МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 20838— 2014

МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И КОРМОВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Полимеразная цепная реакция для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа

(ISO 20838:2006(E), IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2—2015 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» и Техническим комитетом по стандартизации ТК 60 «Экологически чистая продукция» на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии международного стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Комитетом технического регулирования и метрологии Министерства по инвестициям и развитию Республики Казахстана

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 20 октября 2014 г. № 71-П)

За принятие стандарта проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
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
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 августа 2016 г. № 956-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 20838—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 20838:2006(E) «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа» («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», IDT).

Международный стандарт ISO 20838 подготовлен Техническим комитетом CEN/TC 275 Европейского комитета по стандартизации (CEN) «Пищевой анализ — Горизонтальные методы», в сотрудничестве с Техническим комитетом ISO/TC 34 «Продукты питания», Подкомитетом SC 9 «Микробиология» в соответствии с Соглашением по техническому сотрудничеству между ISO и CEN (Венское соглашение).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт и международных стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Федеральном агентстве по техническому регулированию и метрологии.

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочного международного стандарта соответствующий ему межгосударственный стандарт, сведения о котором приведены в дополнительном приложении ДА

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, 2016

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

Содержание

Введение V
1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Сущность метода 1
5 Реактивы 2
6 Аппараты и оборудование 3
7 Процедура 3
8 Обработка результатов 5
9 Производительность 5
10 Протокол испытания 5
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочного международного стандарта межгосударственному стандарту 6
Библиография 7

Введение

Амплификация и обнаружение целевых последовательностей нуклеиновых кислот выполняется с целью определения целевых последовательностей нуклеиновых кислот, которые присутствуют или не присутствуют в пробе. Это определение относится к соответствующим средствам контроля для обнаружения используемого аналитического метода и испытательной проанализированной пробы.

Настоящий стандарт описывает процедуры, используемые для обнаружения пищевых микроорганизмов, в том числе патогенных микроорганизмов, путем анализа нуклеиновых кислот, выделенных из пищевых продуктов, кормов и проб окружающей среды, или из культур или клеточных суспензий, приготовленных из продуктов питания. Соответствующие процедуры по подготовке проб, культивированию микроорганизмов и добыче нуклеиновых кислот описаны в ISO 20837.

Настоящий стандарт фокусируется на PCR методах, основанных на амплификации. Из-за быстрого уровня технического прогресса в этой области рассматриваются и другие технологии амплификации и методы обнаружения.

Настоящий стандарт связан с серией стандартов и технических характеристик в соответствии с общим названием «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных — Полимеразная цепная реакция (PCR) для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов»:

- Общие требования и определения (ISO 22174)
- Требования к подготовке проб для качественного обнаружения (ISO 20837)
- Функциональное испытание для термоциклеров (ISO/TS 20836)
- Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа (ISO 20838)

Международная организация по стандартизации (ISO) в соответствии с этим документом может использовать один или более патентов касательно технологии PCR.

ISO не занимает позиции относительно доказательств, законности и области применения настоящих патентных прав.

ISO проинформировали, что компании Applied Biosystems (Прикладные биосистемы), Roche Molecular Systems (Молекулярные системы Роше), Inc. и F. Hoffman-La Roche Ltd. (ТОО Хоффман Ла Роше) обладают патентными правами на технологии PCR. Компании уверили ISO, что они готовы вести переговоры о лицензиях на разумных и справедливых условиях с претендентами во всем мире. В связи с этим заявления обладателей таких патентов зарегистрированы в ISO. Информация может быть получена из:

Отдел лицензий
Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Город Фостер, CA 94404,
США
и
Отдел лицензий
Roche Molecular Systems, Inc.
1145 Atlantic Avenue
Аламеда, CA 94501
США

Некоторые элементы настоящего документа могут являться объектом других патентных прав, кроме тех, которые указаны выше. ISO не несет ответственность за идентификацию какого-либо или всех подобных патентных прав.

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 для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Требования к амплификации и обнаружению для качественного анализа

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

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется для патогенов в пищевых продуктах или изолированных от пищевых продуктов и кормов матриц, но может быть применен и к другим матрицам, например, проб окружающей среды, или для обнаружения других микроорганизмов в процессе исследования и устанавливает качественные методы обнаружения пищевых патогенов с помощью полимеразной цепной реакции (PCR).

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к специфической амплификации целевых нуклеотидных последовательностей и обнаружения и подтверждения идентичности амплифицированной нуклеотидной последовательности.

Рекомендации, минимальные требования и технические характеристики, описанные в настоящем стандарте, являются гарантией того, что сопоставимые результаты получены в разных лабораториях.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на межгосударственные стандарты которые являются обязательными. Для датированных ссылок применяют только указанное издание. Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол проверки достоверности альтернативных методов)

ISO 22174:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for thedetection of food-borne pathogens — General requirements and definitions (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (PCR) для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Общие требования и определения).

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ISO 22174.

4 Сущность метода

Целью настоящего метода является качественный анализ, который состоит из скрининга и/или конкретного обнаружения целевых нуклеотидных последовательностей в исследуемых образцах. Специфика может быть в роду, видах или более низком таксономическом уровне.

Издание официальное

Качественный результат должен четко демонстрировать наличие или отсутствие по сравнению с соответствующими методами контроля и в пределах обнаружения используемого аналитического метода и анализа проб.

Анализ состоит из:

a) амплификации PCR специфических целевых последовательностей;

b) детекции продуктов PCR;

c) подтверждения идентичности продукта PCR;

d) подтверждения стандартизированным микробиологическим методом исследования (например, международный стандарт).

5 Реактивы

Используют аналитически чистые реактивы, подходящие для молекулярных биологических исследований. Рекомендуется брать аликвоты реакционных смесей, требуемых для метода PCR и хранить их при соответствующих условиях, например, при минус 20 °C.

5.1 ДНК-полимеразы

Для PCR используют теплоустойчивые полимеразы (включая деятельность обратной транскриптазы). Это могут быть очищенный, природный фермент, или очищенные, генетически спроектированные рекомбинантные формы фермента.

Используют согласно инструкциям производителя.

Каждая ДНК-полимераза может требовать различных экспериментальных условий, например, буфер, температуру.

5.2 Обратная транскриптаза

Фермент используют для транскрипции РНК (рибонуклеиновая кислота) в комплементарной одноцепочной ДНК (кДНК), фермент должен усиливаться последующей PCR.

Фермент используют согласно инструкциям производителя.

5.3 Буфер реакции

Соответствующий буфер используют согласно инструкциям производителя ферментов. Материалы, используемые для подготовки буфера PCR, должны быть устойчивыми относительно условий хранения и переработки.

Используют согласно инструкциям производителя.

5.4 Дезоксирибонуклеозидтрифосфат (dNTp) для PCR

Растворы, содержащие молекулярные биологические классы dATP, dCTP, dGTP, dTTP и/или dUTP должны быть использованы по необходимости. Растворы не должны менять свойств во время хранения и при условиях PCR.

5.5 Праймеры

Праймеры должны быть выбраны на основе последовательности специально для обнаружения ДНК целевого микроорганизма.

5.6 Вода

Вода для амплификации не должна содержать ДНКазы и РНКазы. Подходит очищенная вода.

5.7 Хлорид магния ($MgCl_2$)

Хлорид магния применяется как компонент буфера реакции или как отдельный раствор.

5.8 Реактивы для обнаружения продуктов PCR

Реактивы, используемые для системы обнаружения, описанной в методе PCR, должны иметь соответствующее качество.

5.9 Дополнительные реагенты

5.9.1 Минеральное масло

Распределяется на реакционную смесь для минимизации испарения во время термического цикла.

5.9.2 Фасилитаторы

Вещества, такие как полиэтилен-гликоль или бычий сывороточный альбумин, которые могут быть добавлены к реакции PCR для снижения ингибирования реакции веществами, полученными из матрицы.

5.9.3 Ингибиторы РНКазы (рибонуклеазы)

В PCR в реальном времени ингибиторы используются для предотвращения разложения продукта, которого могут загрязнить реактивы или пластмассовую посуду, используемую в процедуре извлечения.

5.9.4 Реагенты для предотвращения переноса продуктов PCR

Дальнейшая мера против загрязнений — система дезинфекции (например, на основе псоралена, dUTP и UNG) может быть включена в систему PCR, чтобы минимизировать риск переноса загрязнений от продуктов PCR, произведенных во время предыдущих реакций.

6 Аппараты и оборудование

Аппараты и оборудование должны соответствовать ISO 22174.

В дополнение к стандартному лабораторному оборудованию используют следующие аппараты и оборудование.

6.1 Термоциклеры

Термоциклеры должны точно воспроизводить температуру и время цикла, описанные в методе PCR.

6.2 Пипетки с фильтрами

Требуются три набора пипеток, по одной для каждого процесса:

- подготовки проб,
- подготовки мастермикса,
- пост-амплификации.

Примечание — Использование пипеток с фильтрами не обязательно в пост-амплификации.

6.3 Сосуды для реакций

Сосуды для реакций должны быть пригодны для использования в термоциклерах, и быть устойчивы к неоднократным нагреваниям до 100 °С и охлаждаться без повреждения до 4 °С.

6.4 Система обнаружения продуктов PCR

Система обнаружения продуктов PCR, включает:

a) аппарат для агарозы или электрофореза в полиакриламидном геле и, при необходимости, ультрафиолетовый радиационный источник для того, чтобы сделать запись визуализации амплифицированной ДНК, или

b) аппарат для колоночной хроматографии нуклеиновых кислот и соответствующей системы обнаружения, или

c) твердые фазы, загруженные специальными зондами для обнаружения продуктов PCR, или

d) другие подходящие системы.

7 Процедура

7.1 PCR-амплификация

Амплификация определенных нуклеотидных последовательностей может произойти в пробирке во время реакции, катализируемой к ДНК-полимеразой в присутствии олигонуклеотидных праймеров и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в определенных буферах реакции. Важным условием для амплификации целевой последовательности является отсутствие ингибирования ДНК-полимеразы в реакции. Амплификация ДНК-циклический процесс, состоящий:

a) из денатурации двухспиральной ДНК в одноцепочную нуклеиновую кислоту посредством нагревания;

b) отжига олигонуклеотидных праймеров с комплементарной целевой последовательностью на обоих концах одной нити ДНК. при подходящей температуре;

c) удлинения праймеров с дезоксирибонуклеозидтрифосфатами на ДНК-полимеразе при подходящей температуре.

РНК может быть обнаружена использованием PCR, если последовательность была сначала транскрибирована в комплементарную последовательность ДНК обратной транскриптазой.

7.2 Обнаружение и/или подтверждение продуктов PCR

Продукты PCR могут быть обнаружены электрофорезом в геле или соответствующим альтернативным средством. Размер продуктов PCR может быть определен в сравнении с продуктами PCR положительного контроля или с подходящей стандартной длиной ДНК.

Для анализа PCR в реальном времени, обнаружение происходит одновременно с амплификацией.

Для подтверждения идентичности продукта PCR применяются следующие методы, кроме определения размера:

a) секвенированием ДНК продукта PCR;

b) гибридизация продукта PCR со специфическими ДНК-зондами;

c) проведение рестрикционного анализа продуктов PCR; длина фрагментов после рестрикции должна соответствовать ожидаемой длине последовательности ДНК - мишени после рестрикции.

Положительный результат может быть подтвержден при помощи стандартизированного метода микробиологического исследования культур или подтверждающих методов, описанных в соответствующих международных стандартах.

7.3 Методы контроля

Качество, целостность и количество ДНК-матрицы влияют на результаты PCR, и как следствие на аналитические результаты.

Риск получения ложных положительных и/или ложных отрицательных результатов в процессе PCR должен включать соответствующие методы контроля. Частота использования должна быть определена как часть лабораторной программы гарантии качества. Внутренний или внешний контроль амплификации должен использоваться в каждом процессе PCR.

Могут применяться соответствующие справочные материалы и ссылки в культурных справочниках на качественные положительные или качественные отрицательные методы контроля.

7.4 Общие требования для реакций амплификации

Условия реакции и условия термоциклирования должны быть оптимизированы для каждой пары праймеров и/или системы. Когда любой PCR используется впервые на экстракте или суспензии, полученной из особой матрицы, необходимо продемонстрировать, что условия реакции подходят для достижения необходимого предела обнаружения. Предел обнаружения в PCR минимального количества ДНК-мишени должен получить сигнал. При оптимальной реакции требуются менее 40 циклов для амплификации целевых молекул, чтобы произвести продукт, который обнаруживается с помощью стандартных методов.

Специфика реакции должна быть улучшена в максимально возможной степени, например, при помощи PCR с использованием горячего старта. Горячий старт повышает специфику путем уменьшения побочных реакций, таких как амплификация нецелевых последовательностей во второстепенной ДНК (ошибочное праймирование) и олигомеризация праймеров.

7.5 Аспекты конструирования праймеров

При сравнении производительности конкретной PCR с производительностью другой PCR следует учитывать аспекты конструирования праймеров.

Последовательности праймеров должны иметь следующие характеристики:

a) длина каждого праймера должна составлять от 18 до 30 нуклеотидов;

b) соотношение GC:AT должно быть 50:50, если это возможно, или максимально близко к этому отношению;

c) отсутствие концентрации Gs и Cs в коротких сегментах праймеров (высокая внутренняя стабильность);

d) отсутствие комплементарного 3′ конца во избежание формирования димеров праймера;

e) отсутствие внутренней вторичной структуры;

f) отсутствие возможного формирования димеров праймера или проб, используемых в PCR.

Доступен пакет программ в помощь при конструировании праймеров.

7.6 Проверка специфики праймеров

7.6.1 Общие положения

Способность праймеров к обнаружению целевой последовательности должна быть подтверждена.

Используется два шага для подтверждения: первый шаг — теоретическая оценка, и второй — эмпирическая оценка.

7.6.2 Теоретическая оценка

Теоретическая оценка должна выполняться путем осуществления поиска подобия последовательности (например, FastA, Blast) в одной из главных баз данных последовательностей нуклеиновых кислот (например, EMBL, GenBank).

7.6.3 Эмпирическая оценка

Специфика праймеров оценивается эмпирически, чтобы подтвердить способность праймеров отличать целевую последовательность от последовательностей спиралей микроорганизмов близкородственных видов/штаммов и отрицательный контроль. В ISO 16140 указаны пункты необходимые при выборе штаммов.

8 Обработка результатов

Полученные результаты и методы контроля, указанные в ISO 22174, должны быть однозначными и должны приводить к ожидаемым результатам, в противном случае процедуру необходимо повторить.

Результат PCR должен быть:

a) положительный, если конкретный продукт PCR был обнаружен и все методы контроля дают ожидаемые результаты,

или

b) отрицательный, если конкретный продукт PCR не был обнаружен, и все методы контроля дают ожидаемые результаты.

9 Производительность

Термины приведены в ISO 22174.

Метод PCR должен подвергаться межлабораторному или внутрилабораторному испытанию для определения производительности.

Предел обнаружения методов PCR для микроорганизмов, кроме вирусов, должен быть подтвержден соответствующим методом.

10 Протокол испытания

Протокол испытания должен соответствовать ISO 22174.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочного международного стандарта межгосударственному стандарту

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование соответствующего межгосударственного стандарта
ISO 16140:2003	IDT	ГОСТ ISO 16140—2011 «Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов»
Примечание — В настоящей таблице использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандарта: - IDT — идентичный стандарт.		

Библиография

[1] BICKLEY and HOPKINS, Inhibitors and Enhancers of PCR in Analytical Molecular Biology: Quality and Validation, SAUNDERS, G.S. and PARKES, H.C. (eds), RSC publications, UK, 1999 (Бикли и Хопкинс, Ингибиторы и усилители ПЦР в аналитической молекулярной биологии: качество и ратификация)

[2] KNUTSSON, R., BLIXT, Y., GRAGE, H., BORCH, E. and RADSTROM, P. Evaluation of selective enrichment PCR procedures for Yersinia enterocolitica. International Journal of Food Microbiology, 73, 2002, pp. 35—46 (НУТССОН, R., BLIXT, Y., GRAGE, H., BORCH, E. и RADSTROM, P. Оценка отборного обогащения процедуры ПЦР для Yersinia энтероколитные)

[3] ISO/TS 20836, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Performance testing for thermal cyclers (ISO/TS 20836. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Определение рабочих характеристик амплификаторов)

[4] 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 ISO 20837 (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Требования к подготовке образцов для качественного обнаружения)

УДК 579.67:664:636.084:006.35 МКС 07.100.30 IDT

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, амплификация и обнаружение, праймеры

Редактор *Н.Н. Мигунова*
Технический редактор *В.Ю. Фотиева*
Корректор *Р.А. Ментова*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 31.08.2016. Подписано в печать 06.09.2016. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,65. Тираж 35 экз. Зак. 2097.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.

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

gost.e-ecolog.ru