ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 52833— 2007 (ИСО 22174:2005)

Микробиология пищевой продукции и кормов для животных

МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Общие требования и определения

(ISO 22174:2005, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2020

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН АНО «Тест-Пущино» на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 4

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 335 «Методы испытаний агропромышленной продукции на безопасность»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г. № 460-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 22174:2005 «Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения» (ISO 22174:2005 «Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions», IDT).

При этом дополнительные положения и требования, включенные в текст стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей Российской национальной стандартизации, выделены курсивом

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Июнь 2020 г.

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (*gost.e-ecolog.ru

© ISO, 2005 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2008, 2020

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Принцип 4
4.1 Общие положения 4
4.2 Предварительное микробиологическое обогащение 4
4.3 Выделение нуклеиновых кислот 4
4.4 Амплификация ПЦР 4
4.5 Обнаружение и подтверждение ПЦР-продуктов 5
5 Анализируемый материал 5
6 Общие требования к лаборатории 5
6.1 Общие положения 5
6.2 Персонал 5
6.3 Устройство лаборатории 5
6.4 Утилизация отходов 5
7 Реагенты 5
8 Оборудование 6
8.1 Общие положения 6
8.2 Особые замечания 6
9 Процедура 6
9.1 Пробоподготовка 6
9.2 Амплификация 6
9.3 Контроль процедуры испытаний 6
9.4 Подтверждение результатов ПЦР 7
10 Интерпретация результатов 7
11 Протокол испытаний 7
Библиография 8

Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это быстрый, чувствительный и специфичный метод для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевой продукции и кормах для животных. Несмотря на то что эта технология появилась относительно недавно, применение методов на основе ПЦР в испытаниях пищевой продукции расширяется с каждым днем.

В целом существующие методики можно разделить на две большие группы, в зависимости от типа нуклеиновых кислот, используемых в качестве мишени амплификации:

- амплификация ДНК, транскрибированной из РНК (ОТ-ПЦР);
- амплификация ДНК (ПЦР).

Разработаны многочисленные вариации обоих типов методов, которые можно охарактеризовать по степени их сложности и автоматизации. Уровень специфичности методов варьирует от скрининга, позволяющего обнаруживать последовательности нуклеиновых кислот, присущие микробиологическому роду, до специфичных методик, идентифицирующих последовательности нуклеиновых кислот, характерные исключительно для индивидуальных штаммов или серотипов.

Настоящий стандарт устанавливает полный список требований к методам на основе ПЦР, используемым для обнаружения микроорганизмов в пробах пищевой продукции. В настоящем стандарте приводятся термины и определения, относящиеся к ПЦР и ОТ-ПЦР.

Настоящий стандарт — это один из стандартов серии под общим заголовком «Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов»:

- общие требования и определения (ГОСТ Р ИСО 22174);
- требования к пробоподготовке для качественного анализа (*ИСО 20837*) [*1*];
- требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа (*ИСО 20838*) [*2*];
- испытание функционирования амплификаторов (*ИСО 20836*) [*3*].

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Микробиология пищевой продукции и кормов для животных

МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Общие требования и определения

Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of food-borne pathogens. General requirements and definitions

Дата введения — 2009—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования и определения для амплификации последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) *in vitro*. Стандарт может быть применен для испытаний пищевых продуктов, кормов для животных и полученных из них изолятов на наличие патогенных микроорганизмов с использованием полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР).

Минимальные требования, установленные в настоящем стандарте, предназначены для обеспечения сопоставимости и воспроизводимости результатов, полученных в разных лабораториях.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использована нормативная ссылка на следующий стандарт:

ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий[*]

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 Общие определения

3.1.1 **нуклеиновые кислоты:** Макромолекулы, являющиеся носителем генетической информации или выступающие в качестве посредника *при синтезе полипептидной цепи*.

Примечание — Существуют два типа нуклеиновых кислот — ДНК и РНК.

[*] Действует ГОСТ ISO/IEC 17025—2019.

Издание официальное

3.1.2 **дезоксирибонуклеиновая кислота;** ДНК: Полимер дезоксирибонуклеотидов, существующий в двухцепочечной (дцДНК) или одноцепочечной (оцДНК) форме.

3.1.3 **рибонуклеиновая кислота;** РНК: Полимер рибонуклеотидов, существующий в двухцепочечной или одноцепочечной форме.

3.1.4 **матрица (материал) пробы:** Представленные на испытания продукты, которые могут иметь различия в химическом составе и физическом состоянии.

3.1.5 **условия повторяемости:** Условия, при которых независимые результаты измерений получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени.

Примечание — Определение к данному термину установлено в *ИСО 3534-1* [*4*].

3.1.6 **условия воспроизводимости:** Условия, при которых результаты измерений получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования.

Примечание — Определение к данному термину установлено в *ИСО 3534-1* [*4*].

3.1.7 **обнаружение:** Определение наличия целевых *фрагментов* нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов.

3.1.8 **предел обнаружения:** Минимальное количество или концентрация целевого организма в заданном количестве *определенной* матрицы, которое может быть достоверно обнаружено в условиях, заданных в *применяемом* методе.

3.1.9 **идентификация:** Процесс определения принадлежности изолята *патогенного микроорганизма* к одному из заданных таксонов.

3.2 Термины, относящиеся к выделению и очистке ДНК

3.2.1 **выделение ДНК:** Обработка пробы, высвобождающая целевые нуклеиновые кислоты.

3.2.2 **очистка ДНК:** Процесс *обработки выделенной ДНК*, позволяющий повысить ее чистоту.

Примечание — Под чистотой ДНК понимают снижение наблюдаемых и обнаруживаемых эффектов ингибиторов ПЦР в контроле ингибирования ПЦР.

3.2.3 **ДНК ПЦР-качества:** Матрица ДНК, длина и количество которой достаточны для ПЦР.

3.2.4 **РНК ОТ-ПЦР-качества:** Матрица РНК, длина и количество которой достаточны для обратной транскрипции и ПЦР.

3.3 Термины, относящиеся к обратной транскрипции (ОТ) РНК в ДНК

3.3.1 **обратная транскрипция;** ОТ: Синтез ДНК с матрицы РНК с использованием фермента обратной транскриптазы в сочетании с ОТ-праймером в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов.

3.3.2 **обратная транскриптаза:** Фермент, катализирующий обратную транскрипцию РНК в ДНК с использованием ОТ-праймеров.

3.3.3 **рибонуклеаза:** Фермент, разрушающий РНК.

3.3.4 **ингибитор рибонуклеазы:** Вещество, блокирующее рибонуклеазную активность.

3.3.5 **ОТ-праймер:** Праймер, используемый в обратной транскрипции.

3.3.6 **смесь ОТ:** Смесь реагентов, необходимых для обратной транскрипции.

3.3.7 **дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP):** Раствор, содержащий *дезоксиаденозинтрифосфат* (дАТФ), *дезоксицитозинтрифосфат* (дЦТФ), *дезоксигуанидинтрифосфат* (дГТФ), *дезокситимидинтрифосфат* (дТТФ) или *дезоксиуридинтрифосфат* (дУТФ).

3.4 Термины, относящиеся к амплификации ДНК в ПЦР/ОТ-ПЦР

3.4.1 **полимеразная цепная реакция;** ПЦР: Ферментативная реакция, позволяющая амплифицировать ДНК *in vitro.*

3.4.2 **ОТ-ПЦР:** Метод, состоящий из двух реакций: обратной транскрипции (ОТ) РНК в ДНК и последующей ПЦР.

3.4.3 **одностадийная ОТ-ПЦР:** Метод, объединяющий в одной реакции обратную транскрипцию (ОТ) РНК в ДНК и ПЦР.

3.4.4 **двустадийная ОТ-ПЦР:** Метод, состоящий из обратной транскрипции (ОТ) и ПЦР, проводимых в двух отдельных реакциях.

Примечание — Двустадийная ОТ-ПЦР может проводиться последовательно в одной и той же или в двух разных пробирках.

3.4.5 **ПЦР-продукт:** Фрагмент ДНК, амплифицированный в ПЦР.

3.4.6 **обнаружение ПЦР-продукта:** Процесс, показывающий наличие ПЦР-продукта.

3.4.7 **подтверждение ПЦР-продукта:** Процесс, который показывает, что ПЦР-продукт получен из целевой последовательности.

3.4.8 **ПЦР-ELISA:** Метод обнаружения ПЦР-продуктов в жидкой фазе после их иммобилизации на твердой фазе, например, в лунках микропланшета.

Примечание — Присутствие ПЦР-продукта визуализируется с помощью гибридизации и последующего иммуноферментного обнаружения.

3.4.9 **ПЦР с горячим стартом:** Активация термостабильной ДНК-полимеразы с помощью этапа прогрева перед основной программой; позволяет избежать неспецифической амплификации.

3.4.10 **гнездовая ПЦР:** ПЦР, в которой амплифицируется последовательность из продукта первой ПЦР.

3.4.11 **мультиплексная ПЦР:** ПЦР, в которой используется несколько пар праймеров.

3.4.12 **праймер:** Олигонуклеотид с определенной длиной и последовательностью, комплементарный фрагменту аналитически значимой последовательности ДНК.

Примечание — Праймеры ограничивают целевую последовательность ДНК.

3.4.13 **целевая ДНК:** Выбранная для амплификации последовательность ДНК.

3.4.14 **денатурация ДНК:** Процесс, в результате которого двухцепочечная ДНК разделяется на одноцепочечные.

3.4.15 **отжиг:** Гибридизация праймера с комплементарной последовательностью нуклеиновых кислот в заданных условиях.

3.4.16 **элонгация *праймера*:** Ферментативная реакция, приводящая к синтезу новой цепи ДНК путем добавления одиночных дезоксирибонуклеотидов к 3′-концу праймера.

3.4.17 **ДНК-полимераза для ПЦР:** Термостабильный фермент, катализирующий циклический синтез ДНК.

3.4.18 **мастермикс:** Смесь реагентов, необходимых для ПЦР, за исключением целевой ДНК и контролей.

3.4.19 **урацил-N-гликозилаза;** UNG: Фермент, расщепляющий любую последовательность нуклеиновых кислот, содержащую дезоксиуридин (дУ) по месту этого нуклеотида.

3.4.20 **амплификатор:** Автоматический прибор, выполняющий необходимые для ПЦР циклы нагрева и охлаждения с заданными условиями.

3.4.21 **анализ по конечной точке:** Качественный анализ для обнаружения ПЦР-продуктов.

3.4.22 **анализ в реальном времени:** Метод для обнаружения ПЦР-продуктов во время амплификации.

3.5 Термины, относящиеся к контролям

3.5.1 **положительный контроль процесса:** Проба, зараженная культурой целевого патогенного микроорганизма, которая проходит все этапы испытаний, что и анализируемые пробы.

3.5.2 **отрицательный контроль процесса:** Проба пищевого продукта, *заведомо* не содержащая целевой патогенный микроорганизм, которая проходит все этапы испытаний, *что и анализируемые пробы*.

Примечание — Процесс испытаний может включать в себя пробоподготовку, обогащение, выделение ДНК и амплификацию целевой последовательности.

3.5.3 Контроли амплификации

3.5.3.1 **внутренний контроль амплификации:** Заданные масса ДНК или число ее копий, добавляемые в каждую реакцию и выполняющие роль внутреннего контроля амплификации.

3.5.3.2 **внешний контроль амплификации:** Заданные масса контрольной ДНК или число ее копий, добавляемые в аликвоту выделенных из пробы нуклеиновых кислот, которые служат контролем амплификации в отдельной реакции.

3.5.4 **отрицательный контроль выделения (контроль чистоты выделения):** Контроль, прошедший все этапы выделения ДНК, но в отсутствие анализируемой пробы.

3.5.5 **положительный контроль ПЦР:** Реакционная смесь, содержащая определенные массу целевой ДНК или число ее копий.

3.5.6 **отрицательный контроль ПЦР:** Реакционная смесь с не содержащей ДНК водой и без каких-либо ингибиторов ПЦР.

3.6 Термины, относящиеся к ДНК-зондам

3.6.1 **ДНК-зонд:** Меченая молекула нуклеиновой кислоты с определенной последовательностью, используемая для обнаружения целевой ДНК с помощью гибридизации.

3.6.2 **блокирующий реагент:** Соединение, используемое для насыщения остаточных точек неспецифического связывания на твердой фазе до и во время процедуры гибридизации с ДНК-зондом.

3.6.3 **гибридизация:** Специфическое связывание комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот в соответствующих условиях реакции.

3.6.4 **специфичность:** Способность *применяемого метода* распознавать исключительно целевую последовательность и отличать ее от сходных последовательностей и загрязняющих примесей.

4 Принцип

4.1 Общие положения

Определение *патогенных микроорганизмов* состоит из следующих последовательно выполняемых этапов:

а) предварительное микробиологическое обогащение анализируемой пробы (при необходимости; см. 4.2);

б) выделение и очистка нуклеиновых кислот (при необходимости; см. 4.3);

в) амплификация целевой последовательности нуклеиновых кислот в ПЦР с использованием специфичных праймеров (см. 4.4);

г) обнаружение специфичных ПЦР-продуктов (см. 4.5).

4.2 Предварительное микробиологическое обогащение

При необходимости можно нарастить количество клеток анализируемого патогенного микроорганизма путем стимуляции его роста в пробе на селективных или неселективных жидких питательных средах.

4.3 Выделение нуклеиновых кислот

Клетки патогенных микроорганизмов из анализируемой *пробы* или обогащенной культуры лизируются для высвобождения содержащихся в них нуклеиновых кислот. При необходимости проводят дополнительный этап отделения клеток перед лизисом и/или этап очистки после него.

4.4 Амплификация ПЦР

Специфичные последовательности нуклеиновых кислот амплифицируются с использованием *метода* ПЦР. Эта реакция представляет собой циклический процесс, состоящий из трех этапов:

а) денатурация двухцепочечной ДНК (дцДНК);

б) отжиг праймеров на комплементарной целевой последовательности;

в) элонгация гибридизовавшихся праймеров с помощью термостабильной ДНК-полимеразы.

РНК обнаруживают методом ПЦР, если предварительно перевести ее в форму копийной ДНК (кДНК) методом обратной транскрипции.

Примечания

1 После денатурации двухцепочечной ДНК два олигонуклеотидных праймера отжигаются (гибридизуются) на целевой амплифицируемый сегмент последовательности ДНК. Праймеры направлены друг против друга в соответствии с их ориентацией на целевой последовательности.

2 Двухцепочечные участки формируются в результате специфического спаривания оснований между праймерами и целевой последовательностью, ограничивающими амплифицируемый сегмент ДНК и выполняющими роль позиций начала синтеза ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы.

3 Повторяющийся (циклический) процесс тепловой денатурации, отжига праймеров и синтеза ДНК приводит к практически экспоненциальной амплификации ограниченного праймерами сегмента ДНК.

4.5 Обнаружение и подтверждение ПЦР-продуктов

ПЦР-продукты обнаруживают методами электрофореза в *агарозном* геле *или ПЦР в реальном времени*.

Для метода электрофореза в агарозном геле идентичность ПЦР-продукта подтверждают любым *из следующих* методов*: гибридизацией, определением нуклеотидной последовательности или рестрикционным анализом*.

5 Анализируемый материал

В качестве анализируемого материала могут быть использованы любые пищевые продукты или корма для животных, при условии отсутствия эффекта ингибирования ПЦР экстрактом нуклеиновых кислот, полученным из пробы таких продуктов.

6 Общие требования к лаборатории

6.1 Общие положения

Основным требованием к организации работы в лаборатории является обеспечение физического разделения ДНК из анализируемых проб и амплифицированной ДНК, полученной в ПЦР. Случайная контаминация ДНК может возникать от пыли и распределения аэрозолей. Отсюда следует, что организация рабочей зоны в лаборатории и требования системы качества должны основываться:

а) на систематическом выполнении всех методологических этапов, связанных с получением результатов,

б) на принципе «прямого потока» при *проведении испытаний*.

6.2 Персонал

Весь персонал, участвующий в процедуре испытания, должен быть обучен работе методами ПЦР и соответствующими микробиологическими методами.

В *каждой рабочей* зоне следует использовать отдельные комплекты лабораторных халатов. При пробоподготовке и постановке ПЦР необходимо использовать одноразовые перчатки.

6.3 Устройство лаборатории

6.3.1 Общие положения

Для предотвращения контаминации реакционной смеси амплифицированными в прошлых ПЦР целевыми последовательностями организуют раздельные рабочие зоны с собственными комплектами оборудования.

6.3.2 Рабочие зоны (помещения)

Физическое разделение процессов путем использования разных комнат является наиболее эффективным и предпочтительным способом формирования раздельных рабочих зон или помещений.

Требуется как минимум четыре отдельно устроенные специализированные рабочие зоны или рабочих помещения:

а) рабочая зона для *пробоподготовки* и выделения нуклеиновых кислот из анализируемых проб;

б) рабочая зона для приготовления мастермиксов;

в) рабочая зона для внесения раствора нуклеиновых кислот, выделенных из анализируемых проб;

г) рабочая зона для обнаружения и подтверждения ПЦР-продуктов.

В рабочей зоне, соответствующей перечислению в), нельзя открывать пробирки с продуктами реакции амплификации.

Примечание — ПЦР-продукты могут быть уничтожены с помощью 3 %-ного (по массе) раствора гипохлорита.

6.4 Утилизация отходов

Утилизацию отходов и деконтаминацию проводят в установленном порядке.

7 Реагенты

Реагенты должны соответствовать требованиям [*1*] и [*2*].

8 Оборудование

8.1 Общие положения

Используемое в лаборатории оборудование должно правильно обслуживаться в соответствии с инструкциями производителя и требованиями *ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025*. В дополнение к стандартному лабораторному оборудованию в [*1*] и [*2*] описаны дополнительные специализированные приборы.

8.2 Особые замечания

Следует регулярно проводить калибровку оборудования, функционирование которого может повлиять на получение результатов.

9 Процедура

9.1 Пробоподготовка

Лизис клеток, выделение и/или очистку нуклеиновых кислот из анализируемой пробы (если это требуется) следует проводить в соответствии с методом, описанным в [*1*].

9.2 Амплификация

Раствор нуклеиновых кислот добавляют в реакционную смесь и выполняют остальные этапы ПЦР с использованием соответствующих профиля температура — время и количества циклов для системы праймеров и реакционной смеси, используемых в соответствии с методом. Отсутствие ингибирования ПЦР должно быть подтверждено использованием соответствующих контролей *(например, внутреннего положительного контроля)*.

9.3 Контроль процедуры испытаний

Контроли, необходимые для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и кормах методом ПЦР, перечислены в таблице 1.

На каждом этапе следует использовать соответствующие положительные контроли ПЦР (присутствует целевая последовательность) и отрицательные контроли ПЦР (отсутствует целевая последовательность).

Если один из основных контролей не дал ожидаемый результат, то в процедуру испытаний следует включать дополнительные контроли (периодически или в каждую реакцию).

Таблица 1 — Контроли, необходимые для ПЦР-анализа

Наименование этапа	Отрицательный контроль процесса[а]	Положительный контроль процесса[а]	Отрицательный контроль выделения[б]	Внутренний/внешний контроль амплификации[в]	Положительный контроль ПЦР[г]	Отрицательный контроль ПЦР[г]
Пробоподготовка	+	+	–	–	–	–
Выделение нуклеиновых кислот	+	+	+	–	–	–
Амплификация	+	+	+	+	+	+
Обнаружение	+	+	+	+	+	+

[а] Частоту использования этого контроля определяет лабораторная программа обеспечения качества.
[б] Контроль необязателен при использовании отрицательного контроля процесса.
[в] Внутренний или внешний контроль амплификации следует использовать в каждой ПЦР.
[г] Контроль необходим для каждой партии проб в амплификаторе.

Примечание — Знак «+» означает, что на данном этапе используют контроль, знак «—» — не используют.

9.4 Подтверждение результатов ПЦР

Наличие ПЦР-продукта и его специфичность должны быть подтверждены соответствующей подтверждающей реакцией (см. 4.5).

Положительный результат ПЦР может быть также подтвержден микробиологическим методом культивирования.

10 Интерпретация результатов

Интерпретация возможна, если результаты для описанных в 9.3 контролей не противоречат друг другу.

Результаты ПЦР и их интерпретация приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Результаты ПЦР

Анализируемая проба	Положительный контроль процесса	Положительный контроль ПЦР	Отрицательные контроли: процесса, выделения, ПЦР	Внутренний контроль амплификации	Внешний контроль амплификации	Интерпретация результатов
+	+	+	–	+/–	+	Положительный
–	+	+	–	+	+	Отрицательный
–	+	+	+	+/–	+/–	Неоднозначный[а]
–	–	+	–	–	–	Неоднозначный[б]

[а] Возможная контаминация.

[б] Возможное ингибирование.

Примечание — Знак «+» означает, что обнаружен ПЦР-продукт, знак «—» — не обнаружен ПЦР-продукт, знак «+/—» — результат контроля не соответствует ожидаемому.

11 Протокол испытаний

Протокол испытаний должен соответствовать требованиям *ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025* и включать в себя следующую информацию:

а) полную информацию, необходимую для идентификации лабораторной пробы;

б) любую конкретную информацию, относящуюся к лабораторной пробе (например, недостаточное количество, плохое состояние);

в) ссылку на использованный для испытаний стандарт и методы анализа;

г) дату приема пробы на испытания;

д) условия хранения;

е) дату начала/окончания анализа;

ж) информацию об ответственном исполнителе испытаний;

и) размер анализируемой порции;

к) результаты испытаний;

л) любые конкретные замечания, возникшие в ходе анализа,

м) любые отклонения, добавления или исключения к протоколу метода анализа и любая дополнительная информация по конкретным испытаниям.

Библиография

[1]	ИСО 20837:2006	Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Требования к пробоподготовке для качественного анализа
	(ISO 20837:2006)	(Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for sample preparation for qualitative detection)
[2]	ИСО 20838:2006	Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа
	(ISO 20838:2006)	(Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for amplification and detection for qualitative methods)
[3]	ИСО/ТС 20836:2005	Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Испытания функционирования амплификаторов
	(ISO/TS 20836:2005)	(Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Performance testing for thermal cyclers)
[4]	ИСО 3534-1:1993	Статистика. Словарь и условные обозначения. Часть 1. Термины, используемые в теории вероятности, и общие статистические термины
	(ISO 3534-1:1993	(Statistics; vocabulary and symbols; part 1: probability and general statistical terms)

УДК 579.672:637.065:006.354

ОКС 65.120
67.040
67.050

Ключевые слова: микробиология, пищевая продукция, корма для животных, патогенные микроорганизмы, полимеразная цепная реакция, ПЦР

Редактор переиздания *Н.Е. Рагузина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *Е.Д. Дульнева*
Компьютерная верстка *А.Н. Золотаревой*

Сдано в набор 05.06.2020. Подписано в печать 31.08.2020. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,40. Уч.-изд. л. 1.10.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru