
Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения и количественного определения пищевых патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения

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

ISO 22119:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

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



Ссылочный номер
ISO 22119:2011(R)

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 22119:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO 2011

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

Предисловие.....	iv
Введение	v
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	1
4 Принцип	5
4.1 Общие положения	5
4.2 Зонды для ПЦР в реальном времени.....	6
5 Общие требования к лабораториям	6
6 Реактивы и материалы.....	6
7 Аппаратура.....	8
8 Лабораторная проба	8
9 Проведение анализа	8
9.1 Подготовка пробы	8
9.2 Амплификация	9
9.3 Контроли	9
9.4 Анализ данных флуоресценции.....	10
10 Оценивание и документация.....	11
Библиография.....	12

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 правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC) по всем вопросам стандартизации в области электротехники.

Международные стандарты разрабатываются в соответствии с правилами, установленными в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Основная задача технических комитетов состоит в подготовке международных стандартов. Проекты международных стандартов, одобренные техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы данной части ISO 16065 могут быть объектом патентных прав. Организация ISO не должна нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

ISO 22119 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 по техническому сотрудничеству между ISO и CEN (Венское Соглашение).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

Введение

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) показал себя, как быстрый, чувствительный и специфичный к обнаружению пищевых патогенных микроорганизмов. Дальнейшие разработки технологии позволят обнаруживать специфические ПЦР-продукты, созданные в процессе амплификации. Принцип опирается на возбуждение флуоресцентных маркеров во время ПЦР-процесса.

Настоящий международный стандарт является частью серии документов под общим названием *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов*:

ISO/TS 20836, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Определение характеристик термоциклеров*

ISO 20837, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Требования к подготовке образцов для качественного обнаружения*

ISO 20838, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Требования к амплификации и обнаружению для методов качественного анализа*

ISO 22118, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Показатели результативности*

ISO 22119, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения*

ISO 22174, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения*

Следующие Технические условия находятся в стадии разработки:

ISO/TS 13136, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения бактерий Escherichia coli, выделяющих токсин Шига (STEC), принадлежащих к серотипам O157, O111, O26, O103 и O145. Качественный метод на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР)*

Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения и количественного определения пищевых патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения

1 Область применения

Настоящий международный стандарт определяет термины для обнаружения пищевых патогенных микроорганизмов и полученных из пищевых продуктов изолятов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Настоящий международный стандарт также устанавливает требования к амплификации и обнаружению последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК или РНК после обратной транскрипции) методом ПЦР в реальном времени.

Минимальные требования, заложенные в данном международном стандарте, обеспечивают основу для получения сопоставимых и воспроизводимых результатов в одной лаборатории и в разных лабораториях.

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

ПРИМЕЧАНИЕ Ввиду стремительного развития в данной области приведенные примеры являются наиболее часто используемыми на момент разработки данного стандарта.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

2 Нормативные ссылки

Нижеследующие документы являются обязательными для применения данного документа. Для датированных ссылок действительно только указанное издание. В случае недатированных ссылок используется последняя редакция документа, на который дается ссылка (включая все изменения).

ISO 20838, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Требования к амплификации и обнаружению в методах качественного анализа*

ISO 22174:2005, *Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения*

3 Термины и определения

Применительно к данному документу используются следующие термины и определения.

3.1

полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПЦР в реальном времени

real-time polymerase chain reaction

real-time PCR

ферментативная методика, объединяющая амплификацию *in vitro* специфических фрагментов ДНК в процессе денатурации, отжига специфических праймеров и синтеза ДНК с обнаружением специфических ПЦР-продуктов в процессе амплификации

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Обычно реакционная смесь амплификации содержит один или несколько специфических ДНК-зондов наряду с одним или несколькими флуоресцентными красителями. По этой технологии генерируется сигнал после специфической гибридизации зондов в целевую последовательность нуклеиновых кислот и возбуждения с помощью света определенной длины волны.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Использование неспецифических привязанных к ДНК флуоресцентных красителей можно применять в том случае, если положительные результаты проверяются в соответствии с ISO 20838.

3.2
ПЦР-продукт
PCR product

Фрагмент ДНК, амплифицированный в ПЦР

[ISO 22174:2005, 3.4.5]

3.3
резонансный перенос энергии флуоресценции (по Фёрстеру)
fluorescence resonance energy transfer
FRET

⟨обнаружение пищевых патогенных микроорганизмов методом ПЦР⟩ зависимый от расстояния перенос энергии от молекулы-донора к молекуле-акцептору, в результате которого происходит флуоресценция молекулы-акцептора после возбуждения электромагнитным излучением определенной длины волны

ПРИМЕЧАНИЕ Взято из Ссылки [2].

3.4
репортёр
reporter

⟨обнаружение пищевых патогенных микроорганизмов методом ПЦР⟩ флуоресцентная молекула (флуорофор-донор), используемая для обнаружения гибридизации специфических зондов посредством возбуждения электромагнитным излучением соответствующей длины волны

3.5
(молекула-)тушитель
quencher

⟨обнаружение пищевых патогенных микроорганизмов методом ПЦР⟩ флуоресцентная молекула (флуорофор-акцептор), служащая акцептором энергии и, таким образом, гасящая флуоресцентный сигнал репортёра (донора)

3.6
темный тушитель
dark quencher

молекула, служащая акцептором, которая не испускает энергию в спектральном диапазоне, обнаруживаемом оптической детекторной системой прибора ПЦР в реальном времени

3.7
активность 5'-3'-экзонуклеазы
5'-3'-exonuclease activity

Способность фермента, например, полимеразы нуклеиновой кислоты, расщеплять молекулу гибридизованной нуклеиновой кислоты в направлении 5'-3'

ПРИМЕЧАНИЕ Активность 5'-3'-экзонуклеазы специфична к двухцепочечной ДНК. Она зависит от типа фермента и может быть представлена, например Taq-, Tth- и Tfl-полимеразой.

3.8
флуоресцентный зонд
fluorescent probe

олигонуклеотид или его олигонуклеотид-аналог определенной последовательности в сочетании с одной или несколькими флуоресцентными молекулами

ПРИМЕЧАНИЕ Любую систему, испускающую флуоресцентный сигнал после специфической гибридизации в целевую последовательность нуклеиновых кислот, которую можно обнаружить конкретным прибором, можно использовать в качестве флуоресцентного зонда.

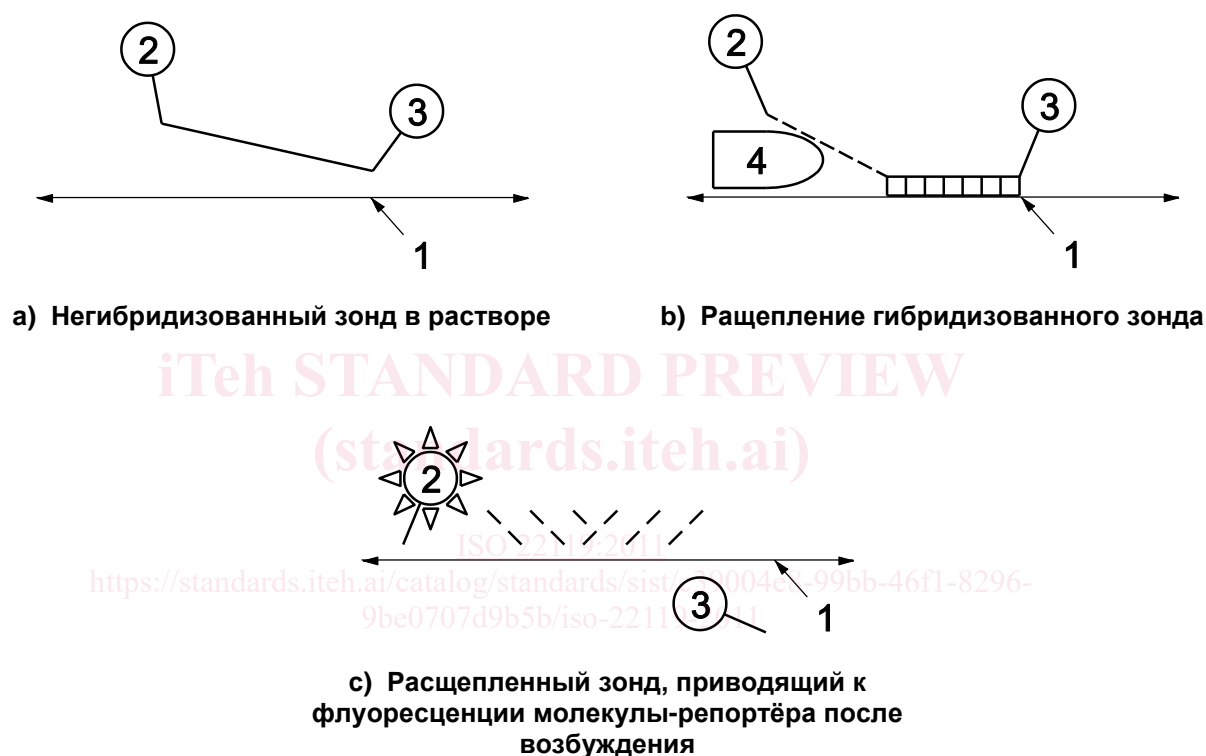
3.9

гидролизный зонд

hydrolysis probe

флуоресцентный зонд в сочетании с двумя флуоресцентными молекулами, которые пространственно разделяются в результате активности фермента 5'-3'-экзонуклеазы в процессе амплификации

ПРИМЕЧАНИЕ Принцип работы гидролизного зонда показан на Рисунке 1.



Обозначение

- 1 субстрат ДНК
- 2 флуоресцентная молекула (репортёр)
- 3 молекула-тушитель
- 4 фермент

Рисунок 1 — Принцип работы гидролизного зонда

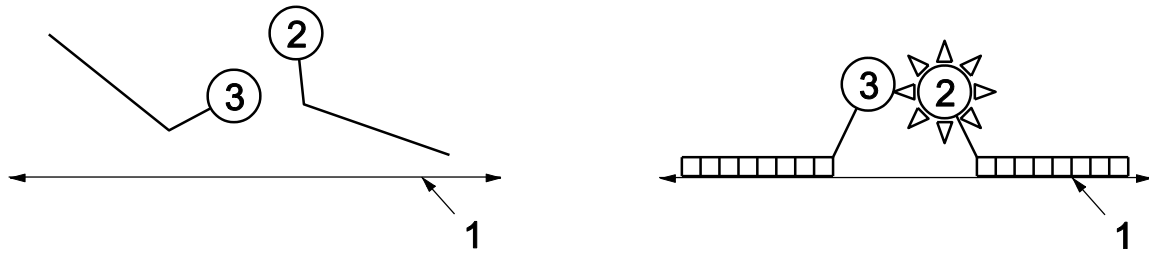
3.10

зонды (для флуоресцентной) гибридизации

hybridization probe

система двух флуоресцентных зондов, каждый в сочетании с одной флуоресцентной молекулой, в которой одна молекула служит донором, а другая акцептором

ПРИМЕЧАНИЕ Принцип работы зонда для гибридизации показан на Рисунке 2.



а) Негибридизованные зонды в растворе

б) Гибридные зонды, вызывающие флуоресценцию акцептора

Обозначение

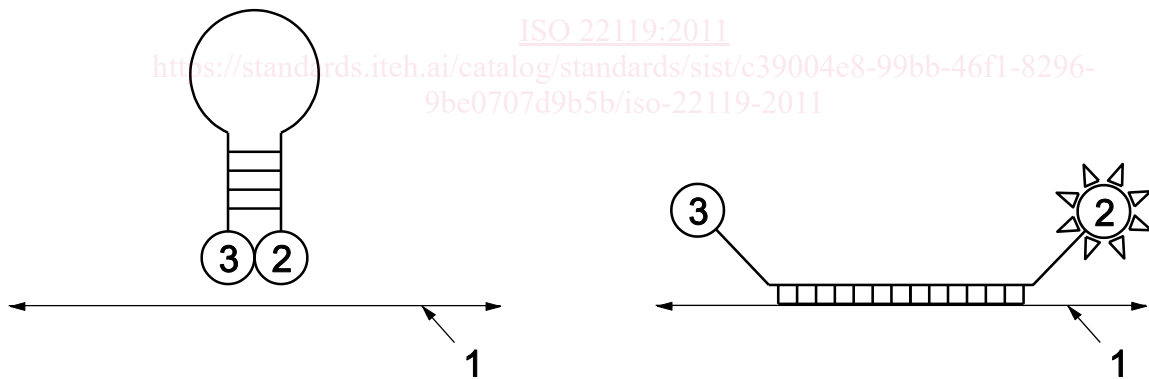
- 1 субстрат ДНК
- 2 молекула-акцептор
- 3 молекула-донор

Рисунок 2 — Принцип действия зонда для гибридизации

3.11 молекулярный маяк molecular beacon

флуоресцентный зонд, состоящий из трех различных частей: центральной части, комплементарной целевой последовательности нуклеиновых кислот, плюс 5'-часть и 3'-часть, которые комплементарны; репортёр присоединяется к одному из концов молекулы, а на другом конце молекулы располагается тушитель

ПРИМЕЧАНИЕ Принцип действия молекулярного маяка показан на Рисунке 3.



а) Негибридизованный молекулярный маяк в растворе

б) Гибридный молекулярный маяк, приводящий к флуоресценции репортёра

Обозначение

- 1 субстрат ДНК
- 2 флуоресцентная молекула (репортёр)
- 3 молекула-тушитель

Рисунок 3 — Принцип действия молекулярного маяка

3.12 зонд для обнаружения специфической последовательности ДНК патогенного микроорганизма probe for detection of a specific pathogen DNA sequence

зонд и с последовательностью, комплементарной ДНК патогенного микроорганизма, репортёр которого испускает сигнал с определенной длиной волны, который можно обнаружить с помощью оптической системы

3.13**зонд для обнаружения внутреннего контроля последовательности нуклеиновых кислот
probe for detection of an internal control nucleic acid sequence**

зонд м репортером, предназначенным для подтверждения результативности амплификации

ПРИМЕЧАНИЕ 1 Такой зонд испускает сигнал, четко отличающийся от сигнала зонда, предназначенного для обнаружения специфического патогенного микроорганизма.

ПРИМЕЧАНИЕ 2 Применение внутренних контролей требует использования прибора/, способного к обнаружению сигналов различной длины волны.

3.14**пассивный контроль
passive reference**

флуоресцентные молекулы, присутствующие в реакционной смеси и используемые для нормализации сигнала

ПРИМЕЧАНИЕ Они могут сочетаться с последовательностями нуклеиновых кислот или другими молекулами, не принимающими участие в реакции.

3.15**уровень обнаружения базовой линии флуоресценции
baseline fluorescence detection level**

“baseline”

Тоска, в которой реакция достигает интенсивности флуоресценции выше интенсивности фоновой флуоресценции

3.16**фоновая флуоресценция
background fluorescence**

“фон”

“background”

Присущий уровень флуоресценции за счет используемых реагентов и расходуемых материалов

3.17**точка пересечения порогового цикла
threshold cycle crossing point**

точка на кривой амплификации, в которой сигнал флуоресценции поднимается на базовой линии или пересекает предварительно определенный установленный порог

4 Принцип**4.1 Общие положения**

Анализ ПЦР в реальном времени обычно включает:

- a) амплификацию специфических целевых последовательностей в ПЦР в присутствии флуоресцентных зондов;
- b) прикрепление флуоресцентных зондов в каждом цикле амплификации;
- c) генерирование флуоресцентного сигнала путем возбуждения в каждом цикле;
- d) мониторинг сигналов флуоресценции с помощью оптической системы;
- e) анализ данных.