МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 22119– 2013

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах

Общие требования и определения

(ISO 22119:2011, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0–92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Государственным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт консервной и овощесушильной промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИКОП Россельхозакадемии)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 335)

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № 44–2013 от 14 ноября 2013 г. № 44–2013)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 22119:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Общие требования и определения).

Перевод с английского языка (en).

Международный стандарт разработан техническим комитетом CEN/TC 275 «Продовольственные анализы – Горизонтальные методы» совместно с подкомитетом ISO TC 34/SC 9 «Микробиология» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной организации по стандартизации (ISO).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, имеется в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии.

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам приведены в дополнительном приложении ДА.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 2132-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 22119–2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2015 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном информационном указателе «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

© Стандартинформ, 2014

В Российской Федерации 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

Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) показала себя как быстрый, чувствительный и специфичный метод для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевой продукции и кормах для животных. Дальнейшее развитие технологии позволяет обнаруживать специфические ПЦР продукты, образующиеся в процессе амплификации. Принцип основан на возбуждении флуоресцентных маркеров в процессе ПЦР.

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах

Общие требования и определения

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

Дата введения – 2015–07–01

1 Область применения

Настоящий стандарт определяет условия для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и полученных из них изолятов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Настоящий стандарт также определяет требования к амплификации и обнаружению последовательности нуклеиновых кислот (ДНК или РНК после обратной транскрипции) при проведении ПЦР в реальном времени.

Минимальные требования, изложенные в настоящем стандарте, являются основой для сопоставления и воспроизведения результатов в отдельных лабораториях и между различными лабораториями.

Настоящий стандарт также применим, например, для обнаружения пищевых патогенных микроорганизмов в пробах окружающей среды и кормов для животных.

Примечание – В связи с быстрым прогрессом в данной области приведенные примеры являются наиболее часто используемыми на момент разработки стандарта.

2 Нормативные ссылки

Следующие ссылочные документы являются обязательными для применения настоящего стандарта. Для устаревших ссылок применяется только цитируемое издание. Для недатированных ссылок применяется самое последнее издание ссылочного документа (включая поправки).

ISO 20838 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 (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных – Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения и количественного учета патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах – Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа)

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 (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных – Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения и количественного учета патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах – Общие требования и определения)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями.

3.1 **Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени:** Ферментативная реакция, сочетающая в себе амплификацию специфичных сегментов ДНК в процессе денатурации, отжиг специфичных праймеров и синтез ДНК с обнаружением специфичных ПЦР продуктов в течение процесса амплификации.

Примечания

1 Как правило, смесь для реакции амплификации содержит одну или несколько проб специфичной ДНК в сочетании с одним или несколькими флуоресцентными красителями. При использовании данной технологии сигнал генерируется после специфичной гибридизации проб с целевой последовательностью нуклеиновых кислот и возбуждения светом определенной длины волны.

2 При проверке положительных результатов в соответствии с ISO 20838 могут использоваться неспецифично связывающиеся с ДНК флуоресцентные красители.

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

3.3 **флуоресцентно-резонансный перенос энергии**: (обнаружение патогенов в продуктах питания с помощью ПЦР) зависящая от расстояния передача энергии от молекулы донора к молекуле акцептора, приводящая к повышению флуоресценции молекулы акцептора при возбуждении электромагнитного излучения определенной длины волны.

Примечание – Источник: [2].

3.4 **репортер**: (обнаружение патогенов в продуктах питания с помощью ПЦР) Флуоресцентные молекулы, использующиеся для обнаружения гибридизации специфических зондов при возбуждении электромагнитного излучения определенной длины волны.

3.5 **гаситель**: (обнаружение патогенов в продуктах питания с помощью ПЦР) флуоресцентные молекулы, выступающие в качестве акцептора энергии и тем самым гасящие/выключающие флуоресцентный сигнал от репортерного гена (донора).

3.6 **темный гаситель**: Молекула, выступающая в качестве акцептора, не излучает энергию в спектральном диапазоне, который может быть обнаружен оптической системой обнаружения прибора ПЦР в реальном времени.

3.7 **5′-3′-экзонуклеазная активность**: Способность фермента, например, полимеразы нуклеиновых кислот, расщеплять гибридизованные молекулы нуклеиновой кислоты в направлении 5′-3′.

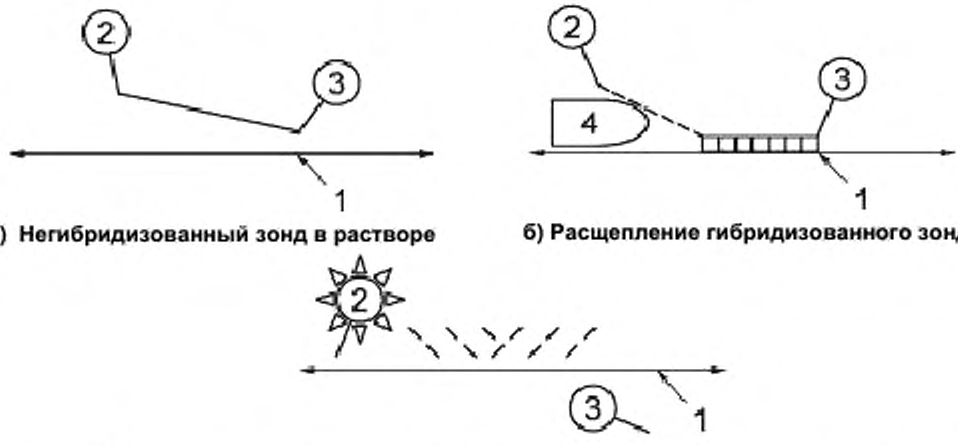
Примечание – Активность 5′-3′-экзонуклеазы направлена на двойную скрученную цепь ДНК. Она зависит от типа фермента и может быть представлена, например, Taq-, Tth и TFL-полимеразами.

3.8 **флуоресцентный зонд**: Олигонуклеотид или аналог олигонуклеотида определенной последовательности в сочетании с одной или несколькими флуоресцентными молекулами.

Примечание – Любая система, излучающая флуоресцирующий сигнал после специфической гибридизации с целевой последовательностью нуклеиновых кислот, может быть использована в качестве флуоресцентного зонда.

3.9 гидролизуемый зонд: Флуоресцентный зонд в сочетании с двумя флуоресцентными молекулами, которые пространственно отделены друг от друга 5′-3′-экзонуклеазной активностью фермента в процессе амплификации.

Примечание – Принцип гидролизуемого зонда изображен на рисунке 1.



а) Негибридизованный зонд в растворе

б) Расщепление гибридизованного зонда

с) Результат расщепления зонда после возбуждения флуоресценции репортера

Обозначение

1 – ДНК субстрат.

2 – Флуоресцентные молекулы (репортер).

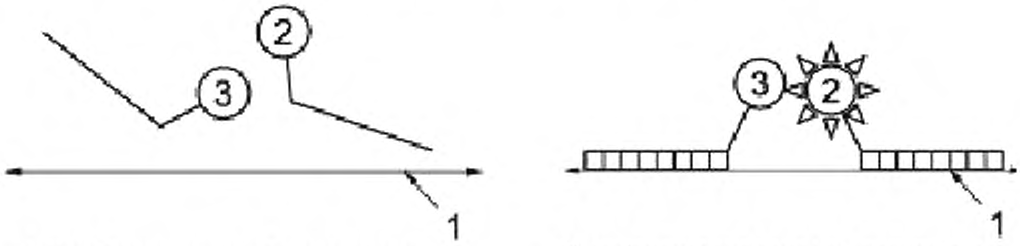
3 – Гасящие молекулы.

4 – Фермент.

Рисунок 1 – Принцип гидролиза зонда

3.10 **зонд гибридизации:** Система из двух флуоресцентных зондов, каждый из которых связан с одной флуоресцентной молекулой, где одна молекула служит донором, другая акцептором.

Примечание – Принцип гибридизации зонда изображен на рисунке 2.



а) Негибридизованный зонд в растворе

б) Гибридизация зондов в результате флуоресценции акцептора

Обозначение

1 – ДНК субстрат.

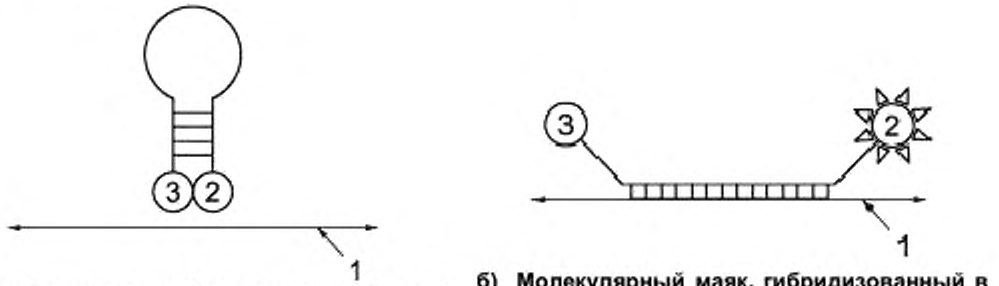
2 – Молекула акцептора.

3 – Молекула донора.

Рисунок 2 – Принцип гибридизации зонда

3.11 **молекулярный маяк:** Флуоресцентный зонд. состоит из трех частей: центральная часть, комплементарная целевой последовательности нуклеиновой кислоты, а также 5′-части и 3′-части, комплементарные друг другу; репортерный ген прикреплен к одному концу молекулы, в то время как другой конец несет гаситель.

Примечание – Принцип молекулярного маяка изображен на рисунке 3.



а) Негибридизованный молекулярный маяк в растворе

б) Молекулярный маяк, гибридизованный в результате флуоресценции

Обозначение

1 – ДНК субстрат.

2 – Флуоресцентные молекулы (репортер).

3 – Гасящая молекула.

Рисунок 3 – Принцип молекулярного маяка

3.12 **зонд для определения специфичной последовательности ДНК патогенна:** Зонд с последовательностью, комплементарной ДНК патогенна, с репортерным геном, излучающим сигнал определенной длины волны, который может быть обнаружен с помощью оптической системы обнаружения.

3.13 **зонд для определения внутреннего контроля последовательности нуклеиновых кислот:** Зонд с репортерным геном, предназначенный для подтверждения эффективности амплификации.

Примечания

1 Зонд испускает сигнал, явно отличающийся от сигнала зонда, предназначенного для обнаружения специфичного возбудителя.

2 Применение системы внутреннего контроля требует использования приборов, способных регистрировать различные длины волн.

3.14 **пассивные ссылки:** Флуоресцентные молекулы, присутствующие в реакционной смеси, использующиеся для нормализации сигнала.

Примечание – Это могут быть двойные молекулы нуклеиновой кислоты или другие молекулы, не принимающие участия в реакции.

3.15 **базовый уровень обнаружения флуоресценции**, **«базовая линия»:** Точка, в которой реакция достигает интенсивности флуоресценции выше фоновой.

3.16 **фоновая флуоресценция, «фон»:** Внутренний уровень флуоресценции, достигающийся в результате использования реагентов и расходных материалов.

3.17 **пороговый цикл пересечения точки:** Точка кривой амплификации, в которой сигнал флуоресценции поднимается выше базового или пересекает предопределенные пороговые значения.

4 Принципы

4.1 Общие положения

ПЦР в режиме реального времени обычно состоит из:

a) амплификации специфической целевой последовательности с помощью ПЦР в присутствии флуоресцентных зондов;

b) связывания флуоресцентных зондов в каждом цикле амплификации;

c) генерации флуоресцентного сигнала при возбуждении во время каждого цикла;

d) контроля флуоресценции сигналов оптической системой обнаружения;

e) анализа данных.

Примечание – Для целей скрининга могут быть использованы флуоресцентные сигналы от красителей, связанных с двойной молекулой ДНК.

4.2 Зонды для ПЦР в режиме реального времени

4.2.1 Гидролизуемые зонды

Зонды гидролиза представляют собой специфические олигонуклеотиды, присутствующие в ПЦР вместе с праймерами для ПЦР. Один конец зонда несет флуоресцентную молекулу репортерного гена со спектром излучения, который гасится второй молекулой, находящейся на другом конце.

Зонд гибридизуется с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты. На этапе элонгации цепи ДНК, 5′-3′-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы расщепляет гибридизованный зонд. После расщепления репортерный ген отделяется от гасителя, в результате чего интенсивность флуоресценции репортера увеличивается. Конечный сигнал флуоресценции пропорционален количеству специфичного ПЦР-продукта.

3′-конец зонда должен быть заблокирован, чтобы предотвратить его распространение в ПЦР.

4.2.2 Зонды гибридизации

Два гибридизационных зонда представлены в ПЦР как специфические олигонуклеотиды, связанные с праймерами ПЦР. Эти зонды, каждый из которых содержит флуоресцентные молекулы, одна из которых выступает в качестве донора, другая в качестве акцептора, гибридизуются с целевой последовательностью нуклеиновых кислот. После гибридизации красители оказываются в непосредственной близости так, что при возбуждении происходит флуоресцентно-резонансный перенос энергии, и молекула акцептора генерирует сигнал, который можно обнаружить, конечный сигнал флуоресценции пропорционален количеству специфичного ПЦР-продукта.

3′-конец зонда должен быть заблокирован, чтобы предотвратить его распространение в ПЦР.

4.2.3 Молекулярные маяки

Молекулярные маяки представляют собой специфические олигонуклеотиды, присутствующие в ПЦР вместе с праймерами для ПЦР.

Когда молекулярные маяки связываются с комплементарной целевой последовательностью при определенной температуре гибридизации, они подвергаются конформационной трансформации, которая приводит к разделению ствола. Это приводит к образованию гибрида зонда и мишени, который является более длинным и стабильным, чем ствол. Это в свою очередь приводит к разделению репортерного гена и гасителя, в результате чего репортер генерирует сигнал [3]. Конечный сигнал флуоресценции пропорционален количеству специфичного ПЦР-продукта.

5 Общие требования к лаборатории

Общелабораторные требования должны быть выполнены в соответствии с ISO 22174.

6 Реактивы и материалы

6.1 Общие положения

В ходе анализа, если не указано иное, используют только реагенты, признанные чистыми для анализа, и стерильную дистиллированную или деминерализованную воду или воду эквивалентной чистоты, свободную от нуклеиновых кислот и нуклеаз, подходящие для молекулярного биологического анализа.

Не допускается использование любых реагентов или расходных материалов, например, компонентов обогащенных бульонов, флуоресценция которых интерферирует с системой обнаружения.

Особые требования применяются к реагентам, указанным в пунктах 6.2–6.6.

6.2 ДНК-полимераза и реакционный буфер

6.2.1 ДНК-полимераза

Термостабильная полимераза (возможно, с активностью обратной транскриптазы), используемая для ПЦР. Она должна быть использована в соответствии с указаниями производителя.

Примечание – Она может быть очищенной, в виде нативного фермента, или очищенной, генетически модифицированной рекомбинантной формой фермента.

Если будут использоваться зонды гидролиза, ДНК-полимераза должна обладать 5′-3′-экзонуклеазной активностью. Для анализа РНК требуется смесь обратной транскриптазы и ферментов ДНК-полимеразы или ДНК-полимераза с активностью обратной транскриптазы.

Каждая ДНК-полимераза может требовать различных экспериментальных условий.

6.2.2 Реакционный буфер

Реакционный буфер должен соответствовать требованиям, изложенным в ISO 20838.

6.3 Дезоксирибонуклеотид трифосфаты (dNTPs) для ПЦР

dNTPs должны соответствовать требованиям, изложенным в ISO 20838.

6.4 Праймеры

Праймеры должны соответствовать требованиям, изложенным в ISO 20838.

6.5 Флуоресцентные зонды для обнаружения в режиме реального времени

Олигонуклеотиды должны быть надлежащего качества и должны быть предназначены для обнаружения последовательности, присущей специфическому ПЦР-продукту. Последовательность зонда должна быть высоко комплиментарна целевой последовательности ДНК.

6.6 Внутренний контроль амплификации

Эффективность амплификации тестового образца может быть проверена с помощью фрагмента ДНК контроля, добавленного в ту же реакционную емкость, что и экстрагированная ДНК из тестового образца. Также возможно использовать те же пары праймеров для амплификации фрагмента контрольной ДНК, как и для амплификации целевой ДНК (гомологичный внутренний контроль амплификации) или другую пару праймеров (гетерологичный внутренний контроль амплификации). Система с целевым геном и система с внутренним контролем амплификации должны в результате показать приблизительно равную эффективность амплификации. Концентрация добавленного фрагмента контрольной ДНК должна быть как можно более низкой, чтобы обнаружить даже небольшое ингибирование и в то же время дать статистически воспроизводимый положительный результат. Далее, должно быть установлено, что внутренний контроль амплификации не влияет на уровень обнаружения целевого гена.

Следующие положения снижают риск негативных влияний на уровень обнаружения:

- эффективность амплификации гомологичного внутреннего контроля амплификации несколько ниже, чем целевой ДНК;
- снижение концентрации праймеров для гетерологичного внутреннего контроля амплификации.

Контроль внутренней амплификации может добавляться в образцы на ранней стадии анализа, и, следовательно, в то же время выступать в качестве контроля процедуры экстракции.

6.7 Реагенты для предотвращения механической контаминации

Реагенты для предотвращения механической контаминации должны соответствовать требованиям, изложенным в ISO 20838.

7 Оборудование

7.1 Общие положения

Оборудование должно соответствовать требованиям, изложенным в ISO 22174.

В лаборатории используют оборудование, содержащееся в надлежащем состоянии и подходящее для методов исследования.

7.2 Специальные приборы и оборудование

В дополнение к обычному лабораторному оборудованию, а также оборудованию, указанному в ISO 22174, используют следующие аппараты.

7.2.1 Термоциклер, оснащенный:

a) источником энергии, подходящим для возбуждения флуоресцентных молекул;

b) оптической системой обнаружения для обнаружения флуоресцентных сигналов, генерируемых в процессе ПЦР.

Применение системы внутреннего контроля требует использования инструментов, способных обнаружить сигналы различных длин волн.

7.2.2 Реакционные емкости и крышки или затворы, которые могут многократно нагреваться до температуры 100 °С и охлаждаться до 4 °С без повреждений и не влияющие на сигнал флуоресценции, генерируемый в процессе амплификации.

8 Лабораторная проба

Экстракты, содержащие нуклеиновые кислоты из любой пробы, соответствующего области применения, могут использоваться в качестве лабораторных проб при условии отсутствия видимого ингибирования ПЦР и помех флуоресценции.

9 Процедура

9.1 Пробоподготовка

Экстракция нуклеиновых кислот и/или очистка тестового образца должны осуществляться в соответствии с методом, изложенным в ISO 20837 [1].

В результате, раствор нуклеиновых кислот должен содержать достаточное количество целевой нуклеиновой кислоты достаточно высокого качества так, чтобы для качественного анализа от одного до 10 целевых микроорганизмов или эквивалентов вирусных геномов были определены в тестовой пробе. Обогащение и/или концентрация целевого микроорганизма или вируса обычно требует для качественного анализа небольшое число целевых организмов в тестовой порции.

В результате раствор нуклеиновых кислот должен содержать вещества, которые не ингибируют ПЦР, не создают помех для флуоресценции.

Примечание – Флуоресценция зачастую происходит из окрашенных реакционных емкостей и некоторых ингредиентов обогащенных бульонов.

Количественный анализ требует процедуры подготовки образцов, гарантирующей, что количество нуклеиновых кислот целевых микроорганизмов или вирусов в конечном растворе нуклеиновых кислот высоко воспроизводимое.

9.2 Амплификация

9.2.1 Общие положения

Амплификация специфических нуклеиновых кислот осуществляется *in vitro* с помощью реакции, катализируемой ДНК-полимеразой в присутствии олигонуклеотидов, праймеров, дезоксинуклеозид трифосфатов и флуоресцентных зондов в определенном буфере реакции.

В дополнение к стандартной ПЦР, при постановке реакционной смеси необходимо избегать использования цветных наконечников и реакционных емкостей. Следует принять меры для предотвращения контаминации частицами пыли вне реакционных сосудов.

Сигнал флуоресцентного зонда контролируется на протяжении всего процесса амплификации.

РНК может быть обнаружена с помощью ПЦР в реальном времени, если последовательность была изначально транскрибирована в комплементарную последовательность ДНК с помощью обратной транскрипции.

9.2.2 Параметры циклеров

9.2.2.1 Зонды гидролиза

В целом, процесс амплификации использует протокол двухступенчатого цикла с денатурацией и комбинированными праймерами и зондами отжига и шагом элонгации. Флуоресцентный сигнал контролируется на протяжении отжига и шага элонгации.

9.2.2.2 Зонды гибридизации

Процесс амплификации использует протокол трехступенчатого цикла с денатурацией, праймерами и зондами отжига и шагом элонгации. Флуоресцентный сигнал контролируется во время отжига.

9.2.2.3 Молекулярные маяки

В целом, процесс амплификации использует протокол трехступенчатого цикла с денатруацией,

праймерами и молекулярными маяками отжига и шагом элонгации. Флуоресцентный сигнал контролируется во время отжига.

9.3 Оценка результатов

Оценка результатов испытания – по ISO 22174.

ПЦР в реальном времени позволяет одновременно определить и разделить сигналы специфических патогенов и внутреннего контроля амплификации. Следовательно, рекомендуется использовать внутренний контроль амплификации.

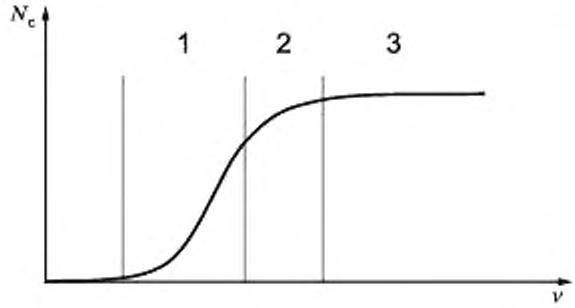
9.4 Анализ данных флуоресценции

9.4.1 Участок амплификации

9.4.1.1 Общие положения

В процессе амплификации количество обнаруживаемых ПЦР-продуктов увеличивается. Увеличение флуоресцентного сигнала связано с увеличением количества ПЦР-продуктов. Это может быть графически изображено на кривой амплификации (см. рисунок 4).

Типичная кривая амплификации состоит из трех этапов, характеризующих процесс ПЦР.



Обозначение

N – число амплифицированных молекул.

v – число циклов амплификации.

1 – экспоненциальная фаза.

2 – линейная фаза.

3 – фаза плато.

Рисунок 4 – Кривая амплификации

9.4.1.2 Фаза 1: Экспоненциальная фаза

Экспоненциальная фаза представляет собой цикл диапазона высокой точности, который характеризуется высокой и постоянной эффективностью амплификации. Во время экспоненциальной фазы отношение ПЦР-продукта может быть описано уравнением (1):

$$N_c = N\,(1 + \eta)^v \qquad (1)$$

где N_c – число амплифицированных молекул;

N – начальное число целевых молекул;

η – эффективность системы;

v – число циклов амплификации.

9.4.1.3 Фаза 2: Линейная фаза

Линейная фаза характеризуется выравниванием эффекта, когда наклон кривой амплификации постоянно уменьшается. В этот момент один или несколько компонентов падают ниже критической концентрации и эффективность амплификации начинает уменьшаться. Фаза называется линейной, так как амплификация приближается к арифметической прогрессии в большей степени, чем к геометрической.

9.4.1.4 Фаза 3: Фаза плато

На плато амплификация ПЦР останавливается, и сигнал остается относительно постоянным [4].

9.4.2 Оценка данных флуоресценции

Положительные образцы генерируют возникновение участка амплификации, по крайней мере, первой фазы типичной кривой амплификации. Кривая амплификации этих образцов пересекает пороговое значение после определенного числа циклов. Образцы с флуоресцентным сигналом выше порогового считаются положительными.

9.4.3 Количественный анализ

9.4.3.1 Общие положения

Количественный анализ определяет флуоресценцию, соответствующую количеству нуклеиновых кислот целевой последовательности, сгенерированную в течение фазы амплификации ПЦР. Это может быть использовано для определения начального количества целевых нуклеиновых кислот в образце-мишени.

Целевые нуклеиновые кислоты количественно учитываются со ссылкой на стандартную кривую.

Другие методы могут быть применены, если была продемонстрирована их точность.

9.4.3.2 Метод стандартной кривой для количественного учета

Любая стабильная и чистая РНК или ДНК с известной концентрацией может быть использована для подготовки стандартной кривой для последовательного разведения. Эффективность амплификации стандартной кривой и целевой нуклеиновой кислоты должны находиться в строгом соответствии. Плазмидная ДНК и транскрибируемая *in vitro* РНК, как правило, используются для подготовки стандартов.

Целевая концентрация должна попадать в диапазон калибровочной кривой.

Должно быть применено соответствующее число точек калибровки и повторов, охватывающих диапазон количественного учета [например, по крайней мере четыре калибровочные точки с двумя повторами (в общей сложность 4 на 2 значения) или шесть калибровочных точек с одним значением в каждой точке (всего 6 точек)].

10 Оценка и документация

Оценка возможна при условии, что результаты, полученные с контрольной группой, указанной в 9.3, однозначны. Возможные результаты ПЦР приведены в ISO 22174, таблица 2.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 20838:2006 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа»	–	*
ISO 22174:2005 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Общие требования и определения»	–	*

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык данного международного стандарта. Перевод данного международного стандарта находится в национальном информационном фонде технических регламентов и стандартов.

Библиография

[1] ISO 20837 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
(Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения и количественного учета патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Требования к подготовке образцов для качественного обнаружения)

[2] T. FORSTER *Intermolecular energy migration and fluorescence. Ann. Phys. 1948, 2, p. 55–75*

[3] S.A. BUSTIN *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR: Trends and problems. J. Mol. Endocrinol. 2002, 29, p. 23–39*

[4] APPLIED BIOSYSTEMS. *ABI Prism® 7900HT*[1] *Sequence Detection System user's manual.* Applied Biosytems, Foster City, CA, 2001.

[1] Пример продукта на коммерческой основе. Эта информация приведена для удобства пользователей данного документа и не является одобрением ISO данного продукта.

УДК 579.672:006.354 МКС 07.100.30 IDT
65.120
67.050

Ключевые слова: продукты пищевые, патогенные микроорганизмы, ПЦР в реальном времени, принцип, методика, внутренний контроль амплификации, реактивы, оборудование, чувствительность, флуоресцентный зонд

Подписано в печать 01.10.2014. Формат 60x84 1/8.

Усл. печ. л. 1,86. Тираж 65 экз. Зак. 3846.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»

123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru