

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора  
ФГБУ «ВНИИОФИ»

Е.А. Гаврилова

«22» 09 2023 г.



«ГСИ. Системы для ПЦР-диагностики в реальном времени Lepgen-96.

Методика поверки»

МП 040.Д4-23

Главный метролог  
ФГБУ «ВНИИОФИ»

С.Н. Негода  
«27» 09 2023 г.

Москва  
2023 г.

## **1 Общие положения**

Настоящая методика поверки распространяется на Системы для ПЦР-диагностики в реальном времени Lepgen-96 (далее – системы), предназначенные для измерений интенсивности флуоресценции при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в биологических образцах и устанавливает порядок, методы и средства проведения первичной и периодических поверок.

По итогам проведения поверки должна обеспечиваться прослеживаемость к Государственному первичному эталону единиц массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе спектральных методов (ГЭТ 196-2023) согласно ГПС «Государственная поверочная схема для средств измерений массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации компонентов, а также флуоресценции в жидких и твердых веществах и материалах на основе спектральных методов», утвержденной Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 1569 от 07 августа 2023 г.

Проверка систем выполняется методом прямых измерений.

Метрологические характеристики систем указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Метрологические характеристики

Наименование характеристики	Значение
Диапазон измерений интенсивности флуоресценции, ОЕФ	от 0,01 до 15,00
Предел допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции, %	17

## **2 Перечень операций поверки средства измерений**

2.1 При проведении первичной и периодической поверок должны быть выполнены операции, указанные в таблице 2.

Таблица 2 – Операции поверки

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер раздела (пункта) методики поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
Внешний осмотр средства измерений	Да	Да	7
Подготовка к поверке и опробование средства измерений	Да	Да	8
Проверка программного обеспечения средства измерений	Да	Да	9
Определение метрологических характеристик средства измерений			10

Наименование операции поверки	Обязательность выполнения операций поверки при		Номер раздела (пункта) методики поверки, в соответствии с которым выполняется операция поверки
	первичной поверке	периодической поверке	
Проверка диапазона измерений интенсивности флуоресценции, определение границы относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции	Да	Да	10.1
Подтверждение соответствия средства измерений метрологическим требованиям	Да	Да	11

2.2 При получении отрицательных результатов при проведении хотя бы одной операции поверка прекращается.

### **3 Требования к условиям проведения поверки**

3.1 При проведении поверки следует соблюдать следующие условия:

- температура воздуха, °С от 15 до 25;
  - относительная влажность воздуха, %, от 30 до 80;
  - атмосферное давление, кПа от 94 до 101,3.

#### **4 Требования к специалистам, осуществляющим поверку**

4.1 К проведению поверки допускаются лица:

- прошедшие обучение на право проведения поверки по требуемому виду измерений и знающие основы метрологического обеспечения средств измерений;
  - изучившие настоящую методику поверки и эксплуатационную документацию на систему.

4.2 Проверку средства измерений осуществляют аккредитованные в области обеспечения единства измерений юридические лица и индивидуальные предприниматели.

## **5 Метрологические и технические требования к средствам поверки**

5.1 При проведении первичной и периодической поверок применяются средства поверки, указанные в таблице 3.

Таблица 3 – Средства поверки

Таблица 3 Средства поверки		
Операция поверки, требующая применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
п.8 Подготовка к поверке и опробование средства измерений	Средства измерений температуры окружающей среды в диапазоне от 15 °C до 25 °C с абсолютной погрешностью ± 0,8 °C; Средства измерений относительной влажности воздуха в диапазоне до от 30 до 80 % с абсолютной погрешностью ± 3 %;	Термогигрометр электронный «CENTER» модели 315, рег. № 22129-09,

Операция поверки, требующая применение средств поверки	Метрологические и технические требования к средствам поверки, необходимые для проведения поверки	Перечень рекомендуемых средств поверки
	Средства измерений атмосферного давления в диапазоне от 94 до 101,3 кПа с абсолютной погрешностью не более: основной $\pm 0,2$ кПа, дополнительной $\pm 0,5$ кПа.	метеорологический «БАММ-1», рег. № 5738-76
п. 10 Определение метрологических характеристик	Рабочий эталон по государственной поверочной схеме для средств измерений массовой (молярной) доли и массовой (молярной) концентрации, а также флуоресценции компонентов в жидких и твердых веществах и материалах на основе спектральных методов, утвержденной Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии № 1569 от 07 августа 2023 г.  Диапазон измерений интенсивности флуоресценции от 0,01 до 15 ОЕФ, доверительные границы относительной погрешности измерений от 3 до 5 %	Комплект мер флуоресценции КМФ-Х <sup>1)</sup> , рег. № 79741-20
	Дозатор механический одноканальный Диапазон объемов дозирования от 10 до 100 мкл; допускаемое относительное отклонение среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального при температуре $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ от $\pm 3,0$ до $\pm 0,8$ %	Дозатор механический одноканальный ВИОНIT рег. № 36152-12
	Пробирки для ПЦР в стрипе по 8 пробирок или в 96-луночном планшете, объемом по 0,2 мл каждая, с прозрачными крышками или покрывной пленкой	Пробирки для ПЦР <sup>2)</sup> , совместимые с системами
	Вспомогательное оборудование Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144-2018	
Примечание – Допускается использовать при поверке другие утвержденные и аттестованные эталоны единиц величин, средства измерений утвержденного типа и поверенные, удовлетворяющие метрологическим требованиям, указанным в таблице		
<sup>1)</sup> далее по тексту – меры		
<sup>2)</sup> предоставляются заявителем		

## 6 Требования (условия) по обеспечению безопасности проведения поверки

6.1 При проведении поверки следует соблюдать требования, установленные ГОСТ 12.1.040-83, правилами по охране труда при эксплуатации электроустановок, указанных в приложении к приказу Министерства труда и социальной защиты РФ от 15.12.2020 № 903н. Воздух рабочей зоны должен соответствовать ГОСТ 12.1.005-88 при температуре помещения, соответствующей условиям испытаний для легких физических работ.

6.2 Помещение, в котором проводится поверка, должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

6.3 При проведении поверки должны быть соблюдены требования безопасности, приведенные в Руководстве по эксплуатации (далее - РЭ) на системы.

## **7 Внешний осмотр средства измерений**

7.1 Проверку внешнего вида системы проводят путем визуального осмотра. Проводят сравнение фотографических изображений, приведенных в описании типа на данную систему и образца, представленного на поверку.

7.2 Провести визуальный осмотр системы на отсутствие видимых повреждений, влияющих на ее работоспособность. Убедиться в наличии маркировки с ясным указанием типа и заводского номера системы.

7.3 Проверить комплектность системы (без запасных частей и расходных материалов) на соответствие требованиям описания типа на данную систему.

7.4 Систему считают прошедшей операцию поверки, если:

- внешний вид системы соответствует фотографическим изображениям из описания типа на данную систему;
- корпус, внешние элементы, элементы управления и индикации не повреждены;
- комплектность соответствует разделу «Комплектность» описания типа на данную систему;
- маркировка системы содержит сведения о производителе, типе и заводском номере прибора.

## **8 Подготовка к поверке и опробование средства измерений**

8.1 Подготовить поверяемую систему к работе согласно ее РЭ.

8.2 Опробование системы включает в себя следующие операции:

- проверка выхода на рабочий режим.

8.2.1 Проверка выхода на рабочий режим систем проводится путём включения систем в соответствии с указаниями, приведёнными в руководстве по эксплуатации. Запустить программное обеспечение системы «LepuPCR» (далее – ПО) двойным нажатием



по ярлыку на рабочем столе персонального компьютера (далее - ПК), ввести логин и пароль пользователя. После запуска ПО на экране персонального компьютера появится рабочее окно ПО (рисунок 1). В нижнем правом углу отображается статус устройства «Подключить 1 устройство».

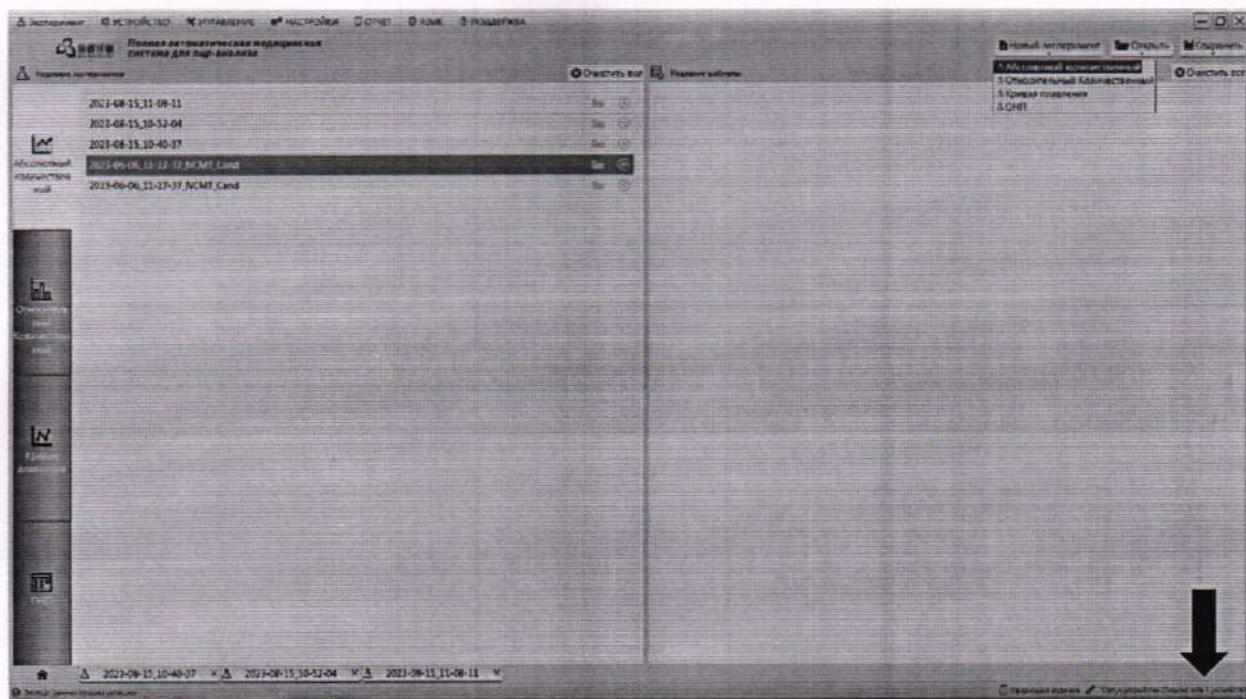


Рисунок 1 – Визуализация стартового окна ПО

8.2.2 В случае, если статус устройства отображается как «Неподключен», необходимо в левой части рабочего окна ПО выбрать вкладку «Абсолютный количественный», во вкладке в правом верхнем углу окна нажать «Новый эксперимент» → «Абсолютный количественный». В открывшемся окне ПО «Проект эксперимента» в разделе «Информация об эксперименте» в разделе «Настройка подключения» в «Подключенных устройствах» в открывающемся списке выбрать систему с необходимым заводским номером. Статус устройства должен измениться на «Подключить 1 устройство».

8.3 Систему считают прошедшей операцию поверки, если:

- система вышла на рабочий режим в полном соответствии с руководством по эксплуатации;
- статус устройства отображается как «Подключить 1 устройство».

## 9 Проверка программного обеспечения средства измерений

9.1 Система имеет ПО, установленное на ПК. Наименование ПО отображается на стартовом ярлыке ПО на рабочем столе ПК. Для проверки версии ПО в верхней панели управления ПО нажать «Поддержка» → «О программном обеспечении ПЦР». В открывшемся окне будет отображена версия ПО систем (рисунок 2).

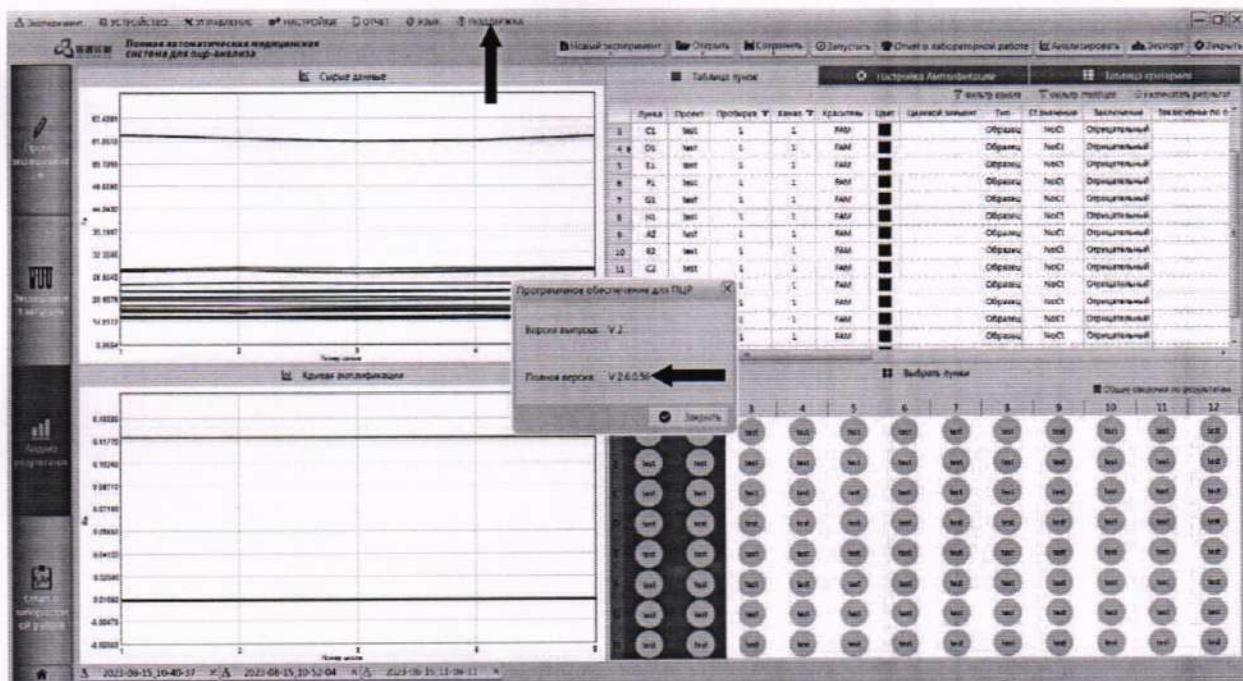


Рисунок 2 – Проверка версии ПО систем

9.2 Систему считают прошедшей операцию поверки, если наименование и версия ПО соответствуют данным, приведенным в таблице 4 настоящей методики поверки.

Таблица 4 – Идентификационные данные программного обеспечения

Идентификационные данные (признаки)	Значение
Идентификационное наименование ПО	LepuPCR
Номер версии (идентификационный номер) ПО, не ниже	V 2.6.0.56
Цифровой идентификатор ПО	-

## 10 Определение метрологических характеристик средства измерений

10.1 Проверка диапазона измерений интенсивности флуоресценции, определение границы относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции

10.1.1 Проверку диапазона измерений интенсивности флуоресценции совмещают с определением относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции.

10.1.2 Создать новый эксперимент в ПО системы в соответствии с Приложением А настоящей методики поверки.

10.1.3 Заполнить восемь лунок одного ряда планшета или пробирок в стрипах для измерений образцов дистиллированной водой, восемь лунок другого ряда – мерами А, восемь лунок третьего ряда – мерами В и восемь лунок четвертого ряда – мерами С. Объем каждой анализируемой пробы дистиллированной воды, мер А, В и С должен составлять 50 мкл.

Мера А представляет собой меру, действительное значение интенсивности флуоресценции которой максимально приближено к началу диапазона измерений системы.

Мера В представляет собой меру, действительное значение интенсивности флуоресценции которой максимально приближено к середине диапазона измерений системы.

Мера С представляет собой меру, действительное значение интенсивности флуоресценции которой максимально приближено к концу диапазона измерений системы.

10.1.4 Произвести пятикратное измерение интенсивности флуоресценции (см. Приложение А) дистиллированной воды, мер A, В и С на длине волны возбуждения 470 нм и длине волны излучения 510 нм.

10.2 Провести обработку результатов измерений в соответствии с п. 11.

## 11 Подтверждение соответствия средства измерений метрологическим требованиям

11.1 Рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции меры В,  $I_{\text{мерыB}_{cp,j}}$ , усл.ед., для каждой пробирки  $j$  стрипа по формуле

$$I_{\text{мерыB}_{cp,j}} = \frac{\sum_{i=1}^n I_{i,j}}{n}, \quad (1)$$

где  $I_{i,j}$  – измеренное значение интенсивности флуоресценции меры, усл.ед.;

$j$  – порядковый номер низкопрофильной пробирки в стрипе, от 1 до 8;

$n$  – число измерений, равное 5.

11.2 На основании результатов измерений рассчитать коэффициент градуировки  $K_{\text{мерыB}_j}$ , ОЕФ/усл.ед., для каждой пробирки  $j$  стрипа по формуле

$$K_{\text{мерыB}_j} = \frac{I_{\text{эт,B}}}{I_{\text{мерыB}_{cp,j}}}, \quad (2)$$

где  $I_{\text{эт,B}}$  – значение интенсивности флуоресценции для меры В (значение из протокола поверки меры), ОЕФ.

11.3 Рассчитать среднее арифметическое значение интенсивности флуоресценции меры А для каждой пробирки стрипа по п. 11.1.

11.4 Рассчитать значение интенсивности флуоресценции для меры А для каждой пробирки стрипа по формуле

$$I_{\text{мерыA}_j} = K_{\text{мерыB}_j} \cdot I_{\text{мерыA}_{cp,j}}, \quad (3)$$

где  $K_{\text{мерыB}_j}$  – коэффициент градуировки, рассчитанный в соответствии с п. 11.2, ОЕФ/усл.ед.

11.5 Рассчитать среднее арифметическое значение восьми значений интенсивности флуоресценции  $\bar{I}_{\text{мерыA}}$ , ОЕФ, по формуле

$$\bar{I}_{\text{мерыA}} = \frac{\sum_{j=1}^8 I_{\text{мерыA}_j}}{8}. \quad (4)$$

11.6 Рассчитать суммарную относительную погрешность измерений интенсивности флуоресценции, %, меры А по формуле

$$\Delta_{\Sigma} = \sqrt{\left( \frac{\bar{I}_{\text{мерыA}} - I_{\text{эт,A}}}{I_{\text{эт,A}}} \right)^2 + \Delta_{\text{Д}}^2} \quad (5)$$

где  $I_{\text{ЭТ},A}$  – значение интенсивности флуоресценции для меры А (значение из протокола поверки меры), ОЕФ;

$\Delta_d$  - значение относительного отклонения среднего арифметического значения фактического объема дозы от номинального дозатора механического одноканального ВИОНГТ, в соответствии с протоколом поверки на данное средство измерений, %

11.7 Повторить п.п. 11.3 – 11.6 для меры С.

11.8 За относительную погрешность измерений интенсивности флуоресценции систем принимают наибольшее из значений, полученных в соответствии с п. 11.6.

11.9 Система считается прошедшей операцию поверки, если диапазон измерений интенсивности флуоресценции составляет от 0,01 до 15,00 ОЕФ, а значение определенной по п. 11.8 относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции (без учета знака) не превышает 17 %.

## 12 Оформление результатов поверки

12.1 Результаты поверки оформляются протоколом поверки. Рекомендуемая форма протокола поверки приведена в приложении Б. Протокол может храниться на электронных носителях.

12.2 Системы считаются прошедшими поверку с положительным результатом и допускаются к применению, если все операции поверки пройдены с положительным результатом, а также соблюдены требования по защите средства измерений от несанкционированного вмешательства. В ином случае системы считаются прошедшими поверку с отрицательным результатом и не допускаются к применению.

12.3 По заявлению владельца средства измерений или лица, представившего его на поверку, с учетом требований методики поверки аккредитованное на поверку лицо, проводившее поверку, в случае положительных результатов поверки (подтверждено соответствие средства измерений метрологическим требованиям) выдает свидетельство о поверке, оформленное в соответствии с требованиями к содержанию свидетельства о поверке, утвержденными приказом Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 31.07.2020 № 2510. Нанесение знака поверки на системы не предусмотрено.

12.4 По заявлению владельца средства измерений или лица, представившего его на поверку, с учетом требований методики поверки аккредитованное на поверку лицо, проводившее поверку, в случае отрицательных результатов поверки (не подтверждено соответствие средства измерений метрологическим требованиям) выдает извещение о непригодности к применению средства измерений.

12.5 Сведения о результатах поверки (как положительных, так и отрицательных) передаются в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений.

Начальник отдела Д-4

  
А.В. Иванов

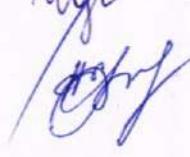
Начальник сектора отдела Д-4

  
Н.Ю. Грязских

Ведущий научный сотрудник отдела Д-4

  
М.М. Чугунова

Ведущий инженер отдела Д-4

  
Е.П. Полунина

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

к Методике поверки № МП 040.Д4-23

«ГСИ. Системы для ПЦР-диагностики в реальном времени Lepgen-96. Методика поверки»

Порядок создания параметров эксперимента и проведения измерений интенсивности флуоресценции с помощью программного обеспечения систем для ПЦР-диагностики в реальном времени Lepgen-96

A.1 Запустить программное обеспечение «LepuPCR» систем двойным нажатием на ярлык  на рабочем столе персонального компьютера (далее - ПК). Ввести логин и пароль пользователя. В верхней строке ПО систем нажать «Управление» в раскрывающемся списке выбрать «Управление проектами» (рисунок А.1).

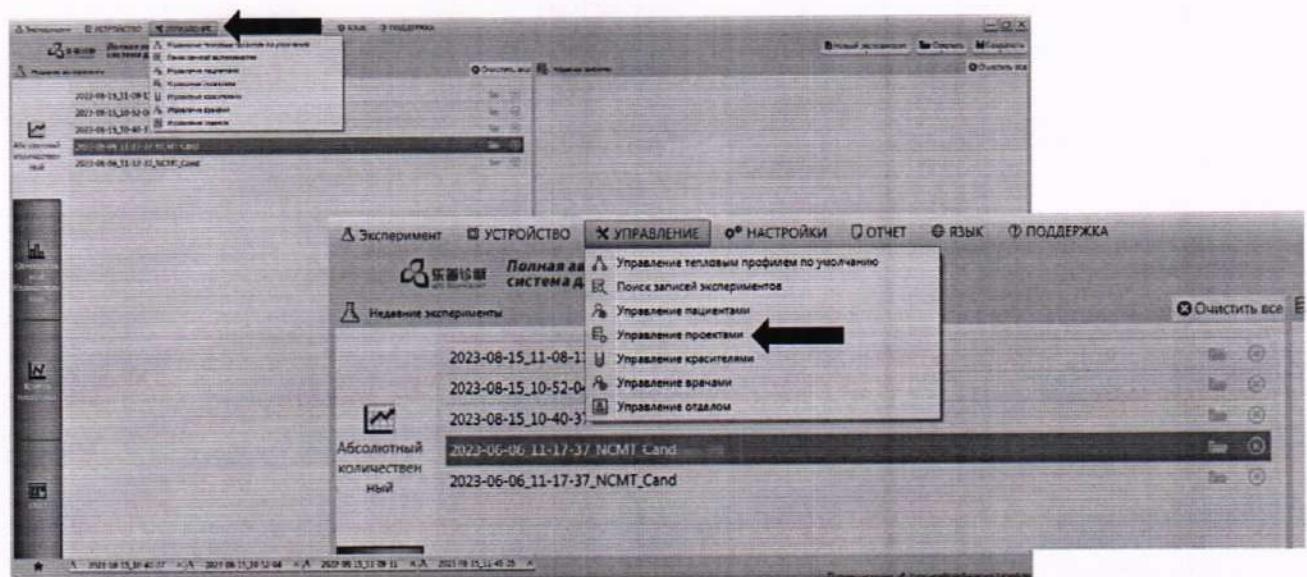


Рисунок А.1 – Визуализация п. А.1

A.2 В открывшемся окне «Управление проектами» нажать на кнопку «Новый». В открывшемся окне «Настройка проекта» в строке «Название проекта» записать название создаваемого проекта эксперимента для проведения измерений интенсивности флуоресценции. В разделе «Информация о каналах» поставить «галочку» напротив канала 1 краситель FAM, что соответствует длине волны возбуждения 470 нм и длине волны излучения 510 нм, нажать на кнопку «OK» (рисунок А.2).

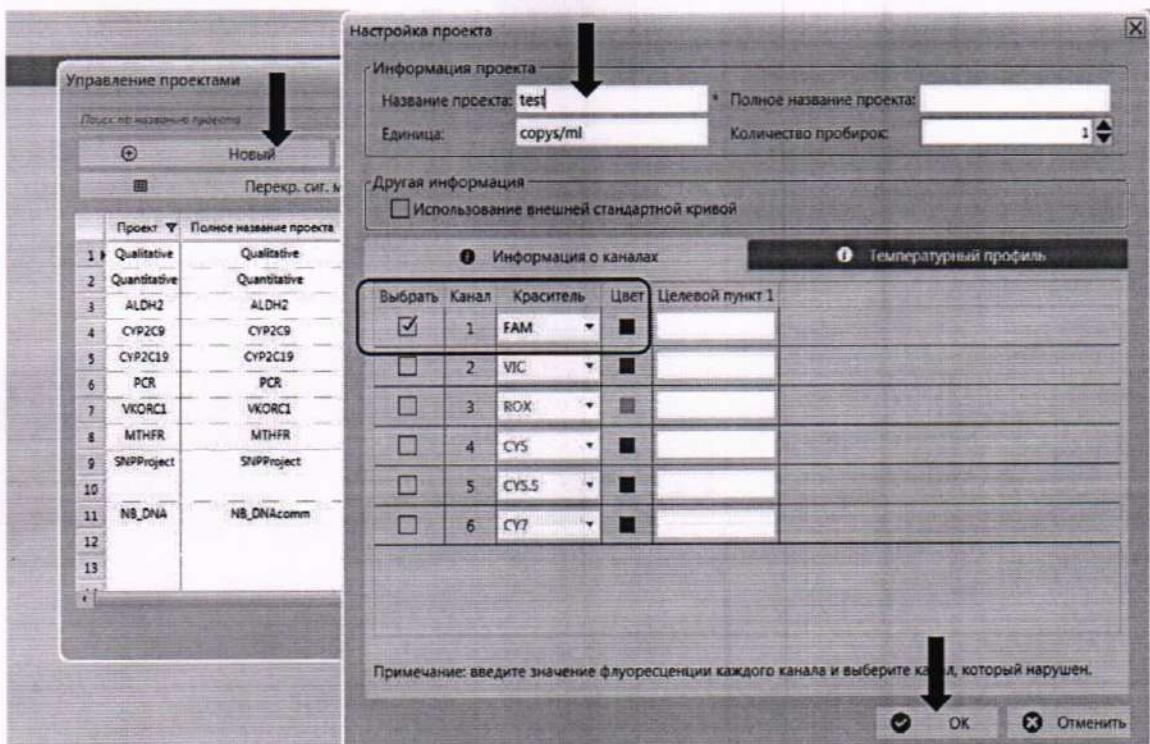


Рисунок А.2 – Визуализация п. А.2

А.3 В правом верхнем углу окна ПО нажать на кнопку «Новый эксперимент», в раскрывающемся списке выбрать «Абсолютный количественный» (рисунок А.3).

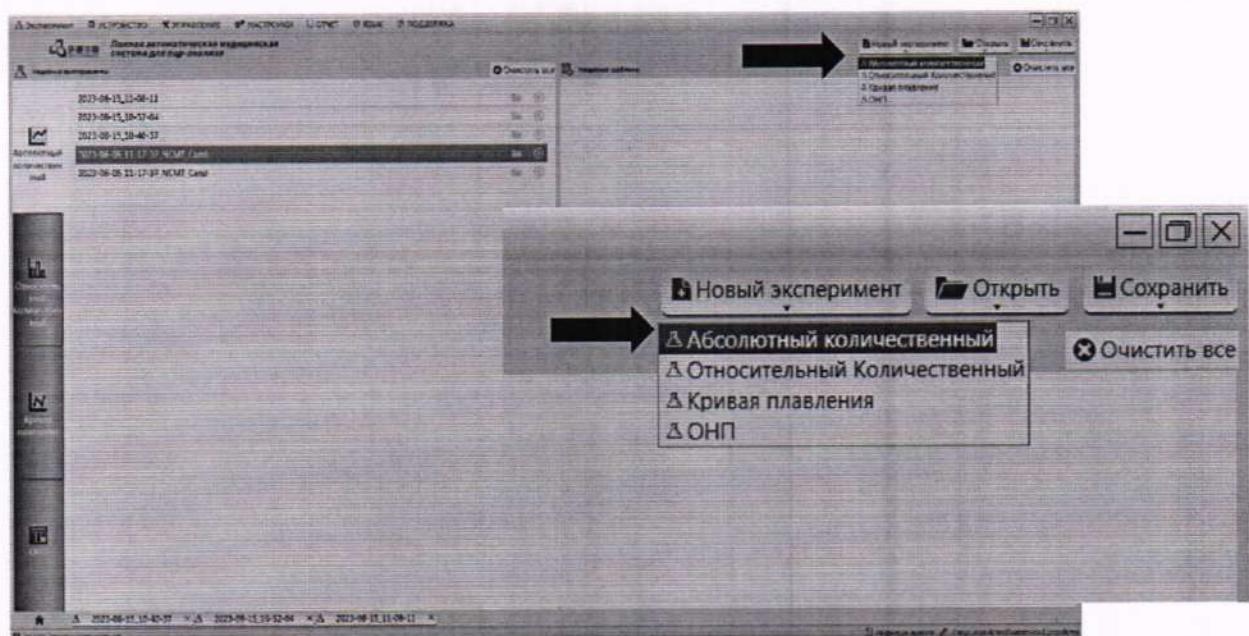


Рисунок А.3 – Визуализация п. А.3

А.4 В открывшемся окне в меню «Проект эксперимента» во вкладке «Информация об эксперименте» при необходимости скорректировать название эксперимента, в разделе «Настройка подключения» проверить подключение системы с необходимым заводским номером. В разделе «Настройка эксперимента»:

- проверить отсутствие «галочки» в графе «Нагрев горячей крышки»;
- «Объем образца» указать 50 мкл;
- «Режим сканирования» установить «Сканирование выбранных каналов»;

- «Режим управления температурой» установить «Модульный режим»;
- «Алгоритм кривой амплификации» установить «Метод ведения журнала (по умолчанию)» (рисунок А.4).

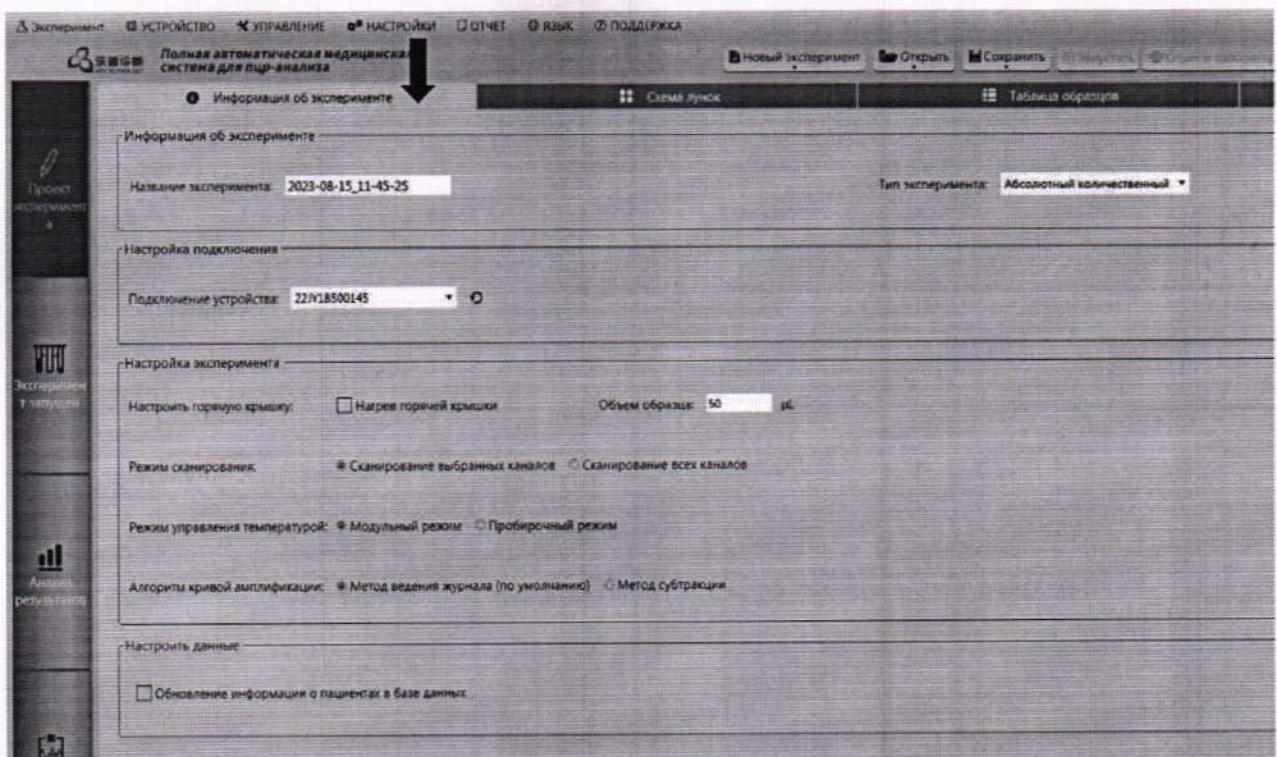


Рисунок А.4 – Визуализация п. А.4

А.5 Перейти во вкладку «Схема лунок». В окне «Информация проекта» поставить «галочку» напротив созданного по п. А.1 – А.2 проекта эксперимента, на схеме лунок выбрать все лунки на схеме нажатием на правый верхний угол окна схемы (рисунок А.5).

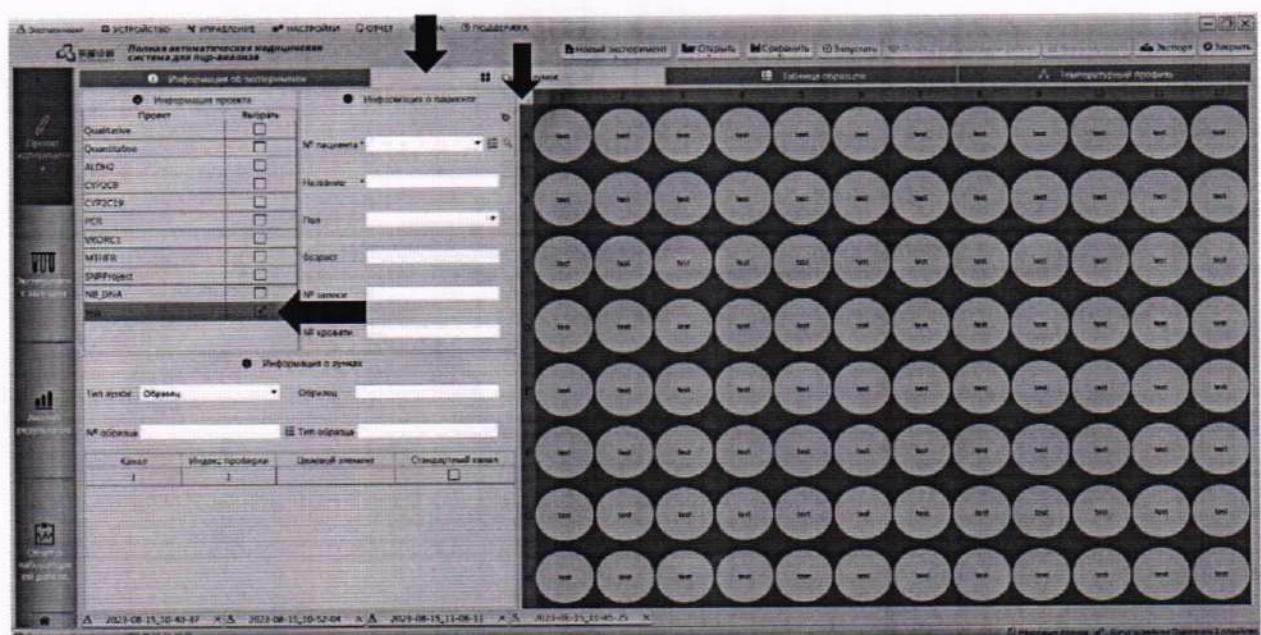


Рисунок А.5 – Визуализация п. А.5

А.6 Перейти во вкладку «Температурный профиль». В рабочем поле ПО будет задан один этап нагрева образцов. Нажать два раза на кнопку «Новый этап (после)» для

добавления еще двух этапов. Для всех трех этапов установить температуру термостатирования 37 °C, время 15 секунд (0:15), количество циклов 5. Оставить «галочку» напротив «Детекция флуоресценции» только для третьего этапа (рисунок А.6).

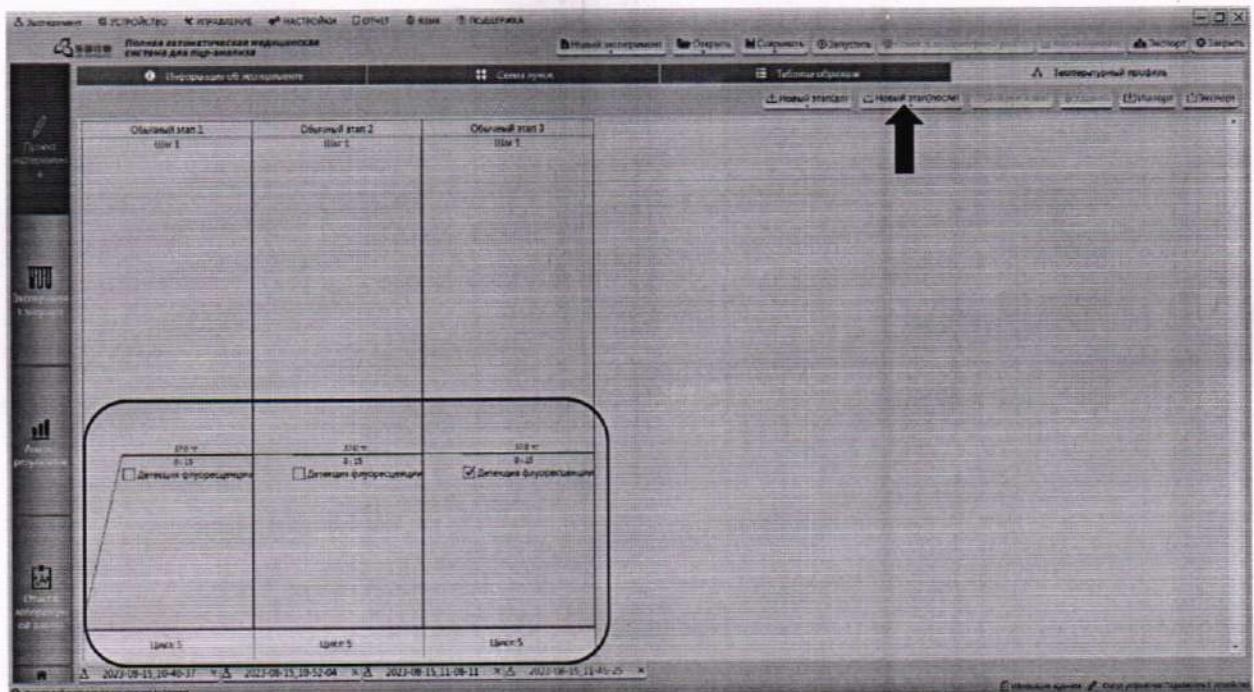


Рисунок А.6 – Визуализация п. А.6

А.7 Перейти в меню «Эксперимент запущен», нажать кнопку «Запустить» (рисунок А.7).

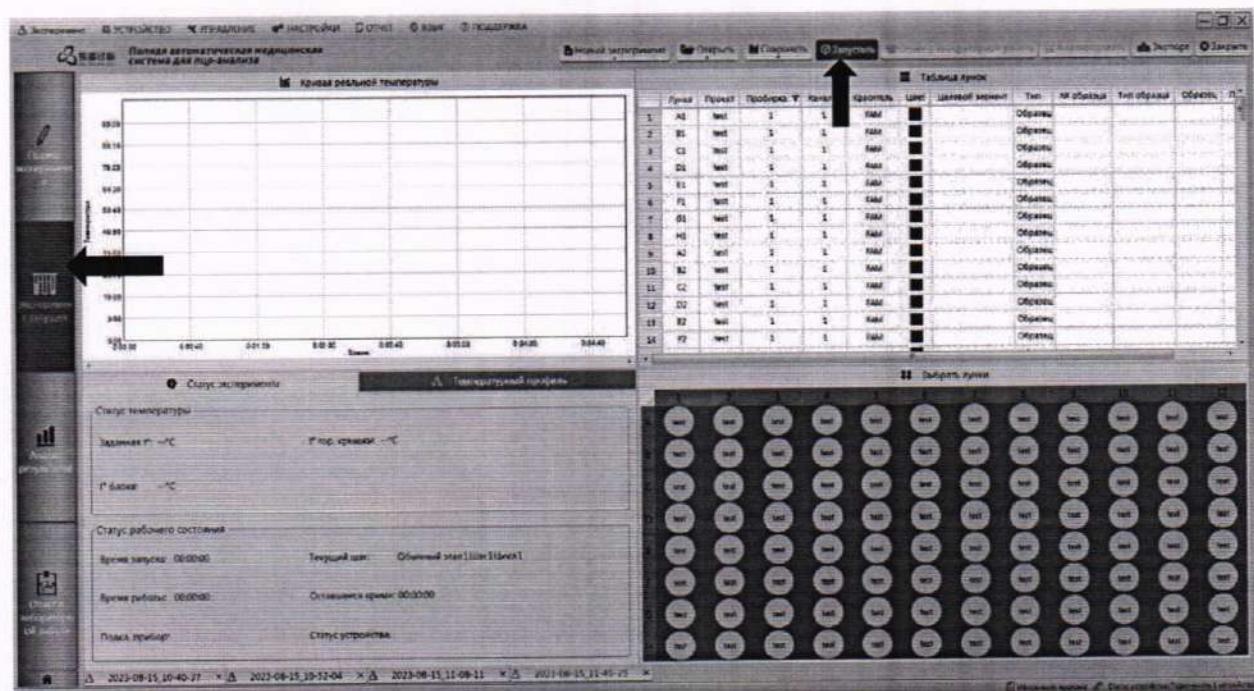


Рисунок А.7 – Визуализация п. А.7

А.8 По окончании проведения измерений интенсивности флуоресценции системой, перейти в меню «Анализ результатов». Для сохранения результатов измерений в окне «Выбрать лунки» выбрать необходимые лунки с результатами измерений для сохранения,

поставить курсор мыши на график в окне «Сырые данные», нажать правую кнопку мыши и выбрать «Экспорт всех данных кривых» (рисунок А.8). В открывшемся окне выбрать место на ПК для сохранения результатов измерений и формат данных (txt или excel).

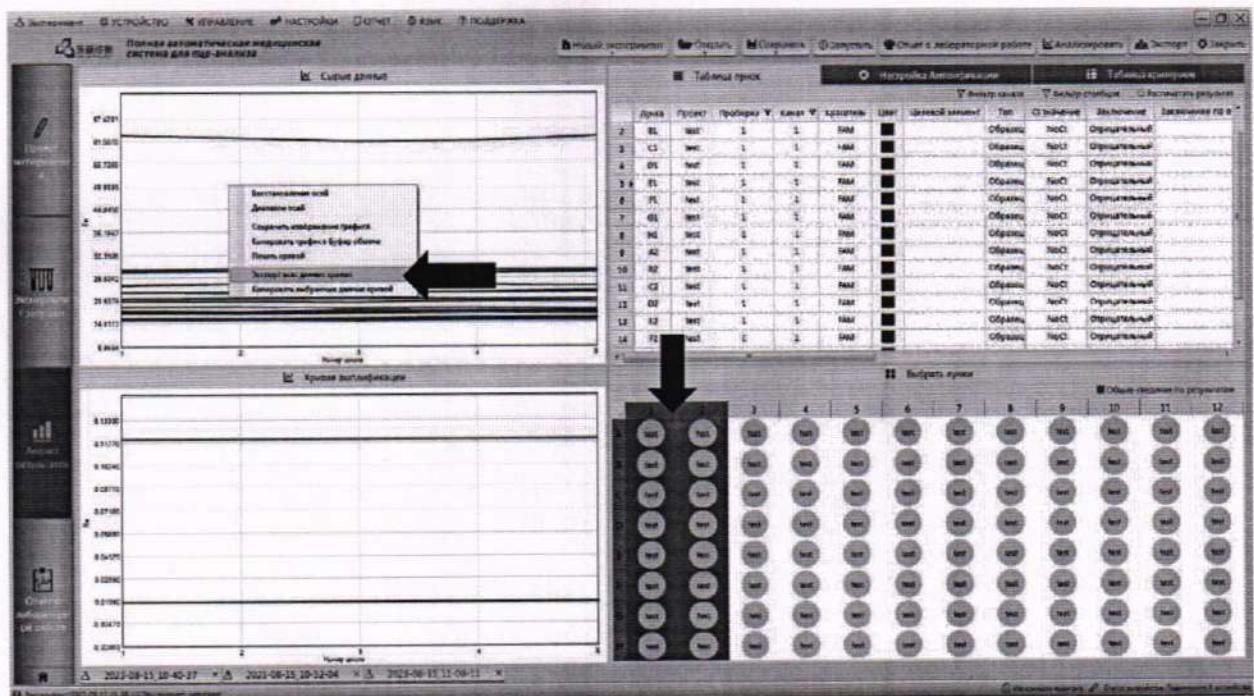


Рисунок А.8 – Визуализация п. А.8

А.9 Открыть сохраненный файл с данными. Пять значений интенсивности флуоресценции, полученные от пятикратного измерения, для меры, расположенной в соответствующей лунке термоблока, представлены в рядах по горизонтали (рисунок А.9).

The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet titled 'Сырые данные\_Блок - Блок1'. The table has columns labeled A through G. Rows 1 and 2 serve as headers. Rows 3 through 9 contain data for holes A1 through H1 respectively. The value '15,5272' in cell D2 is highlighted with a black border.

	A	B	C	D	E	F	G
1		1	2	3	4	5	
2	A1	15,8053	15,8749	15,4576	15,6694	15,5272	
3	B1	18,1242	17,8919	18,3978	18,1529	18,1803	
4	C1	28,0156	28,2645	27,4197	27,8892	28,091	
5	D1	63,1036	62,3386	61,4826	61,6921	62,7844	
6	E1	28,5418	28,9105	28,5674	28,6569	28,5806	
7	F1	22,831	22,6427	22,527	22,8798	23,2379	
8	G1	20,5504	20,4033	20,2362	20,5141	20,3263	
9	H1	15,9008	15,7343	15,9608	15,8481	16,1375	

Рисунок А.9 – Визуализация п. А.9

## **ПРИЛОЖЕНИЕ Б**

(рекомендуемое)

к Методике поверки № МП 040.Д4-23

«ГСИ. Системы для ПЦР-диагностики в реальном времени Lepgen-96. Методика поверки»

### **ПРОТОКОЛ ————— ПЕРВИЧНОЙ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ ————— ПОВЕРКИ**

**Система для ПЦР-диагностики в реальном времени Lepgen-96**

(наименование, тип СИ и модификации в соответствии с описанием типа, в единственном числе)

Заводской номер:

Год выпуска:

Изготовитель:

Владелец СИ:

Применяемые эталоны:

Применяемая методика поверки: МП 040.Д4-23 «ГСИ. Системы для ПЦР-диагностики в реальном времени Lepgen-96. Методика поверки», согласованная ФГБУ «ВНИИОФИ» «\_\_\_\_\_» 2023 г.

Условия поверки:

- температура окружающей среды:
- относительная влажность воздуха:
- атмосферное давление:

Проведение поверки:

1. Внешний осмотр:
2. Опробование:
3. Идентификация программного обеспечения:
4. Определение метрологических характеристик:

Полученные результаты проверки метрологических характеристик:

Таблица Б.1 - Таблица измерений интенсивности флуоресценции меры В, расчёт коэффициента градуировки

№п/п	1	2	3	4	5	6	7	8
Мера В	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	$I_{cp}$							
	$\Delta I$							
	$K$							

Таблица Б.2 – Таблица измерений интенсивности флуоресценции меры А и меры С

№п/п	1	2	3	4	5	6	7	8	
Мера А	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	$I_{cp}$								
	$I_{\text{мерыA}_{cp,j}}$								
	$\bar{I}_{\text{мерыA}}$								
Мера С	$\Delta_{\Sigma}$								
	№п/п	1	2	3	4	5	6	7	8
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	$I_{cp}$								
$\Delta I$									
	$I_{\text{мерыC}_{cp,j}}$								
	$\bar{I}_{\text{мерыA}}$								
	$\Delta_{\Sigma}$								

Таблица Б.3 - Относительная погрешность измерений интенсивности флуоресценции

Метрологическая характеристика	Требования технической документации	Результат (соответствие)
Диапазон измерений интенсивности флуоресценции, ОЕФ	от 0,01 до 15,00	
Предел допускаемой относительной погрешности измерений интенсивности флуоресценции, %, не более	17 %	

##### 5 Заключение по результатам поверки:

Начальник отдела:

Дата поверки:

Поверитель:

Подпись Фамилия И.О.

Подпись Фамилия И.О.