

---

---

**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*

ISO 20838:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>

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



Ссылочный номер  
ISO 20838:2006(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 20838:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>



**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](http://www.iso.org)

Опубликовано в Швейцарии

**Содержание**

Страница

Предисловие .....	iv
Введение .....	v
1 Область применения .....	1
2 Нормативные ссылки .....	1
3 Термины и определения .....	1
4 Общие принципы .....	2
5 Реактивы .....	2
6 Аппаратура и оборудование .....	3
7 Методика .....	4
8 Интерпретация .....	6
9 Функционирование .....	6
10 Отчет об испытаниях .....	6
Библиография .....	7

iteh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 20838:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>

## 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.

Стандарт ISO 20838 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).

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 20838:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>

## Введение

Аmplификация и обнаружение последовательностей нуклеиновых кислот выполняется в целях определения присутствия или отсутствия определенных последовательностей нуклеиновых кислот в испытательной порции. Это определение относится к применяемым методам контроля в пределах определения применяемого аналитического метода и подвергающейся анализу испытательной порции.

Настоящий международный стандарт описывает методику, применяемую для обнаружения микроорганизмов в пищевых продуктах, кормах для животных и образцах окружающей среды, или в культурах или клеточных суспензиях, приготовленных из пищевых продуктов. Приемлемые методики подготовки образцов, выращивания микроорганизмов в питательной среде и экстракции нуклеиновых кислот описаны в ISO 20837.

Основное внимание в данном международном стандарте уделяется методам амплификации на основе цепных реакций в присутствии полимеразы (PCR). Однако ввиду большой скорости технологических перемен в данной области могут рассматриваться и другие технологии амплификации и методы обнаружения.

Настоящий международный стандарт связан с серией стандартов и Технических условий под общим названием *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Цепная реакция в присутствии полимеразы для обнаружения болезнетворных микроорганизмов, образующихся в пищевых продуктах*:

- *Общие требования и определения* (ISO 22174)
- *Требования к приготовлению проб для качественного обнаружения* (ISO 20837)
- *Функциональные испытания тепловых циклеров* (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 по отношению к наличию, действительности и объему таких патентных прав.

ISO проинформирована, что компании Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. и F. Hoffman-La Roche Ltd. имеют патентные права в области технологии PCR. Эти компании заверили ISO, что они желают провести переговоры о лицензиях на разумных и недискриминационных условиях с партнерами во всем мире. С учетом этой точки зрения заявления собственников 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 20838:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/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

**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 нормативных ограничений перед использованием стандарта.

## 1 Область применения

Настоящий стандарт содержит описание полной схемы качественных методов обнаружения появляющихся в пищевых продуктах микроорганизмов с помощью цепной реакции в присутствии полимеразы (PCR).

В стандарте рассматриваются общие требования по специальной амплификации заданных последовательностей нуклеиновых кислот и обнаружению и подтверждению идентичности амплифицированной последовательности нуклеиновых кислот.

Руководящие указания, минимальные требования и рабочие характеристики, описанные в данном международном стандарте, предназначены для обеспечения гарантии получения в различных лабораториях сравнимых и воспроизводимых результатов.

Данный международный стандарт установлен для случая патогенных микроорганизмов, содержащихся в пищевых продуктах или отделенных от пищевых продуктов или кормов для животных матрицах, но может также применяться и для других матриц, например образцов окружающей среды, или для обнаружения других исследуемых микроорганизмов.

## 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 16140, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Протокол проверки достоверности альтернативных методов*

ISO 22174:2005, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Цепная реакция полимеразы для обнаружения пищевых патогенов. Общие требования и определения*

## 3 Термины и определения

Для целей настоящего документа применяются термины и определения стандарта ISO 22174.

## 4 Общие принципы

Качественный анализ для целей настоящего стандарта состоит из отсеивания и/или специального обнаружения целевых последовательностей нуклеиновых кислот в испытательных пробах. Специфичность может определяться на уровнях рода, вида или на более низком таксономическом уровне.

Качественный результат должен ясно показывать присутствие или отсутствие изучаемой целевой последовательности, с учетом применяемых методов контроля в пределах определения применяемого аналитического метода и подвергающейся анализу испытательной порции.

Анализ обычно включает следующее

- a) амплификацию специальных целевых последовательностей методом PCR,
- b) обнаружение продукта PCR,
- c) подтверждение идентичности продукта PCR, и/или
- d) подтверждение с помощью стандартного микробиологического культурального метода (например международного стандарта).

## 5 Реактивы

Во всех случаях должны применяться аналитически чистые реактивы, пригодные для использования в молекулярной биологии. Обычно рекомендуется брать аликвоты реакционных растворов, требующиеся для метода PCR, и хранить их при подходящих условиях, например при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.1 Полимераза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)

В методе PCR используется термостабильная полимераза (возможно включающая активность обратной транскриптазы). Это может быть очищенный природный фермент, или очищенная полученная генно-инженерным методом рекомбинантная форма фермента.

Ее следует использовать согласно инструкциям изготовителя.

Для каждой полимеразы ДНК могут требоваться свои отдельные экспериментальные условия, например буфер, температура.

### 5.2 Обратная транскриптаза

Этот фермент используется для транскрипции рибонуклеиновой кислоты (РНК) в комплементарную однонитевую дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая может быть амплифицирована затем с помощью реакции PCR.

Данный фермент следует использовать согласно инструкциям изготовителя.

### 5.3 Буфер реакции

Необходимо использовать подходящий буфер согласно инструкциям изготовителя фермента. Готовые к использованию реактивы имеются в продаже. Материалы для приготовления буфера PCR должны быть стабильны при хранении и циклических условиях.

Эти материалы следует использовать согласно инструкциям изготовителя.

### 5.4 Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP), для реакции PCR

По мере необходимости следует использовать растворы, содержащие пригодные для применения в молекулярной биологии марки dATP, dCTP, dGTP, dTTP и/или dUTP. Они должны быть стабильны при хранении и в условиях реакции PCR. Эти препараты имеются в продаже.



## 5.5 Праймеры

Праймеры необходимо выбирать исходя из последовательности, специфической для обнаружения ДНК целевых микроорганизмов.

## 5.6 Вода

При реакции амплификации всегда должна использоваться вода, не содержащая дезоксирибонуклеазу (ДНКазу) и рибонуклеазу (РНКазу). Пригодная для этих целей вода сверхвысокой очистки имеется в продаже.

## 5.7 Хлорид магния ( $MgCl_2$ )

Он поставляется либо в виде компоненты реакционного буфера, либо в виде отдельного раствора.

## 5.8 Химикалии для обнаружения продуктов реакции PCR

Химикалии, применяемые в описанных системах обнаружения метода PCR, должны иметь приемлемое качество.

## 5.9 Необязательные дополнительные реактивы

### 5.9.1 Минеральное масло

Минеральное масло добавляется в реакционную смесь для минимизации испарения в течение выполнения тепловых циклов.

### 5.9.2 Смягчители

Смягчители - это некоторые вещества, например полиэтиленгликоль или коровий сывороточный альбумин, которые могут быть добавлены при реакции PCR для снижения ингибирующего воздействия производных веществ матрицы [1].

### 5.9.3 Ингибиторы рибонуклеазы

Эти вещества добавляются в при полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) для предотвращения разложения целевой РНК энзимами рибонуклеазы, которые могут присутствовать в виде загрязнений в реактивах или на пластмассовой посуде, используемой в процедуре экстракции. Ингибиторы рибонуклеазы имеются в продаже.

### 5.9.4 Реактивы для предотвращения переноса продуктов реакции PCR

В качестве дополнительной меры против загрязнения в систему PCR может быть включена система очистки (основанная, например, на псоралене, dUTP и UNG), позволяющая свести к минимуму риск переноса загрязнения из продуктов реакции PCR, образующихся на предыдущих этапах реакции PCR.

## 6 Аппаратура и оборудование

Аппаратура и оборудование должны соответствовать требованиям ISO 22174.

Дополнительно к стандартному лабораторному оборудованию необходимо использовать следующую аппаратуру и оборудование.

**6.1 Аппарат тепловой циклер**, позволяющий воспроизводить и точно выполнять температурные и временные циклы, описанные в методе PCR.

**6.2 Пипетки**, с фильтрующими насадками.

Требуется не менее трех наборов пипеток, каждый из которых предназначен для следующего.

— подготовки образцов,

- подготовки эталонной смеси,
- этапов после амплификации.

ПРИМЕЧАНИЕ Применение фильтрующих насадок необязательно на этапах после амплификации.

**6.3 Реакционные сосуды**, пригодные для использования в тепловых циклерах, и которые можно повторно нагревать до 100 °С и охлаждать до 4 °С без повреждения.

**6.4 Система для обнаружения продуктов PCR**, включающая следующее

- a) аппарат для электрофореза на агарозном или полиакриламидном геле и, если необходимо, источник ультрафиолетового излучения для визуализации при регистрации амплифицированной ДНК, или
- b) аппарат для колоночной хроматографии нуклеиновой кислоты и соответствующая система обнаружения, или
- c) загруженные твердые фазы со специальными зондами и аппаратами для обнаружения продуктов реакции PCR, или
- d) другие равноценно приемлемые системы.

## 7 Методика

### 7.1 Амплификация методом PCR

Амплификация специальных последовательностей нуклеиновых кислот может происходить *in vitro* с помощью реакции, катализируемой полимеразой ДНК в присутствии олигонуклеотидных праймеров и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в установленном буфере реакции. Важной предпосылкой амплификации целевой последовательности является отсутствие ингибирования полимеразы ДНК в процессе реакции. Амплификация ДНК является циклическим процессом, состоящим из следующего

- a) денатурация двунитевой ДНК в однонитевую нуклеиновую кислоту путем нагревания,
- b) ренатурация олигонуклеотидных праймеров в комплементарную целевую последовательность на обеих отдельных нитях ДНК при подходящей температуре, и
- c) достройка праймеров с помощью дезоксирибонуклеозидтрифосфатов полимеразой ДНК при подходящей температуре.

РНК может быть обнаружена с помощью реакции PCR если последовательность была сначала преобразована в комплементарную последовательность ДНК с помощью обратной транскриптазы.

### 7.2 Обнаружение и/или подтверждение продуктов PCR

Продукты реакции PCR могут быть обнаружены с помощью метода гель-электрофореза или подходящего альтернативного метода. Размер продуктов PCR может быть оценен путем сравнения с продуктами PCR позитивного контроля и подходящим эталоном длины ДНК.

При анализе методом PCR в реальном времени, обнаружение происходит одновременно с амплификацией.

Должно быть выполнено подтверждение идентичности продуктов реакции PCR с помощью другого подходящего метода, помимо определения размера, например следующего:

- a) путем определения последовательности ДНК в продуктах PCR;
- b) путем гибридизации продуктов PCR со специальными пробами ДНК;
- c) с помощью анализа рестрикций продуктов реакции PCR; длина фрагментов после рестрикции должна соответствовать ожидаемой длине целевой последовательности ДНК после рестрикции.