
**Микробиология пищевых продуктов и
кормов для животных. Полимеразная
цепная реакция для обнаружения
патогенных пищевых
микроорганизмов. Требования к
подготовке образцов для
качественного обнаружения**

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 20837:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R (Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочный номер
ISO 20837:2006(R)

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или смотреть на экране, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на интегрированные шрифты и они не будут установлены на компьютере, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe - торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General Info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20837:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2006

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO, которое должно быть получено после запроса о разрешении, направленного по адресу, приведенному ниже, или в комитет-член ISO в стране запрашивающей стороны.

ISO copyright office

Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20

Tel. + 41 22 749 01 11

Fax + 41 22 749 09 47

E-mail copyright @ iso.org

Web www.iso.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
Введение	v
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Принцип	1
4 Общие требования к лаборатории	2
5 Реактивы, аппаратура и оборудование	2
6 Методика	2
Приложение А (информативное) Стандарты по обогащению микроорганизмов (бактерий)	4
Приложение В (информативное) Метод выделения ДНК из грамотрицательных бактерий	5
Библиография	7

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20837:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные организации, правительственные и неправительственные, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, то ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются в соответствии с правилами Директив ISO/IEC, Часть 2.

Основной задачей технических комитетов является разработка международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Для опубликования их в качестве международного стандарта требуется одобрение не менее 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Необходимо учитывать возможность, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственность за определение каких-либо или всех таких патентных прав.

Стандарт ISO 20837 был подготовлен Европейским комитетом по стандартизации (CEN), Техническим комитетом CEN/TC 275, *Анализ пищевых продуктов — Горизонтальные методы*, совместно с Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 9, *Микробиология*, в соответствии с Соглашением о техническом сотрудничестве между ISO и CEN (Венское соглашение).

(standards.iteh.ai)

[ISO 20837:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>

Введение

Обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах методом PCR обычно выполняется путем указанной ниже последовательности этапов (или одновременного их выполнения):

- гомогенизация образца;
- (культуральное) обогащение исследуемого патогенного микроорганизма и обработка образца;
- выделение нуклеиновых кислот (по выбору);
- амплификация нуклеиновых кислот исследуемого патогенного микроорганизма;
- обнаружение амплифицированной ДНК исследуемого патогенного микроорганизма.

Ссылки на международные стандарты, относящиеся к культуральному обогащению бактерий из пищевых матриц, приведены в Приложении А. Пример специального метода подготовки образца описан в Приложении В.

Настоящий международный стандарт относится к серии стандартов и Технических условий под 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 образцов для качественного обнаружения* (ISO 20837)
- *Определение рабочих характеристик амплификаторов* (ISO/TS 20836)
- *Требования к амплификации и обнаружению качественными методами* (ISO 20838).

Международная Организация по стандартизации (ISO) обращает внимание на тот факт, что заявление о соответствии настоящему документу может включать использование одного или более патентов, касающихся технологии PCR.

ISO не занимает какую-либо позицию относительно подтверждения, юридической силы и области применения патентных прав.

ISO проинформирована, что компании Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. и F. Hoffman-La Roche Ltd. имеют патентные права на технологию PCR. Эти компании заверили ISO о своей готовности предоставлять лицензии пользователям технологии во всем мире на разумных и недискриминационных условиях. С учетом этой точки зрения заявления держателей вышеупомянутых патентных прав зарегистрированы в ISO. Информация может быть получена по следующим адресам:

Отдел лицензирования
Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
USA

и

Roche Molecular Systems, Inc.
Отдел лицензирования
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
USA

Следует обратить внимание на возможность того, что некоторые элементы настоящего документа могут быть объектом и других, чем указанные выше, патентных прав. ISO не несет ответственность за идентификацию каких-либо или всех таких патентных прав.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20837:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>

Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Требования к подготовке проб для качественного обнаружения

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ — Использование настоящего стандарта может включать применение опасных материалов, операций и оборудования. Данный стандарт не предназначен для рассмотрения всех проблем безопасности, связанных с его использованием. Пользователь настоящего стандарта несет ответственность за применение безопасных и не угрожающих здоровью методов и определение необходимости регламентных ограничений перед использованием стандарта.

1 Область применения

В настоящем международном стандарте приводятся критерии и примеры подготовки образцов для получения PCR-совместимых образцов или нуклеиновых кислот, качество и количество которых достаточны для использования в PCR.

В стандарте описаны общие принципы процесса подготовки образцов. Ссылки на стандарты, касающиеся обогащения микроорганизмов, приведены в Приложении А, а подробное изложение метода выделения ДНК - в Приложении В.

Настоящий международный стандарт предназначен для пищевых матриц, но в случае необходимости при некоторой адаптации может также применяться к матрицам кормов и матрицам из агрономической/окружающей среды.

2 Нормативные ссылки

Следующие ниже ссылочные документы обязательны при применении данного документа. При жестких ссылках используются только цитированные издания. При плавающих ссылках применяется последнее издание ссылочного документа (включая все изменения).

ISO 22174:2005, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция для обнаружения патогенных пищевых микроорганизмов. Общие требования и определения*

3 Принцип

3.1 Общие положения

Цель описанных методов подготовки образцов состоит в получении образцов или нуклеиновых кислот, качество и количество которых достаточны для использования в PCR.

ПРИМЕЧАНИЕ Качество нуклеиновых кислот зависит, например, от химической чистоты, средней длины молекул и структурной целостности выделенных молекул нуклеиновых кислот.

Обогащение и обработка образцов должны обеспечивать обнаружение малого количества целевых микроорганизмов и уменьшение количества веществ, ингибирующих PCR. Физические, химические или биохимические процедуры, обладающие меньшим разрушающим эффектом на целостность нуклеиновых кислот, должны обеспечивать получение совместимых с PCR-амплификацией образца или раствора нуклеиновых кислот.

3.2 Обогащение и обработка образца

Обработка образцов может начинаться непосредственно с образца или после его обогащения, согласно описанию в перечисленных в Приложении А стандартах или в других относящихся к данному вопросу стандартах.

3.3 Выделение нуклеиновых кислот

Основные принципы выделения нуклеиновых кислот состоят в высвобождении ДНК, присутствующей в бактериях, и одновременном или последующем удалении ингибиторов PCR.

Пример метода выделения/очистки ДНК приводится в Приложении В. Этот метод является только примером, и должен быть в дальнейшем модифицирован пользователями для соответствия задачам, стоящим перед каждой лабораторией.

4 Общие требования к лаборатории

Обработку образцов следует выполнять в отдельных рабочих зонах/помещениях согласно требованиям стандарта ISO 22174:2005, 6.3.

5 Реактивы, аппаратура и оборудование

См. Приложения А и В данного международного стандарта, а также ISO 22174.

6 Методика

6.1 Обогащение и обработка образцов для бактерий

Обогащение образцов пищевых продуктов следует проводить согласно соответствующим международным стандартам или другим подходящим стандартам. Для обогащения можно использовать другие, более совместимые с PCR, среды, если было установлено путем валидации, что они имеют эффективность по крайней мере сравнимую со средами, описанными в международных стандартах.

Некоторые среды культурального обогащения, рекомендуемые международными стандартами, содержат меньшее количество ингибирующих PCR веществ, чем другие, что должно тщательно учитываться при выборе метода подготовки образцов.

Для некоторых продуктов необходимо принять специальные меры по подавлению роста конкурирующих сопутствующих фоновых микроорганизмов (например, путем добавления селективных добавок или антибиотиков).

Могут быть опробованы менее разрушающие методы, например простое разведение, центрифугирование, гидролиз белка, фильтрация, центрифугирование в градиенте плотности, иммуномагнитная сепарация, и т.д. В случае отсутствия ответа в PCR возможно пробное использование более жестких методов, например, кипячения, применения хелатирующих добавок или более жестких химикатов, например, хлороформа и этанола, или наборов реагентов с аналогичными функциями. Для снижения содержания жиров в веществах с высоким содержанием жиров могут быть использованы простые физические методы. Для уменьшения эффектов ингибирования, обусловленного высоким содержанием кальция в молочных продуктах, можно использовать хелатирующие агенты.

6.2 Выделение нуклеиновых кислот

6.2.1 Выделение ДНК

6.2.1.1 Высвобождение и очистка ДНК

Допускается комбинация нескольких принципов выделения ДНК. Например, могут быть выполнены следующие этапы:

- a) разрушение белков в экстракте клеток с помощью протеаз (например, протеиназа К) и РНК с помощью рибонуклеаз;
- b) преципитация образовавшихся пептидов с органическими растворителями (например, со смесью фенола и хлороформа), что позволяет оставить ДНК в водной фазе;
- c) очистка раствора ДНК и дальнейшее концентрирование путем преципитации этанолом в присутствии одновалентных катионов;
- d) сбор преципитата ДНК с помощью центрифугирования;
- e) промывка ДНК этанолом и ресуспендирование в буфере [например, буфер трис (гидроксиметил)аминометан/ЭДТА (Трис-ЭДТА буфер) или Трис буфер].

Для увеличения выхода ДНК на этапах преципитации можно использовать соосадиатели ДНК, например, гликоген, полиэтиленгликоль (ПЭГ) или транспортная РНК (tRNA). Допускается использование только соосадиателей без нуклеазной активности, PCR-ингибирующих/конкурирующих эффектов и без гомологии последовательностей с потенциальными целевыми PCR-последовательностями анализируемых микроорганизмов.

ПРИМЕЧАНИЕ Использование лиофильной сушки для высушивания осадка ДНК, полученного после этапа преципитации, может привести к перекрестной контаминации.

ДНК может быть высвобождена путем температурного разрушения клеток (например, при кипячении в течение 10 мин). После кипячения охлажденный образец центрифугируют и полученный супернатант используют в PCR. Перед кипячением может быть применена ферментативная обработка для улучшения разрушения клеток (например, лизоцим, мутанолизин для грамположительных бактерий), после которой образец инкубируется с протеазами/протеиназами. Для микроорганизмов с исключительно прочной клеточной стенкой (например, *Mycobacterium* spp.) возможно потребуются использование других методов, например, сильной встряски с шариками.

Для выделения нуклеиновых кислот могут быть использованы и другие методы, включая имеющиеся в продаже наборы реагентов, при условии, что получаемые результаты по меньшей мере сравнимы.

6.2.1.2 Качество и количество ДНК

Качество и выход ДНК, выделенной данным методом из данной матрицы, должны быть как повторяемыми, так и воспроизводимыми применительно к амплификации в PCR, при условии достаточного содержания ДНК в матрице. В частности, применяемый метод должен обеспечивать получение фрагментов ДНК, средний размер которых больше или равен размеру исследуемых PCR-продуктов.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК можно оценить флуорометрическими методами или с помощью электрофореза в геле. Количественная оценка очищенной ДНК может быть выполнена спектрофотометрическими методами.

Электрофорез в агарозном геле с окраской бромистым этидием и флуоресценцией в ультрафиолетовом (УФ) свете является быстрым способом оценки качества и количества ДНК (см. Ссылку [1]).

Для некоторых методов подготовки образцов (например кипячение) необходимо использовать раствор нуклеиновых кислот сразу же после приготовления, так как получаемые нуклеиновые кислоты нестабильны.

В целом следует избегать повторных замораживания и размораживания растворов нуклеиновой кислоты.

Используют подходящую пластмассовую посуду для хранения нуклеиновых кислот с низким количеством копий.

ПРИМЕЧАНИЕ Некоторые материалы, используемые для приготовления пробирок, способны связывать нуклеиновые кислоты.

6.3 Контроли

Должны использоваться контроли, соответствующие стандарту ISO 22174:2005, 9.3 и Таблица 1.

Приложение А (информативное)

Стандарты по обогащению микроорганизмов (бактерий)

Перечисленные в Таблице А.1 стандарты содержат информацию по обогащения микроорганизмов (бактерий).

Таблица А.1 — Специальные стандарты по отдельным микроорганизмам (бактериям)

Бактерия	Международный стандарт
<i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579
<i>Staphylococcus aureus</i>	ISO 6888-3
<i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932
<i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937
<i>Campylobacter</i> spp.	ISO 10272-1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ISO 10273
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1
<i>Escherichia coli</i> O157	ISO 16654
<i>Shigella</i> spp.	ISO 21567

[ISO 20837:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>