживаемости.

¹ Certificate of Analysis Standard Reference Material 2392 Mitochondrial DNA Sequencing (Human) // National Institute of Standards & Technology. URL: <https://tsapps.nist.gov/srmext/certificates/2392.pdf>

Certificate of Analysis Standard Reference Material 3246 Ginkgo biloba (Leaves) // National Institute of Standards & Technology. URL: <https://tsapps.nist.gov/srmext/certificates/3246.pdf>

² Reference material certificate Chinese quartet family 1 (monozygotic twin family-mother). Human whole genomic dna sequence reference material from blymphoblastoid cell lines // National Certified Reference Material. URL: <https://www.ncrm.org.cn/Repository/0950c4e0-e829-420c-b494-f88cba1fd576.pdf>

Теоретический анализ

Качественные свойства (nominal property), согласно руководству ИСО / МЭК 99:2007, представляют собой свойства явления, тела или вещества, которые не могут быть выражены размером. К ним относятся, например, форма ядра лейкоцита, цвет мочи, цвет спинномозговой жидкости, таксон, последовательность нуклеотидов нуклеиновых кислот, ДНК, РНК, т. е. такие свойства объекта, к которым невозможно применить термины «размер», «измерение». Качественные свойства присущи любому живому объекту – человеку, представителям животного и растительного мира, любым существам, имеющим в составе нуклеиновые кислоты, рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). Вероятно, в будущем, на следующих этапах развития науки, техники и технологий (в том числе измерительных технологий), мы сможем обеспечить «измерение» качественных свойств, однако в настоящее время значения таких свойств получают путем их «исследований» [7]. По определению, данному в работе [7], качественное свойство – это свойство явления, тела или вещества, которое не может быть выражено размером, а значение качественного свойства – это признак, общий для эквивалентных индивидуальных качественных свойств.

Несмотря на сложности по обеспечению прослеживаемости качественных свойств, такую работу проводить необходимо для обеспечения достоверной идентификации человека, продуктов питания животного происхождения, рыбных ресурсов, а также современных вирусов, в частности, коронавируса SARS-CoV-2. Достоверная идентификация, в свою очередь, невозможна без привлечения меры качественных свойств, в качестве которой выступают стандартные образцы (СО).

Как было показано выше, терминология качественных свойств имеет отличия от терминологии физических величин. Так, эталон, при применении этого понятия для качественных свойств, является реализацией определения данного качественного свойства с установленным значением качественного свойства и связанной с ним неопределенностью исследований, используемой в качестве основы для сравнения [8]. То есть единственное отличие от классического понятия «эталон» заключается только в использовании термина «исследование» вместо термина «измерение».

Если говорить об определении первичной референтной методики исследований качественного свойства, то разница опять же в использовании термина «результат исследования». Результат исследования – это набор значений качественных свойств, приписываемых

исследуемому свойству вместе с любой другой доступной и существенной информацией [8].

Поскольку к качественным свойствам не применима классическая терминология в области метрологии, используемая для единиц физических величин, то иерархическую схему прослеживаемости необходимо представить в виде, соответствующем прослеживаемости качественных свойств, например, для последовательности нуклеотидов ДНК, или РНК, или любых нуклеиновых кислот. Опираясь на временные методические рекомендации, утвержденные Минздравом России³, авторы предлагают проект цепи метрологической прослеживаемости результата исследований качественных свойств (рис. 1).

Представленный на рис. 1 подход к обеспечению прослеживаемости результатов определения качественных свойств является ориентиром для будущих проектов, над которыми авторы работают.

На данный момент в Федеральном информационном фонде по обеспечению единства измерений (ФИФ ОЕИ) утверждены и зарегистрированы только СО количественных характеристик:

- состав массовой доли различных компонентов субстанций, например, фармацевтических субстанций: ГСО 11413–2019, ГСО 11732–2021, ГСО 11360–2019, ГСО 11532–2020⁴;

- состав массовой концентрации, например, реактивного антигена в растворе ГСО 10922–2017,

³ Временные методические рекомендации от 16 апреля 2020 г. «Лекарственная терапия острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) в амбулаторной практике в период эпидемии COVID-19. Версия 2» (разработаны научным сообществом: Сеченовский университет, ФГБУ «НМИЦ ФПИ», НМИЦ терапии и профилактической медицины) // Информационно-правовой портал Гарант.ру. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/73816786/>

⁴ ГСО 11413–2019 Стандартный образец утвержденного типа состава натамицина // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/889620>

ГСО 11732–2021 Стандартный образец утвержденного типа состава субстанции грамицидина с гидрохлорида (советского) // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/1392008>

ГСО 11360–2019 Стандартный образец утвержденного типа массовой доли амфотерицина Б // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/719091>

ГСО 11532–2020 Стандартный образец утвержденного типа состава оливомицина А // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/1236979>



Рис. 1. Проект цепи метрологической прослеживаемости результата исследований качественного свойства – последовательность нуклеотидов ДНК, или РНК, или нуклеиновых кислот, установленная через иерархию калибровок

Fig. 1. The project of the metrological traceability chain of the research results of a nominal property of the nucleotide sequence of DNA or RNA, or nucleic acids, defined through a calibration hierarchy

рекомбинантного белка вируса в растворе ГСО 10921–2017⁵;

– СО свойства каталитической концентрации, например, ферментов: ГСО 11387–2019, ГСО 11386–2019.

⁵ ГСО 10922–2017 Стандартный образец утвержденного типа массовой концентрации рекомбинантного протективно-го антигена bacillus anthracis в фосфатно-солевом растворе // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/389279>

ГСО 10921–2017 Стандартный образец утвержденного типа массовой концентрации рекомбинантного белка GP вируса Эбола в фосфатно-солевом растворе // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/389280>

Однако уже сейчас существуют такие СО, для которых могут быть аттестованы не только количественные, но и качественные свойства вещества. Например, для ГСО 11607–2020⁶ и ГСО 11661–2020⁷, где кроме аттестованных характеристик массовой доли/

⁶ ГСО 11607–2020 Стандартный образец утвержденного типа фрагмента митохондриальной ДНК человека культуры клеток линии HL-60 (участок 5999–7792) // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/1383975>

⁷ ГСО 11661–2020 Стандартный образец утвержденного типа инактивированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2 // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/19/items/1384811>

концентрации также должны быть аттестованы последовательности нуклеотидов ДНК и РНК, благодаря которым эти ГСО на самом деле применяются и без которых не возможен контроль функционирования анализаторов геномных, секвенаторов.

Материалы и методы

В ходе исследования показаны методы и средства определения аттестованных характеристик (в том числе не аттестованных – качественных свойств, но имеющих в описании типа ГСО) приведенных выше СО.

Процедура утверждения типа СО в случае наличия готового (коммерчески доступного) исходного материала (на примере ГСО 11607-2020)

В случае наличия готового (коммерчески доступного) исходного материала для создания СО, а именно очищенного ПЦР-продукта, поступали следующим образом. В качестве исходного образца для приготовления СО использовали очищенный ПЦР-продукт, полученный при высокоточной амплификации коммерческого препарата ДНК известного нуклеотидного состава.

Очищенный и обессоленный ПЦР-продукт разводили в деионизированной воде в 50 раз в объеме 1000 мм³ и этим раствором заполняли кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм. Оптическую плотность определяли при длинах волн 260 нм (A_{260}) и 320 нм (A_{320}) и таким образом определяли концентрацию ДНК в измеряемой пробе. Полученное значение концентрации ДНК использовали для разведения до конечной концентрации.

Последовательность нуклеотидов ДНК СО определяли, используя средства измерений утвержденного типа и поверенные – анализаторы геномные, секвенаторы, например, анализатор геномный (Roche Diagnostics GmbH, Германия) или анализатор генетический капиллярного электрофореза (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург).

Из известной последовательности нуклеотидов рассчитывали массовые доли каждого нуклеотида. Для каждого нуклеотида относительную долю нуклеотида в последовательности нуклеотидов ДНК – D_i рассчитывали по формуле (1):

$$D_i = (K_i \cdot 100)/N, \quad (1)$$

где D_i – относительная доля каждого нуклеотида в последовательности нуклеотидов ДНК, %;

K_i – количество каждого из нуклеотидов в последовательности, шт.;

i – обозначение нуклеотида, который является «титром» – единицей измерений нуклеотида, принимающим 4 значения А, G, C, T;

N – размер последовательности, равный числу нуклеотидов последовательности, шт.

С учетом молекулярной массы каждого нуклеотида рассчитывали массовую долю нуклеотида в соответствии с формулой (2):

$$W_i = (D_i \cdot M_i)/m, \quad (2)$$

где W_i – массовая доля каждого нуклеотида, %;

M_i – молекулярная масса каждого нуклеотида, г;

m – масса последовательности нуклеотидов ДНК, состоящей из N нуклеотидов, г.

После проведения процедуры утверждения типа СО применяют для проверки/калибровки средств измерений при условии их соответствия обязательным требованиям, установленным в поверочных схемах и методиках аттестации эталонов единиц величин или методиках поверки средств измерений, а также для контроля точности и аттестации методик измерений, обеспечения метрологической прослеживаемости результатов измерений.

Процедура утверждения типа СО в случае отсутствия готового (коммерчески доступного) исходного материала (на примере ГСО 11661-2020)

В случае отсутствия готового (коммерчески доступного) исходного материала для создания СО нарабатывали достаточное количество культуры патогенного биологического агента (например, коронавируса SARS-CoV-2) методом ПЦР (полимеразной цепной реакции), определяли концентрацию РНК коронавируса. Наиболее доступным, высокочувствительным и специфичным методом идентификации нуклеиновых кислот SARS-CoV-2 в биологических образцах является метод ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [9, 10]. Поэтому особое внимание уделяли исследованиям аналитической чувствительности наборов реагентов для определения нуклеиновых кислот коронавируса SARS-CoV-2.

Определение концентрации РНК в СО проводили с помощью метода ПЦР в режиме «реального времени» с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Градуировочную характеристику (калибровочную прямую) строили в зависимости числа пороговых циклов от логарифма начальной концентрации. Для построения калибровочной прямой применяли калибровочные растворы, представляющие собой разведенный плазмидный препарат с известной концентрацией (определяемой спектрофотометрическим методом) и содержащие встроенные фрагменты SARS-CoV-2. Измерение концентрации проводили спектрофотометрическим методом используя спектрофотометр V-730 (Jasco Internatijnal Co.

LTD, Япония). Неотъемлемым этапом создания СО являлась инактивация патогенного биологического агента при + 95 °С.

Определение аттестованного значения проводили в соответствии с аттестованной методикой измерений аттестованного значения СО – массовой концентрации, которая разработана и аттестована национальным метрологическим институтом. В случае SARS-CoV-2 во ФГУП «ВНИИМС» была разработана и утверждена методика измерений аттестованного значения стандартного образца инактивированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2 массовой концентрации⁸.

Последовательность нуклеотидов ДНК СО определяли методом секвенирования нового поколения (NGS) [11], используя средства измерений утвержденного типа и поверенные – анализаторы геномные, секвенаторы, которые были указаны выше. В ходе исследования также применяли мини-центрифугу с роторами для микропробирок вместимостью 0,2 см³; 0,6 см³ и 1,5 см³ со скоростью вращения не менее 2400 об/мин.; дозаторы пипеточные, например, Eppendorf Research Plus одноканальные с переменным объемом дозирования (0,5...200) мкл; холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678–85, с холодильной камерой, обеспечивающей поддержание температур от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой, обеспечивающей температуру не выше –18 °С; также вспомогательные реактивы и растворы.

После проведения процедуры утверждения типа СО возможно применять, в первую очередь, для достоверной идентификации патогенных биологических агентов, будь то вирусы или бактерии; для аттестации методик измерений и контроля точности результатов измерений концентрации РНК вирусов, бактерий, количества нуклеотидов участка генома кодирующей РНК и последовательности нуклеотидов специфичного участка генома одноцепочечной РНК вирусов, бактерий, оценки чувствительности и специфичности наборов реагентов для выявления патогенных биологических агентов. ГСО также могут быть использованы для поверки и калибровки анализаторов, амплификаторов с детекцией в режиме реального времени (Real-time PCR), средств измерений, предназначенных для идентификации и определения концентрации штаммов вирусов и бактерий, для генетического анализа (анализаторов генетических) при

условии соответствия метрологических и технических характеристик стандартных образцов требованиям методик поверки и калибровки средств измерений.

Результаты и обсуждение

Возвращаясь к дискуссии об актуальности и возможности создания ГСО качественных свойств, мы должны рассмотреть аспект обеспечения прослеживаемости характеристик таких СО и отметить мнение наших коллег из CCQM Working Group on Nucleic Acid Analysis (CCQM-NAWG), а именно – руководителя Analyte Group 2: Nucleic Acids Review Team⁹ Dr. Alison Devonshire относительно метрологической прослеживаемости СО последовательности нуклеотидов ДНК. В JCTML-EC-07 Annex II [12] приводится мнение экспертов в области молекулярной биологии, которые призывают к всемирной координации для обеспечения гармонизации подхода к обеспечению прослеживаемости последовательности нуклеотидов. Одним из критериев подтверждения идентификации СО последовательности нуклеотидов нуклеиновой кислоты является оцененная неопределенность, которую рекомендуют выражать как вероятность правильного секвенирования исследуемого фрагмента нуклеиновой кислоты. Если все критерии, представленные в JCTML-EC-07 Annex II, соблюдены, тогда аттестованные значения качественных свойств ГСО последовательности будут прослеживаемыми до нуклеотидов, которые не являются единицами SI, однако представляют собой международно признанные референтные единицы (referent units) [12].

Заключение

Метрологическая прослеживаемость результатов исследований качественных свойств биологических субстанций является на сегодняшний день нерешенной задачей. В первую очередь, это связано с отсутствием ГСО качественных свойств, отсутствием требований и практик применения в области метрологии инструментов, обеспечивающих прослеживаемость результатов исследований «качественных свойств», каковыми является и последовательность нуклеотидов нуклеиновых кислот, ДНК, РНК, и цвет мочи, и буквенные коды.

В ходе проведенного исследования авторами представлен анализ основных факторов, влияющих на метрологическое обеспечение исследований «качественных свойств» и их прослеживаемости. К ним относят: несовершенство терминологии, отсутствие в российских

⁸ ФР.1.31.2020.38562 Методика измерений аттестованного значения стандартного образца инактивированного штамма «ГК2020/1» коронавируса SARS-CoV-2 массовой концентрации // Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений : официальный сайт. URL: <https://fgis.gost.ru/fundmetrology/registry/16>

⁹ Analyte Group 2: Nucleic Acids Review Team // BIPM. URL: <https://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/wg/jctlm-rt-nucleic-acids>

ГОСТах положений, принятых мировым сообществом относительно прослеживаемости «качественных свойств», отсутствие законодательных норм, позволяющих обеспечивать прослеживаемость и т. д.

На примере ГСО 11607–2020 и ГСО 11661–2020 установлено, что СО, имеющие аттестованные количественные характеристики массовой доли/концентрации, также могут быть аттестованы на последовательность нуклеотидов ДНК и РНК. Приведенные выводы позволяют применять эти СО для метрологического обеспечения измерений в клинической и лабораторной медицине, для обеспечения качества пищевой продукции, достоверности идентификации анализируемого объекта. Таким образом, показано, что СО качественных свойств биологических субстанций укладываются в проект цепи метрологической прослеживаемости, представленной на рис. 1, устанавливая последовательность нуклеотидов ДНК или РНК, через иерархию калибровок, прослеживаемых до нуклеотидов, которые не являются единицами SI, однако представляют собой международно признанные референтные единицы (referent units) [12].

Приведенный выше пример обеспечения прослеживаемости является образцом решения важной задачи путем плодотворного взаимодействия метрологов стран мирового сообщества. Представляется резонным применение подхода выработки гармонизированной позиции и относительно единого мнения об обеспечении прослеживаемости и других характеристик качественных свойств, которые будут подробно рассмотрены авторами в следующих работах. Видится многообещающим учет полученных выводов для создания новой ветви метрологии, которая будет относиться к созданию методов и средств обеспечения достоверных результатов определений качественных свойств веществ и материалов.

Благодарности: Авторы выражают благодарность д-ру техн. наук, профессору Исаеву Льву Константиновичу за его бесценные советы относительно рассматриваемой темы; д-ру техн. наук Булыгину Федору Владиленовичу за активное участие в формировании научно-обоснованной позиции авторов; ведущему инженеру ФГБУ «ВНИИМС» Мелковой Ольге Николаевне; руководителю референсного центра по коронавирусной инфекции и лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, канд. биол. наук Гушину Владимиру Алексеевичу; заведующему лабораторией трансляционной биомедицины ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, канд. биол. наук Ткачуку Артему Петровичу;

а также ведущему сотруднику ФГБНУ «ВНИРО» Волкову Александру Анатольевичу и руководителю департамента мониторинга среды обитания, водных биоресурсов и продуктов их переработки ФГБНУ «ВНИРО» Фоминой Светлане Юрьевне, без которых данная работа не могла бы быть выполнена.

Это исследование не получало финансовой поддержки в виде гранта от какой-либо организации государственного, коммерческого или некоммерческого сектора.

Acknowledgments: The authors express their gratitude to Lev K. Isaev, Dr. Sci. (Eng.), Professor, for his invaluable advice on the topic under consideration; Fedor V. Bulygin, Dr. Sci. (Eng.), for active participation in the formation of scientifically grounded position of the authors; Olga N. Melkova, Leading Engineer, All-Russian Scientific Research Institute of Metrological Service; Vladimir A. Gushchin, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Reference Center for Coronavirus Infection and the Laboratory of Mechanisms of Population Variability of Pathogenic Microorganisms, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation; Artem P. Tkachuk, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Translational Biomedicine, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N. F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation; Alexander A. Volkov, Leading Researcher, Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography; and Svetlana Yu. Fomina, Head of the Department of Habitat Monitoring, Aquatic Biological Resources and Products of Their Processing, Research Institute of Fisheries and Oceanography, without whom this work could not have been completed.

The research did not receive financial support in the form of a grant from any organization in the public, commercial or non-profit sectors.

Вклад соавторов: Морозова В. В. – написание чернового варианта статьи, проведение исследовательских работ, подготовка и создание визуальных материалов; Кулябина Е. В. – руководство научно-исследовательской работой, разработка замысла исследования, разработка методологии; Морозов В. Ю. – осуществление формального анализа, курирование данных; Кулябина Т. В. – проверка и редакция текста статьи, валидация и контроль измерений.

Contribution of the authors: Morozova V. V. – writing a draft of the article, conducting research, preparing and creating visual materials; Kulyabina E. V. – management of research work, development of the research concept,

development of methodology; Morozov V. Yu. – formal analysis, data curation; Kulyabina T. V. – revision of the text, validation and control of measurements.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материал статьи подготовлен на основе доклада, представленного на V Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях» (Екатеринбург, 13–16 сентября 2022 г.). Переводная версия статьи на английском языке планируется к публикации в книге Sobina E. et al. (eds.). Reference Materials

in Measurement and Technology. RMMT 2022. Switzerland: Springer, Cham.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest. The material of the article was prepared on the basis of the report presented at the V International Scientific Conference «Reference Materials in Measurement and Technology» (Yekaterinburg, September 13–16, 2022). A translated version of the article in English is planned for publication in the book Sobina E. et al. (eds.). Reference Materials in Measurement and Technology. RMMT 2022. Switzerland: Springer, Cham.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Finishing the euchromatic sequence of the human genome / International Human Genome Sequencing Consortium // *Nature*. 2004. Vol. 431, № 7011. P. 931–945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
2. CCQM roadmap to metrology readiness for infectious disease pandemic response / Ju. Braybrooke [et al.] // ResearchGate. URL: https://www.researchgate.net/publication/364029856_CCQM_Roadmap_to_Metrology_Readiness_for_Infectious_Disease_Pandemic_Response (дата обращения: 08.11.2022).
3. В России создан стандартный образец штамма коронавируса // Консорциум Кодекс: официальный сайт. URL: <https://cntd.ru/news/read/v-rossii-sozdan-standartnyy-obrazec-shtamma-koronavirusa?ysclid=le5nj09s3m572223264> (дата обращения: 08.11.2022).
4. DNA molecules as standard reference materials I: Development of DNA identification sequences and human mitochondrial DNA reference sequences / K. McKenney [et al.] // *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*. 1997. Vol. 102, № 1. P. 53–62. <https://doi.org/10.6028/jres.102.005>
5. Human Mitochondrial DNA – Amplification and Sequencing – Standard Reference Materials – SRM 2392 and SRM 2392-I / B. C. Levin [et al.] // NIST Special Publication 260–155. Standard Reference Materials. Washington: U. S. Government printing office, 2003. 93 p. URL: <https://www.nist.gov/system/files/documents/srm/sp260-155.pdf> (дата обращения: 08.11.2022).
6. Developing the Korean human genomic DNA reference material for genomic sequencing / Yo.-K. Bae [et al.] // BIPM. URL: https://www.bipm.org/documents/20126/53306924/P20-J_YLee_JCTLM_2019_KRISS_Poster_Developing_the_Korean_human_genomic_DNA_reference_material.pdf/f47feb69-fd6a-6a5f-73d2-939716328559 (дата обращения: 08.11.2022).
7. Vocabulary on nominal property, examination, and related concepts for clinical laboratory sciences (IFCC–IUPAC Recommendations 2017) / G. Nordin [et al.] // *Pure and Applied Chemistry*. 2018. Vol. 90, № 5. P. 913–935. <https://doi.org/10.1515/pac-2011-0613>
8. О возможности создания цепи метрологической прослеживаемости результатов исследований качественных свойств биологических субстанций / Е. В. Кулябина [и др.] // *Законодательная и прикладная метрология*. 2022. № 5. С. 39–45.
9. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome–related coronavirus-2: a narrative review / M. P. Cheng [et al.] // *Annals Internal Medicine*. 2020. Vol. 172, № 11. P. 726–734. <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
10. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus / M. Shen [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020. Vol. 10, № 2. P. 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.02.010>
11. Considerations for the development of a reference method for sequencing of haploid DNA—an opinion paper on behalf of the IFCC Committee on Molecular Diagnostics, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine / F. Rousseau [et al.] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2009. Vol. 47, № 11. P. 1343–1350. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.319>
12. JCTML-EC-07 Annex II. JCTLM WGI. Nucleic acid review team: Criteria to assess the quality of nominated nucleic acid reference materials with stated nominal properties. 2003. URL: https://www.bipm.org/documents/20126/53185286/JCTLM-EC-07_Annex_II.pdf/fd696763-8247-f607-957f-13f7f778ea5a (дата обращения: 08.11.2022).

REFERENCES

1. Finishing the euchromatic sequence of the human genome / International Human Genome Sequencing. *Nature*. 2004;431(7011):931–945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
2. Braybrook Ju., Hugget J., Melanson J. E., Campbell J. CCQM roadmap to metrology readiness for infectious disease pandemic response. Available from: https://www.researchgate.net/publication/364029856_CCQM_Roadmap_to_Metrology_Readiness_for_Infectious_Disease_Pandemic_Response [Accessed 08 November 2022].
3. A standard sample of the coronavirus strain has been created in Russia. Konsortsium Kodeks [updated 2021 February 11]. Available from: <https://cntd.ru/news/read/v-rossii-sozdan-standartnyy-obrazec-shtamma-koronavirusa?ysclid=le5nj09s3m572223264> [Accessed 08 November 2022]. (In Russ.).

- McKenney K., Hoskins J., Tian J., Reddy P. DNA molecules as standard reference materials I: Development of DNA identification sequences and human mitochondrial DNA reference sequences. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*. 1997;102(1):53–62. <https://doi.org/10.6028/jres.102.005>
- Levin B. C., Hancock D. K., Holland K. A., Cheng H., Richie K. L. Human Mitochondrial DNA – Amplification and Sequencing – Standard Reference Materials – SRM 2392 and SRM 2392-I. In: NIST Special Publication 260–155. Standard Reference Materials. Washington: U. S. Government printing office; 2003. 93 p. Available from: <https://www.nist.gov/system/files/documents/srm/sp260-155.pdf> (дата обращения: 08.11.2022).
- Yo.-K. Bae, Kim J., Sung J., Yang I. Developing the Korean human genomic DNA reference material for genomic sequencing. In: BIPM. Available from: https://www.bipm.org/documents/20126/53306924/P20-J_YLee_JCTLM_2019_KRISS_Poster_Developing_the_Korean_human_genomic_DNA_reference_material.pdf/f47feb69-fd6a-6a5f-73d2-939716328559 [Accessed 08 November 2022].
- Nordin G., Dybkaer R., Forsum U., Fuentes-Arderiu X., Pontet F. Vocabulary on nominal property, examination, and related concepts for clinical laboratory sciences (IFCC–IUPAC Recommendations 2017). *Pure and Applied Chemistry*. 2018;90(5):913–935. <https://doi.org/10.1515/pac-2011-0613>
- Kulyabina E. V., Morozova V. V., Morozov V. Yu., Kulyabina T. V. On the possibility of creating a metrological traceability chain of the research results of nominal properties of biological substances. *Zakonodatelnaia i Prikladnaia Metrologiia*. 2022;5:39–45. (In Russ.).
- Cheng M. P., Papenburg J., Desjardins M., Kanjilal S., Quach C., Libman M. et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2: a narrative review / *Annals Internal Medicine*. 2020;172(11):726–734. <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
- Shen M., Zhou Y., Ye J., Abdullah Al-Maskri A. A., Kang Y., Zeng S. et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020;10(2):97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.02.010>
- Rousseau F., Gancberg D., Schimmel H., Neumaier M., Bureau A., Mamotte C. et al. Considerations for the development of a reference method for sequencing of haploid DNA—an opinion paper on behalf of the IFCC Committee on Molecular Diagnostics, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2009;47(11):1343–1350. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.319>
- JCTML-EC-07 Annex II. JCTLM WGI. Nucleic acid review team: Criteria to assess the quality of nominated nucleic acid reference materials with stated nominal properties. 2003. Available from: https://www.bipm.org/documents/20126/53185286/JCTLM-EC-07_Annex_II.pdf/fd696763-8247-f607-957f-13f7f778ea5a [Accessed 08 November 2022].

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Морозова Валерия Витальевна – лаборант ФГБУ «ВНИИМС»; студент California State University, Fresno
Россия, 119361, г. Москва, ул. Озерная, 46
USA, 5241 N. Maple Ave.
Fresno, CA 93740.
e-mail: lerapuri@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0003-1251-5872>
Researcher ID: HJY-3009–2023

Кулябина Елена Валериевна – канд. техн. наук, начальник лаборатории ФГБУ «ВНИИМС»
Россия, 119361, г. Москва, ул. Озерная, 46
e-mail: kuliabina@vniims.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6076-4569>
Researcher ID: C-5857–2019

Морозов Виталий Юрьевич – менеджер проектов АО «Волга»
Россия, 606400, Нижегородская область, г. Балахна, ул. Горького, 1
e-mail: vitmor50@gmail.com

Кулябина Татьяна Валериевна – канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИМС»
Россия, 119361, г. Москва, ул. Озерная, 46
e-mail: t.kulyabina@vniims.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3923-5571>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Valeria V. Morozova – Laboratory Assistant, All-Russian Scientific Research Institute of Metrological Service; student at California State University, Fresno
46 Ozernaya str., Moscow, 119361, Russia
USA, 5241 N. Maple Ave. Fresno, CA 93740.
e-mail: lerapuri@gmail.com
<http://orcid.org/0000-0003-1251-5872>
Researcher ID: HJY-3009–2023

Elena V. Kulyabina – Cand. Sci. (Eng.), Head of the Laboratory for Metrological Assurance of Biological and Information Technologies, All-Russian Scientific Research Institute of Metrological Service
46 Ozernaya str., Moscow, 119361, Russia
e-mail: kuliabina@vniims.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6076-4569>
Researcher ID C-5857–2019

Vitaly Yu. Morozov – Project Manager, JSC «Volga»
1 Gorky str., Balakhna, Nizhny Novgorod region, 606400, Russia
e-mail: vitmor50@gmail.com

Tatiana V. Kulyabina – Cand. Sci. (Phys.-Math. Sci.), Leading Researcher, All-Russian Scientific Research Institute of Metrological Service
46 Ozernaya str., Moscow, 119361, Russia
e-mail: t.kulyabina@vniims.ru
<https://orcid.org/0000-0003-3923-5571>