

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

Продукты пищевые

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Общие требования и определения

Foodstuffs. Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products. General requirements and definitions

МКС 67.040

Дата введения*

* Стандарт не введен на территории Российской Федерации в качестве национального стандарта Российской Федерации.
- Примечание изготовителя базы данных.

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

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 ТОО "КазВод-Консалтинг"

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

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации по результатам голосования в АИС МГС (протоколом от 30 января 2017 г. N 95-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт

Молдова	MD	Институт стандартизации Молдовы
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 24276:2006* "Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions" (Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения).

* Доступ к международным и зарубежным документам, упомянутым в тексте, можно получить, обратившись в Службу поддержки пользователей. - Примечание изготовителя базы данных.

Международный стандарт ISO 24276:2006 подготовлен Европейским комитетом по стандартизации (CEN) Технического комитета CEN/TC 275 "Анализ пищевых продуктов. Горизонтальные методы" в сотрудничестве с Техническим комитетом ISO/TC 34 "Продукты пищевые" в соответствии с Соглашением о техническом сотрудничестве между ISO и CEN (Венское соглашение).

Изменение 1 2013-04-15 к ISO 24276:2006 подготовлено в сотрудничестве с Техническим комитетом ISO/TC 34, Продукты пищевые, подкомитет SC 16, Горизонтальные методы анализа с помощью молекулярного биомаркера.

Степень соответствия - идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных (государственных) стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных (государственных) органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация также будет опубликована в сети Интернет на сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге "Межгосударственные стандарты"

Зарегистрирован N 13093 31 января 2017 г.

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает способ использования стандартов экстракции нуклеиновых кислот (ISO 21571), качественного анализа нуклеиновых кислот (ISO 21569), количественного анализа нуклеиновых кислот (ISO 21570) и методы, основанные на определении белков (ISO 21572), и объясняет их взаимосвязь при анализе генетически модифицированных организмов в продуктах питания.

Стандарт содержит общие требования к методологии, основанной на полимеризации цепной реакции (ПЦР).

Стандарт распространяется на продукты питания, но может быть применен также и для другой продукции (например, для семян, кормов и растительных образцов, отобранных из окружающей среды).

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные документы. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного документа.

Для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного документа (включая все его

Внимание! Документ включен в доказательную базу технического регламента. Дополнительную информацию см. в ярлыке "Примечания"
Внимание! О порядке применения документа см. ярлык "Примечания"

изменения).

ISO 5725-1 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины и определения по ISO 5725-1, а также следующие термины с соответствующими определениями.

3.1 Общие определения

3.1.1 **таксон-мишень (целевой таксон)** (target taxon): Таксон, к которому принадлежит генетически модифицированный организм.

Примечание - В настоящем стандарте таксон обычно означает биологический вид, однако он может иметь как более низкий, так и более высокий таксономический ранг.

3.1.2 **лабораторная проба** (laboratory sample): Проба, подготовленная для отправки в лабораторию и предназначенная для контроля или испытания.

Примечание - На основе данных ISO 7002:1986, [8] A.19.

3.1.3 **анализируемая проба/рабочая часть пробы** (test sample/test portion): Проба, подготовленная для испытания или анализа, количество которой будет использовано для экстрагирования анализируемого компонента за один раз.

Примечание - На основе данных ISO 6887-2:2003, [4] 3.2.

3.1.4 **специфичность** (specificity): Свойство метода реагировать исключительно на искомый показатель или анализируемое вещество.

3.1.5 **чувствительность** (sensitivity): Изменение ответной реакции, деленное на соответствующее изменение концентрации стандартной (калибровочной) кривой.

Примечание - Это наклон аналитической калибровочной кривой.

3.1.6 **предел обнаружения ПО** (limit of detection; LOD): Минимальное количество или концентрация анализируемого компонента в испытательном образце, которое может быть достоверно обнаружено, но необязательно оценено количественно, что может быть продемонстрировано с помощью совместных испытаний лабораторий или другого подходящего метода валидации.

Примечание - См. ссылку [2], описывающую совместные испытания лабораторий, и ссылку [3], описывающую метод валидации.

3.1.7 **предел количественного определения ПКО** (limit of quantitation; LOQ): Наименьшая концентрация или количество анализируемого компонента в испытательном образце, которая может быть количественно определена с приемлемым уровнем точности и достоверности, что может быть продемонстрировано с помощью совместных испытаний лабораторий или другого подходящего метода валидации.

Примечание - См. ссылку [2], описывающую совместные испытания лабораторий, и ссылку [3], описывающую метод валидации.

3.1.8 **точность** (accuracy): Степень близости результата измерений к принятому эталонному значению.

Примечание - На основе материалов [ISO 5725-1:1994, 3.6].

3.1.9 правильность (trueness): Степень близости среднего значения, полученного на основании большого числа измерений (или результатов испытаний), к принятому эталонному значению.

Примечания

1 Показателем правильности обычно является значение систематической погрешности. Правильность понимают иногда как "точность среднего значения".

2 На основе материалов ISO 5725-1:1994, 3.7.

3.1.10 прецизионность (precision): Степень близости друг к другу независимых результатов испытаний, полученных в конкретных регламентированных условиях.

Примечания

1 Прецизионность зависит только от случайных погрешностей и не имеет отношения к истинному или установленному значению измеряемой величины.

2 Меру прецизионности обычно выражают в терминах неточности и вычисляют как стандартное отклонение результатов измерений. Меньшая прецизионность соответствует большему стандартному отклонению.

3 "Независимые результаты измерений (или испытаний)" - результаты, полученные способом, на который не оказывает влияния никакой предшествующий результат, полученный при испытаниях того же самого или подобного объекта. Количественные значения мер прецизионности существенно зависят от регламентированных условий. Крайними случаями совокупностей таких условий являются условия повторяемости и условия воспроизводимости [ISO 5725-1:1994, 3.12].

3.1.11 повторяемость (repeatability): Прецизионность в условиях повторяемости [ISO 5725-1:1994, 3.13].

3.1.12 воспроизводимость (reproducibility): Прецизионность в условиях воспроизводимости [ISO 5725-1:1994, 3.17].

3.1.13 условия повторяемости (repeatability conditions): Условия, при которых независимые результаты измерений (или испытаний) получаются одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени [ISO 5725-1:1994, 3.14].

3.1.14 условия воспроизводимости (reproducibility conditions): Условия, при которых результаты измерений (или испытаний) получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами, с использованием различного оборудования [ISO 5725-1:1994, 3.18].

Примечание - Когда разные методы дают результаты испытаний, различающиеся незначительно, или когда разные методы разрешены планом эксперимента (как при исследовании опытности, либо при исследовании на сертификацию материалов для установления согласованной величины для эталонного материала), термин "воспроизводимость" может быть применён к итоговым параметрам. Условия должны быть ясно определены.

3.1.15 стандартное отклонение повторяемости (repeatability standard deviation): Стандартное отклонение результатов измерений (или испытаний), полученных в условиях повторяемости [ISO 5725-1:1994, 3.15].

Примечание - Стандартное отклонение повторяемости является мерой рассеяния результатов измерений в условиях повторяемости. Подобным образом можно было бы ввести и использовать понятия "дисперсии повторяемости" и "коэффициента вариации повторяемости" в качестве характеристик рассеяния результатов измерений в условиях повторяемости.

3.1.16 стандартное отклонение воспроизводимости (reproducibility standard deviation): Стандартное отклонение результатов испытаний, полученных в условиях воспроизводимости [ISO 5725-1:1994, 3.19].

Примечание - Стандартное отклонение воспроизводимости является мерой рассеяния результатов измерений (или испытаний) в условиях воспроизводимости. Подобным образом можно было бы ввести и

использовать понятия "дисперсии воспроизводимости" и "коэффициента вариации воспроизводимости", в качестве характеристик рассеяния результатов измерений (или) испытаний в условиях воспроизводимости.

3.1.17 предел повторяемости (repeatability limit): Величина меньшая или равная абсолютной разности между двумя результатами испытаний, полученными в условиях повторяемости, ожидаемая с вероятностью 95%).

Примечания

1 Используемое условное обозначение - r [ISO 5725-1:1994, 3.16].

2 При рассмотрении двух единичных результатов испытаний, полученных в условиях повторяемости, сравнение должно производиться с пределом повторяемости $r=2,8s_r$, где s_r является стандартным отклонением повторяемости (сходимости).

3.1.18 Предел воспроизводимости (reproducibility limit): Величина меньшая или равная абсолютной разнице между двумя результатами испытаний, полученных в условиях воспроизводимости, ожидаемая с вероятностью 95%.

Примечания

1 Используемое условное обозначение - r [ISO 5725-1:1994, 3.20]

2 При рассмотрении двух единичных результатов испытаний, полученных в условиях воспроизводимости, сравнение должно производиться с пределом воспроизводимости $R=2,8s_R$, где s_R является стандартным отклонением воспроизводимости.

3.1.19 совместные испытания, межлабораторные испытания (collaborative trial; interlaboratory study): Испытания, в которых несколько лабораторий независимо обнаруживают и/или определяют количественно какой-либо компонент в одной или нескольких "идентичных" порциях гомогенного стабильного материала в регламентированных условиях.

Примечание - Руководящие указания по проведению совместных испытаний детально разработаны в гармонизированном протоколе ISO 5725-2 [7] и ISO/AOAC/IUPAC [5].

3.1.20 применимость (applicability): Область применения метода, в которой определены материалы образцов (матрица), анализируемые вещества или виды, которые будут испытываться, а также диапазон их концентраций и тип исследования/мониторинга, для которых процедура, согласно рабочим характеристикам, применима".

Примечание - Она также описывает известные ограничения метода [3].

3.1.21 осуществимость (practicability): Простота операций (с учетом потока образцов и материальных затрат) для достижения требуемых критериев выполнения и, таким образом, соответствия заданной цели.

3.1.22 диапазон применимости/диапазон количественной оценки/линейность/динамический диапазон (applicability range/range of quantitation/linearity/dynamic range): Количественный интервал, внутри которого, как показано совместными испытаниями или другой подходящей процедурой валидации, аналитическая процедура имеет достаточный уровень точности и прецизионности.

Примечание - См. [2], где описаны совместные испытания, и [3], описывающую метод валидации.

3.1.23 погрешность измерения (measurement uncertainty): Параметр, связанный с результатом измерения, который характеризует дисперсию величин, которые обоснованно могут быть приписаны анализируемому компоненту.

3.1.24 метод скрининга (screening method): Метод, позволяющий быстро и достоверно исключить большое количество отрицательных или положительных анализируемых образцов и ограничить количество образцов, требующих применения точного метода.

Примечания

1 См. [3].

2 В настоящем стандарте под методом скрининга понимают метод обнаружения продуктов генов (т.е. белков) и/или генетических элементов, присущих нескольким ГМО (например, промоторы, терминаторы или другие целевые генетические элементы (последовательности)).

3.1.25 метод генетической конструкции (construct-specific method): Метод, целью которого является определение комбинации внесенных последовательностей в дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая может быть обнаружена только в компоненте, являющимся производным ГМО.

3.1.26 метод обнаружения трансформационного события (event-specific method): Метод, позволяющий детектировать уникальную последовательность ДНК, характерную для указанного вида (события) генетической трансформации.

Примечание - Такую последовательность обычно выбирают на границе генома и вставки.

3.2 Термины, относящиеся к экстракции и очистке ДНК

3.2.1 экстракция ДНК (DNA extraction): Отделение ДНК от других компонентов исследуемого образца.

3.2.2 очистка ДНК (DNA purification): Метод, приводящий к получению более чистой ДНК.

Примечание - В этом контексте чистота относится к уменьшению наблюдаемых и измеряемых эффектов ингибиторов ПЦР.

3.2.3 ДНК ПЦР-качества (PCR quality DNA): Образец ДНК достаточной длины, химической чистоты и структурной целостности, предназначенный для амплификации методом ПЦР.

3.3 Термины, относящиеся к амплификации ДНК ПЦР

3.3.1 идентичность последовательностей нуклеиновых кислот (identity of nucleic acid sequences): Определение идентичности путем сравнения с фрагментом/последовательностью эталонной нуклеиновой кислоты.

Примечание - Например, путем специфичной гибридизации с зондом, проверки совпадения участков рестрикции или совпадения при определении последовательностей ДНК.

3.3.2 область соединения (junction region): Последовательность ДНК, объединяющая два следующих друг за другом элемента последовательности, таких как промотор и кодирующий участок гена.

3.3.3 граничная область интеграции (integration-border region): Область соединения, в которой один элемент происходит из организма хозяина, а другой элемент происходит из ДНК, вставленной в ходе трансформации.

3.3.4 таксон-специфичная (эндогенная) целевая последовательность (taxon-specific (endogenous) target sequence): Последовательность, специфичная для целевого таксона.

Примечания

1 Такая последовательность постоянно присутствует в целевом таксоне и отсутствует в других таксонах.

2 Существует, по крайней мере, два типа последовательностей, специфичных к целевому таксону:

- последовательности с различным числом копий или многокопийные последовательности, которые могут использоваться, например, для оценки наличия нуклеиновых кислот из целевого таксона;

- последовательности с небольшим числом копий или однокопийные последовательности, которые могут использоваться, например, в качестве референсных (эталонных) последовательностей при оценке фонового содержания эквивалентов генома целевого таксона в количественном анализе.

3.3.5 прямой поток (forward flow): Принцип работы с материалами/образцами, применяемый для того, чтобы обеспечить физическое разделение лабораторного образца, исходной и обработанной рабочей части образца (включая амплифицированную ДНК) в течение всей процедуры анализа.

3.4 Определения, относящиеся к контролям ДНК ПЦР

Примечание - Контроль, применимый к каждому методу, основанному на определении белка, описан в ISO 21572. Следующие определения применяются для методов, основанных на определении ДНК.

3.4.1 положительный контроль целевой ДНК (positive DNA target control): Эталонная ДНК или ДНК, экстрагированная из сертифицированного эталонного материала, или известного типичного положительного образца исследуемой последовательности или организма.

Примечание - Этот контроль применяется, чтобы продемонстрировать, что реактивы для ПЦР работают как положено.

3.4.2 отрицательный контроль целевой ДНК (negative DNA target control): Эталонная ДНК или ДНК, экстрагированная из сертифицированного эталонного материала или известного отрицательного образца, не содержащая исследуемой последовательности.

Примечание - Этот контроль демонстрирует, что результаты анализов исследуемых образцов, не содержащих целевой последовательности, будут отрицательными.

3.4.3 контроль ингибирования ПЦР (PCR inhibition control): Реакционная смесь, которая обеспечивает средство контроля ингибирования ПЦР при испытании целевого компонента специфического образца.

Примечания

1 Этот контроль позволяет определение присутствия растворимых ингибиторов ПЦР, и он особенно необходим в случае отрицательной амплификации и при количественной ПЦР.

2 Обычно известное количество целевой ДНК добавляется к реакции, которая должна быть проконтролирована. Это может быть оригинальная целевая последовательность или некий ее аналог, например, слегка модифицированная целевая последовательность, такая как плазида конкурента (конкурентная плазида).

3.4.4 контроль реагентов ПЦР (PCR reagent control): Контроль, содержащий все реактивы для амплификации, за исключением экстрагированной эталонной ДНК испытательного образца.

Примечание - Этот контроль применяется, чтобы продемонстрировать отсутствие загрязняющих нуклеиновых кислот в реактивах. Вместо эталонной ДНК к реакционной смеси добавляется, например, эквивалентный объем дистиллированной воды.

3.4.5 пустой контроль экстракции (extraction blank control): Контроль, генерируемый путем проведения всех стадий процедуры экстракции, за исключением добавления рабочей части образца.

Примечания

1 Например, путем замены рабочей части образца водой.

2 Этот контроль применяется, чтобы продемонстрировать отсутствие загрязняющих нуклеиновых кислот в ходе экстракции.

3.4.6 положительный контроль экстракции (positive extraction control): Контроль применяется, чтобы продемонстрировать, что процедура экстракции ДНК проводилась путем, который позволяет экстрагировать целевую ДНК.

Примечание - Например, путем использования материала образца, который заведомо содержит целевую ДНК.

3.4.7 контроль окружающей среды (environment control): Контроль применяется, чтобы определить, что отсутствует загрязнение нуклеиновыми кислотами, например, из воздуха в лаборатории.

Примечание - Контроль представляет собой пробиру, содержащую соответствующий объем свободной от нуклеиновых кислот воды, которую оставляют открытой для доступа воздуха в течение всего процесса.

3.5 Термины, относящиеся к эталонным образцам

3.5.1 эталонный материал (reference material): Материал или вещество, один или несколько, чьи свойства достаточно однородны, и достоверно установлено, что он может использоваться для калибровки прибора, оценки точности метода измерения или для установления показателей для материалов.

[Первоисточник ISO Guide 30].

3.5.2 сертифицированный эталонный материал (certified reference material): Эталонный материал, снабженный сертификатом, одно или несколько свойств которого сертифицированы с помощью надлежащей технически проведенной процедуры, имеющей сертификат или прослеживаемый сертификат, или другую документацию, выданную органом по сертификации.

[ISO Guide 30].

3.6 Термины, относящиеся к количественному определению

Примечание - Контроли, применимые к методам, основанным на определении белка, описаны в ISO 21572. Следующие определения применяются к методам, основанным на ДНК.

3.6.1 эндогенная последовательность ДНК (endogenous DNA sequence): Определенная эталонная последовательность ДНК, являющаяся природной для соответствующего таксона.

Примечание - Эндогенная последовательность ДНК может использоваться для определения количеств геномных эквивалентов целевого таксона, если последовательность присутствует в постоянном числе копий и не проявляет аллельных вариаций между сортами целевого таксона.

3.7 Термины, относящиеся к ГМО

3.7.1 Содержание ГМО (GMO content): Идентичность и количество ГМО или материалов, полученных из ГМО в продукте.

Примечание - Обычно содержание ГМО оценивается путем детектирования анализируемого компонента (идентификации и количественного определения).

4 Применение взаимосвязанных международных стандартов

4.1 Общие положения

Методы, которые включены в приложения к стандартам ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571 и ISO 21572, были подтверждены совместными испытаниями лабораторий [2] и [7] или другими аналогичными процедурами валидации [5]. Результаты проверки и рабочие характеристики включены в каждый метод.

Международные стандарты ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571 и ISO 21572 содержат ряд отдельных методов, считающихся подходящими для обнаружения полученных из ГМО материалов в пищевых продуктах. Конкретный выбор метода (методов) зависит от соответствия цели, и пользователю этих стандартов, следует обратить внимание на область применения каждого приложения для получения более подробной информации.

Взаимосвязь между этими стандартами описана схемой последовательности операций на рисунке 1.

Примечание - ISO/TC 21098 [11] описывает общие требования для методов, приведенных в приложениях к ISO 21569, ISO 21570 и ISO 21571.

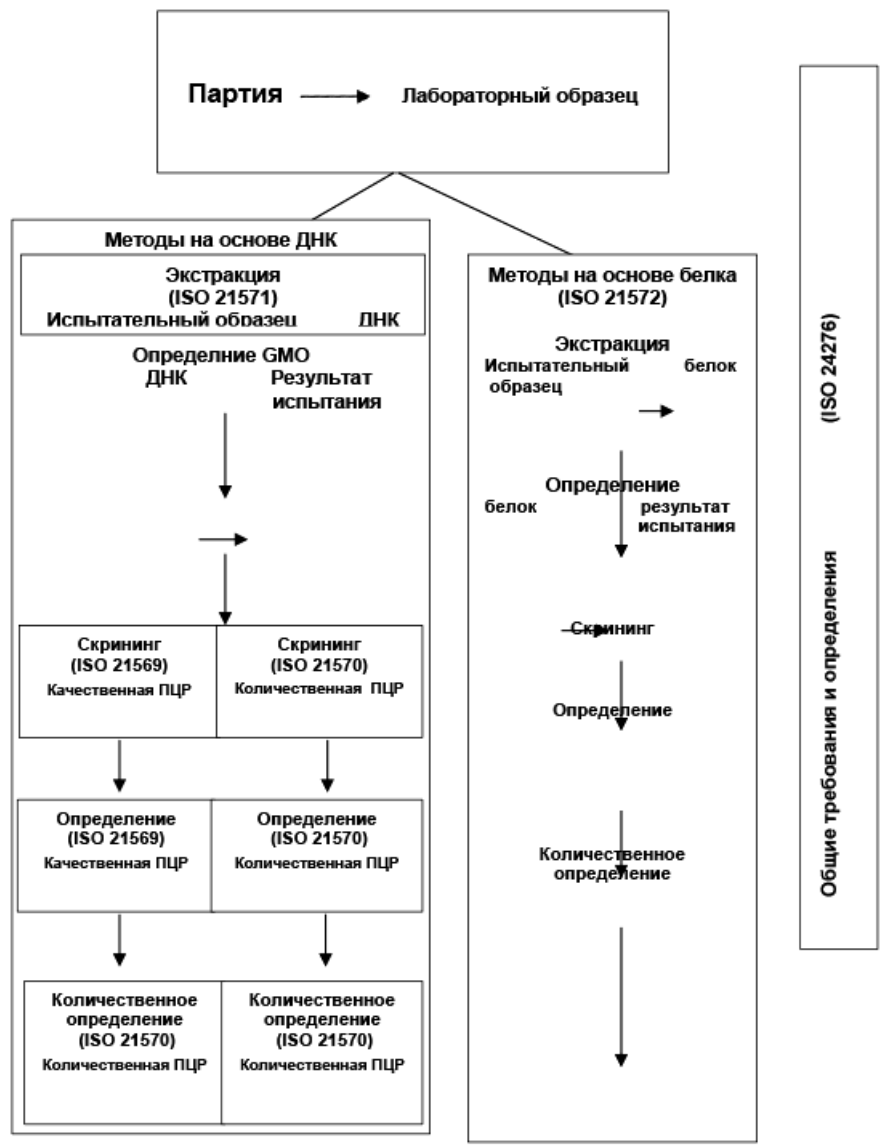


Рисунок 1 - Блок-схема взаимосвязей международных стандартов по методам обнаружения ГМО

4.2 Руководство для пользователей по выбору методов

4.2.1 Общие положения

Специфика конкретных целевых анализируемых компонентов и методы обнаружения могут существенно различаться. Поэтому важно быть уверенным в том, что выбранные методы обеспечивают желаемый результат. Руководящие указания, приведенные в 4.2.2 и 4.2.3, могут быть полезными.

4.2.2 Методы, использующие белок в качестве цели анализа

Белки могут быть обнаружены с помощью применения конкретных антител. В этом случае для обнаружения того или иного белка обычно получают конкретное антитело. Степень сродства антител к белку зависит от конформации белка после экстракции. Специфичность используемого антитела должна быть продемонстрирована (например, не должно быть перекрестной реактивности).

Обнаружение специфического ГМО - производного материала с помощью количественного определения белка не может быть аккуратно осуществлено, если имеет место более чем один ГМО, - производный материал экспрессирующий один и тот же белок.

Методы скрининга, основанные на присутствии экспрессируемого белка, могут оказаться полезными, чтобы оценить содержит или не содержит трансген продукт, вероятно содержащий материал, являющийся производным ГМО. Примеры методов скрининга имеют формат lateralflow/dipstic и качественные ELISA.

Количественное определение содержания ГМО в некоторых матриксах может быть осуществлено с помощью методов, основанных на определении белка, таких как ELISA. Метод должен быть валидирован для матрикса, который предстоит анализировать, и должны быть доступны стандарты для построения калибровочной кривой, по которой осуществляется расчет количества белка в испытательных образцах.

4.2.3 Методы, использующие ДНК в качестве цели анализа

Специфичность аналитических методов, использующих ДНК как мишень для определения присутствия материала, являющегося производным ГМО, зависит от специфических свойств целевой последовательности ДНК. Ниже приведены применения и классификации специфичности.

а) Таксон - специфические методы целевых последовательностей ДНК, обнаруженных у единичного таксона, обычно у вида, но возможно имеющего более низкое или более высокое таксономическое положение. Таксон специфические методы могут быть применимы при определении присутствия, качества и количества ДНК, происходящей из того или иного таксона, и иногда используются в качестве исходной точки при определении относительного содержания материала, являющегося производным ГМО. Специфичность должна быть установлена с помощью экспериментальных данных.

б) Методы скрининга целевых последовательностей ДНК, найденных в различных, но необязательно во всех трансформационных событиях. Эти последовательности могут также быть найдены и в материале не являющимся ГМО, например, вследствие присутствия природных вирусов или бактерий.

Методы скрининга могут быть использованы при оценке, содержит или не содержит трансген продукт, вероятно содержащий материал, который является производным ГМО. Примером методов скрининга является качественная ПЦР, с помощью, которой обнаруживается CaMV35S промотор из вируса мозаики цветной капусты.

с) Методы специфической конструкции обнаруживают последовательности ДНК, которые найдены только в материале, являющимся производным ГМО, т.е. в комбинациях элементов последовательности ДНК, сконструированных с помощью генной инженерии. Обнаружение конкретной генной конструкции может оказаться достаточным для идентификации трансформационного события, из которого происходит ДНК, однако та же самая генная конструкция может быть использована в более, чем одном трансформационном событии и число внедрившихся копий полной и/или усеченных генных конструкций на один гаплоидный ГМ-геном у разных событий может варьировать.

д) Методы специфического события обнаруживают последовательности ДНК, которые найдены только в материале, являющимся производным единичного трансформационного события, обычно последовательность ДНК, охватывающую область соединения между введенной ДНК и хозяйским геномом (границная область интеграции). Число копий последовательности ДНК специфического события - всегда одна на гаплоидный ГМ-ген. Методы специфического события особенно подходят для идентификации специфических событий и, когда используются в валидированном методе ПЦР в реальном времени, могут также оценить количество ДНК, происходящей из конкретного ГМО.

4.3 Рабочие характеристики

4.3.1 Общие положения

Приемлемые рабочие характеристики и уровни методов приведены в приложениях к ISO 21569, ISO 21570 и ISO 21572.

4.3.2 Предел обнаружения (ПО) (Limit of detection (LOD):

Значения предела обнаружения для каждого аналитического метода, приведенные в приложениях к ISO 21569, ISO 21570 и ISO 21572, основываются на данных валидации, полученных в ходе совместных испытаний, проводимых лабораториями, и/или заявлениях разработчиков метода и включены только для информационных целей. Значения предела обнаружения, полученные в ходе совместных испытаний лабораторий, обычно ссылаются на наиболее низкое количество анализируемого компонента, для которого уровень ложноотрицательных результатов не превышает 5%.

4.3.3 Предел количественного определения (ПКО) (limit of quantitation): Значения предела обнаружения для каждого аналитического метода, приведенные в приложениях ISO 21570 и ISO 21572, основываются на данных валидации, полученных в ходе совместных испытаний, проводимых лабораториями, и/или заявлениях

разработчиков метода и включены только для информационных целей.

5 Общие требования к лаборатории и процедурам

5.1. Общие положения

Процедура анализа включает в себя следующие стадии:

- подготовка анализируемого образца (по согласованию с заказчиком возможно следующее альтернативное решение: если лабораторный образец не выступает целиком в качестве анализируемого образца, то его следует гомогенизировать и отобрать из него образцы для анализа в соответствии с действующими международными стандартами);
- измельчение рабочей части образца;
- подготовка рабочих частей образца;
- экстракция анализируемого компонента;
- тестирование, интерпретация и представление результатов.

Инструкции по этой процедуре приведены в основном тексте и отдельных приложениях ISO 21569, ISO 21570, ISO 21571 и ISO 21572.

5.2 Использование контролей

Контроли должны быть использованы в соответствии с таблицей 1. Таблица 1 применяется только к методам на основе ДНК. Контроли, применимые к методам на основе белка, описаны в ISO 21572.

Таблица 1 - Схема, иллюстрирующая пересечение последовательных этапов и использование видов контроля

Контрольная стадия	Контроль окружающей среды ^b	Пустой контроль экстракции ^c	Положительный контроль экстракции ^d	Положительный контроль целевой ДНК ^e	Отрицательный контроль целевой ДНК ^f	Контроль реагентов амплификации ^g	Контроль ингибирования ПЦР ^h
Гомогенизация	Обязательное	-	-	-	-	-	-
Экстракция нуклеиновых кислот	↓ ^a	Один на серию	Обязательное через регулярные промежутки	-	-	-	-
Оценка качества нуклеиновой кислоты	↓	↓	↓	-	-	-	-
Амплификации нуклеиновых кислот	↓	↓	↓	Обязательное	Рекомендуемое	Обязательное	Рекомендуется, но в некоторых случаях обязательно ⁱ
Оценка результатов амплификации нуклеиновых кислот	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Интерпретация	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Отчет об исследовании	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓
a Стрелки указывают, что этот контроль следует применять и на последующих стадиях. b Использование контроля окружающей среды поможет лаборатории идентифицировать источники контаминации на ранней стадии и для идентификации, в каком рабочем помещении присутствует контаминация. Это может быть продемонстрировано различными способами, например, если отрицательные образцы включены в серию гомогенизированных образцов показали отрицательные результаты, начиная с первого этапа процесса (например, если применимо, стадия измельчение). c По крайней мере, один пустой контроль должен быть включен каждый раз, когда ДНК экстрагируется из одного или более образцов. Пробирка должна всегда быть последней в каждой серии. Может быть подходящим помещать одну пустую экстракцию, например, в штатив из восьми пробирок или на микроплашку на 96 лунок для автоматической экстракции. d Положительный контроль экстракции должен регулярно включаться и во всех случаях, когда используется новая партия реактивов для экстракции. Если что-то не так с реактивами или с проведением протокола экстракции, то этот контроль это выявит. e Положительный контроль целевой ДНК демонстрирует способность процедуры амплификации нуклеиновой кислоты обнаружить образец нуклеиновой кислоты ГМО или целевого таксона. Это условие может также быть выполнено с помощью соответствующего положительного контроля экстракции. f Отрицательный контроль целевой ДНК демонстрирует способность процедуры амплификации нуклеиновой кислоты избежать ложноположительной амплификации в отсутствие образца нуклеиновой кислоты ГМО или целевого таксона. g Контроль реагентов амплификации демонстрирует отсутствие загрязняющей нуклеиновой кислоты в используемой партии реактивов для ПЦР. Контроль реагентов амплификации может быть опущен, когда используется пустой контроль экстракции. h Контроль ингибирования ПЦР может использоваться для демонстрации отсутствия растворимых ингибиторов. Это также может быть продемонстрировано путем серийных разведений матричной нуклеиновой кислоты. Однако должны быть сделаны некоторые типы оценки эффекта растворимых ингибиторов на результаты анализа образца. i Контроль ингибирования ПЦР является обязательным, если все исследования образца с помощью ПЦР были отрицательными и для продуктов, для которых выход амплифицируемой ДНК неизвестен.							

5.3 Организация лаборатории

5.3.1 Общие положения

Следует соблюдать надлежащие требования в отношении правил безопасности и рекомендаций производителя по безопасности и необходимо поступать в соответствии с руководящими принципами, изложенными в ISO/IEC 17025 [9].

5.3.2 Проектирование лаборатории

Случайная контаминация ДНК может происходить из-за пыли или распыленных аэрозолей. Как следствие, организация рабочих помещений в лаборатории логически основана на:

- систематической защите всех методологических стадий, используемых для получения результатов;
- принципе "прямого тока" при работе с образцом.

Для методов, основанных на определении ДНК, применяется следующая конструкция лаборатории.

Необходимо, как минимум, четыре отдельно спроектированных специализированных рабочих зоны, для каждой из которых требуется отдельное оборудование, а именно:

- a) рабочая зона для измельчения и гомогенизации;

Внимание! Документ включен в доказательную базу технического регламента. Дополнительную информацию см. в ярлыке "Примечания"
Внимание! О порядке применения документа см. ярлык "Примечания"

b) рабочая зона для экстракции нуклеиновых кислот из исследуемого материала;

c) рабочая зона, предназначенная для постановки реакций ПЦР/амплификации;

d) рабочая зона, предназначенная для последующей обработки, включая анализ и характеристику амплифицированных последовательностей ДНК, если это предусмотрено.

Если используется оборудование для измельчения, продуцирующее частицы пыли, эта работа должна производиться в дополнительной рабочей зоне.

Физическое разделение путем использования разных комнат является наиболее эффективным и предпочтительным путем обеспечения отдельных рабочих зон, однако могут быть использованы и другие методы для защиты от контаминации, при условии, что их эффективность сопоставима.

5.3.3 Персонал

Сотрудники лаборатории должны носить разную лабораторную одежду в разных рабочих зонах, таких как зона для измельчения или пост-ПЦРная зона. Они также должны использовать одноразовые перчатки. По возможности, использование перчаток с порошковым напылением следует избегать при предварительных операциях ПЦР, так как порошок может препятствовать реакциям ПЦР, или стать причиной их загрязнения, например, как в случае если они сделаны из кукурузного крахмала. Перчатки и лабораторная одежда должна заменяться с соответствующей периодичностью. Все ПЦР-процедуры должны производиться в условиях, исключающих контаминацию, насколько это возможно.

Весь персонал, производящий все стадии испытательной процедуры, должен быть обучен и подготовлен для работы с техникой.

5.3.4 Приборы и другое оборудование

Лаборатория должна использовать надлежащим образом обслуживаемое оборудование, пригодное для реализации используемых методов. В приложениях к стандартам описаны дополнительные специализированные приборы, применяемые помимо стандартного лабораторного оборудования.

Техническое обслуживание инструментов и оборудования должно выполняться согласно требованиям ISO/IEC 17025 [9]; при этом необходимо следовать соответствующим инструкциям изготовителя.

5.3.5 Материалы и реактивы

Для анализа, если не установлено иное, используются реактивы, имеющие квалификацию "для аналитических целей", пригодные для молекулярной биологии и свободные от ДНК и ДНКаз. Реактивы и растворы должны храниться при комнатной температуре, если не указано иное. Реактивы ПЦР должны храниться в виде небольших аликвот для минимизации риска загрязнения. Используемая вода должна быть бидистиллированной или сопоставимого качества. Растворы следует готовить растворением соответствующих реактивов в воде с последующим автоклавированием, если не определено иначе. Если автоклавирование невозможно, можно использовать оборудование для стерильной фильтрации (возможный размер пор 0,22 мкм).

Для того чтобы предотвратить загрязнение, в зоне постановки ПЦР должна быть принята стерильная методика, в частности, должны использоваться не посыпанные пудрой перчатки, стерилизованная пластиковая посуда, автоклавированные реактивы, одноразовая пластиковая посуда, защищенные от аэрозолей наконечники для микропипеток.

Материалы и все контейнеры, а также все одноразовые упаковки, содержащие реактивы, должны предохраняться от любого загрязняющего агента (например, от пыли).

Необходимо следовать рекомендациям производителя по применению реактивов. Для оценки работоспособности реактивов и отсутствия в них ДНases могут использоваться соответствующие контроли.

В препаратах не должно присутствовать никакой непредусмотренной ферментативной активности (например, экзонуклеазной), которая может препятствовать ПЦР. Реакционный буфер должен соответствовать торговой марке используемой полимеразы.

6 Интерпретация и представление результатов

6.1 Общие положения

Для количественных методов расчет и представление результатов приведены в ISO 21570 и ISO 21572. Ни один неоднозначный результат не должен быть представлен.

6.2 Интерпретация контролей

Каждый контроль имеет неоспоримое значение и, если наблюдаемый результат для любого контроля отличается от этого значения, анализ должен быть повторен. Контроль окружающей среды может быть положительным (обнаружен продукт амплификации ожидаемой величины) или отрицательным (продукта амплификации не обнаружено), но положительный результат должен всегда инициировать меры по удалению и предотвращению контаминации лабораторных помещений. В том случае, если необоснованный результат для любого из других контролей получен повторно, должны быть предприняты меры по удалению/замещению источника(ов), ответственного за ошибку, после чего анализ должен быть повторен. Результаты анализа могут быть представлены только в том случае, когда все контроли дадут неоспоримые результаты. Неоспоримые результаты для контролей таковы:

- положительные контроли реакции всегда должны быть положительными;
- пустые контроли экстракции всегда должны быть отрицательными;
- положительные контроли целевой ДНК всегда должны быть положительными;
- отрицательные контроли целевой ДНК всегда должны быть отрицательными;
- контроли реактивов амплификации всегда должны быть отрицательными.

Контроли ингибирования ПЦР не должны проявлять значительных ингибиторных эффектов в отношении реакции (для качественного анализа эффекты ингибирования могут быть менее выраженными, чем для количественного анализа).

Возможные результаты ПЦР для контролей перечислены в таблице 2. Они используются для интерпретации/представления отчетов для результатов для испытательного образца.

Таблица 2 - Примеры результатов ПЦР

Анализируемая проба	Положительный контроль экстракции	Пустой контроль экстракции	Отрицательный контроль целевой ДНК	Положительный контроль целевой ДНК	Интерпретация результата
+ ^a	+	-	- ^b	+	Положительный
-	+	-	-	+	Отрицательный
+	+	+	-	+	Недостаточен для принятия решения ^c
+	-	+	-	-	Недостаточен для принятия решения ^c
-	-	-	-	-	Недостаточен для принятия решения ^d

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">a Продукт ПЦР обнаружен в пределах обнаружения используемого аналитического метода и анализируемой рабочей части образца.b Продукт ПЦР не обнаружен в пределах обнаружения используемого аналитического метода и анализируемой рабочей части образца.c Процедура должна быть повторена, начиная со стадии экстракции (возможное загрязнение).d Процедура должна быть повторена с использованием другого метода или с дальнейшим этапом очистки (возможное ингибирование) | |
|---|--|

Все стадии испытаний и полученные результаты должны быть внесены в протокол.

6.3 Представление отрицательного результата

В протоколе испытаний должен присутствовать следующий текст:

"В образце X, целевая последовательность Y не обнаружена.

ПО метода составляет x % по результатам испытаний на ABC (указывается название стандартного образца)".

Если невозможно подтвердить, что количество целевой последовательности ДНК, участвующее в ПЦР, является достаточным для установленного значения ПО, в протокол должна быть добавлена следующая фраза:

"Тем не менее, количество целевой последовательности ДНК, экстрагированной из образца биологического вида X может быть/было не достаточным для ПО, установленного применительно к данному образцу".

Кроме того, если требуется: "Фактический предел обнаружения составляет x%".

Примечание - Фактическое значение ПО для образца определяется исходя из количества последовательности ДНК для вида, участвующего в аналитической реакции, (количества копий) и отношения к абсолютному значению ПО для целевой генной модификации (количеству копий).

6.4 Представление положительного результата

При проведении качественного анализа в протоколе испытаний должен присутствовать следующий или аналогичный текст:

"В образце X обнаружена целевая последовательность Y".

Данные по идентификации ГМО, если они известны, могут быть включены в протокол.

При проведении количественного анализа.

Если обнаруживаются как целевая таксон-специфичная последовательность, так и целевая модифицированная последовательность ДНК, однако обнаруженное количество меньше ПКО по крайней мере для одной из целевых последовательностей, в протоколе испытаний должен присутствовать следующий текст для каждой ГМО-последовательности:

"Установлено присутствие ДНК, характерной для ГМО (указывается вид ГМО), о чем свидетельствует обнаружение (указывается целевая последовательность), полученной из (указывается биологический вид/таксон), в количестве ниже фактического предела количественного определения".

Кроме того, если требуется: "Фактический предел количественного определения составляет x%".

Если обнаруживаются как целевая таксон-специфичная последовательность, так и целевая модифицированная последовательность ДНК и количество обеих последовательностей превышает ПКО для обеих целевых последовательностей, то для каждой целевой последовательности необходимо сообщить

следующее:

"Содержание ДНК, характерной для ГМО (указывается вид ГМО), о чем свидетельствует обнаружение (указывается целевая последовательность), полученной из (указывается целевая последовательность), составляет $x \pm u_{\text{meas}} \%$ ", где u_{meas} - неопределенность измерения".

6.5 Представление неоднозначных результатов

Результаты испытаний всех анализируемых частей образца не должны противоречить друг другу. Если как минимум одна анализируемая часть образца дает положительный результат и еще как минимум одна анализируемая часть дает отрицательный результат, анализ следует повторить.

В том случае если как минимум одно повторение процедуры, начиная с экстрагирования нуклеиновых кислот, дает неоднозначные результаты, например один - положительный, а другой - отрицательный, результат в протоколе следует представить как отрицательный на грани предела обнаружения.

Результаты для одной и той же части образца должны быть непротиворечивыми. В случае +/- результатов для двух повторений необходимо повторить две ПЦР для соответствующей анализируемой части образца. Если результаты двух новых повторных испытаний соответствуют +/- или -/-, анализируемой части образца приписывается отрицательный результат.

Результаты должны быть представлены в соответствии с требованиями ISO 21569 и ISO 21570.

6.6 Требования гарантии качества

Общие аспекты гарантии качества изложены в ISO/IEC 17025.

Когда методы валидированы и показано, что они пригодны для единичной матрицы, эти методы не должны применяться к подобным или другим матрицам до того, как будет установлена их применимость для этих дополнительных матриц.

7. Протокол испытаний

Протокол испытаний должен быть подписан уполномоченным лицом в соответствии с ISO/IEC 17025 [9] и должен содержать как минимум следующую информацию:

- a) полную информацию, необходимую для идентификации лабораторного образца (включая размер лабораторного образца);
- b) любую дополнительную информацию, касающуюся лабораторного образца;
- c) полную информацию, касающуюся анализируемого образца (количество размолотого образца);
- d) ссылку на настоящий стандарт и соответствующее приложение (приложения);
- e) отчет о дате и типе применяемой процедуры (процедур) отбора образца;
- f) дату приема образца на испытания;
- g) условия хранения (при необходимости);
- h) дату начала/окончания испытаний (при необходимости);
- i) сведения об исполнителе, ответственном за испытания;
- j) результаты испытаний в соответствии с требованиями конкретного метода и единицы измерения, использованные при представлении результатов испытаний, сведения о калибровке и методах расчета;
- k) все единичные наблюдения, сделанные в ходе испытаний;
- l) любые отклонения, дополнения или исключения из технических требований испытаний;
- m) требования, установленные для протокола испытаний в соответствующем разделе ISO 21569 или ISO 21570;

Протокол испытаний должен быть подписан уполномоченным лицом в соответствии с ISO/IEC 17025 [9] и должен содержать как минимум следующую информацию:

n) всю прочую информацию в соответствии с требованиями раздела 6.

При изложении информации необходимо соблюдать требования к применению единиц измерений.

Пользователь результатов испытаний должен иметь возможность подать запрос на получение данных о неопределенности измерений и соответствующих доверительных интервалах.

Приложение Д
(информационное)

Сведения о соответствии межгосударственных стандартов ссылочным международным стандартам

Обозначение и наименование международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 5725-1 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения	IDT	ГОСТ ИСО 5725-1-2003 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

Библиография

[1] Codex Alimentarius Commission, General criteria for selecting analysis methods using criteria approach. В: Procedural guidance, 19th ed., p.51. Rome: FAO, WHO, 2010 (Комиссия по Кодексу Алиментариус. Общие критерии для выбора методов анализа с использованием подхода критериев. В: Процессуальное руководство, 19-ое издание, стр.51. Рим: ФАО, ВОЗ, 2010 г.)

[2] Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. Pure and Applied Chemistry, 67, 1995, pp.331-343 (Хорвиц, В., Протокол для проектирования, проведения и интерпретации исследований качества работы метода. Теоретическая и прикладная химия, 67, 1995 г., стр.331-343)

[3] Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, In House Method validation. In House validated methods and their role in methods of analysis for Codex purposes. Codex Alimentarius Commission (CX/MAS 98/8), 1998, Budapest, Hungary, 23-27 November 1998 (Международный комитет по установлению норм по методам анализа и взятия образцов, Внутрिलाбораторная валидация метода. Внутрिलाбораторно одобренные методы и их роль в методах анализа для Кодекса. Комиссия по Кодексу Алиментариус (CX/MAS 98/8), 1998, Будапешт, Венгрия, 23-27 ноября 1998 г.)

[4] Inhorn, S.L. Quality Assurance Practices for Health Laboratories. APHA, Washington DC, 1978, p.588 (Инхорн, С.Л., Практика обеспечения качества для лабораторий здравоохранения, АРНА, Вашингтон DC, 1978, с.588)

[5] ISO 6887-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products (ISO 6887-2:2003, Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка испытательных образцов, исходная суспензия и десятичные разведения для микробиологического исследования. Часть 2. Особые правила для подготовки мяса и мясных продуктов)

[6] Thompson, M., Ellison, S.L. and WOOD, R. Harmonised guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl. Chem., 47, No. 5, 2002, pp.835-855 (Томпсон, М., Эллисон, С.Л., Вуд, Р. Согласованные руководящие принципы для отдельного лабораторного подтверждения методов анализа. Теоретическая и прикладная химия 2002 года, 74, стр.835-855)

[7] Arumuganathan, K. and Earle, E.D. Nuclear content of some important plant species. Plant Mol. Biol. Rep., 9(3), 1991, pp.208-218 (Арумуганатан, К. и Ерл, Е.Д., Содержание ядра некоторых важных видов растений.

Пред. Молекулярной биологии растений, 9(3), 1991, стр.208-218)

[8] ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (ISO 5725-2, Точность (достоверность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Базовые методы определения повторяемости и воспроизводимости стандартных методов измерений)

[9] ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025, Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

[10] ISO 7002:1986, Agricultural food products - Layout for a standard method of sampling from a lot (ISO 7002: 1986, Сельскохозяйственные продукты питания - схема стандартных методов отбора образцов из партии)

[11] ISO Guide 30:1992, Terms and definitions used in connection with reference materials (ИСО Руководство 30:1992* Термины и определения, применяемые в области стандартных образцов)

[12] ISO/TS 21098, Foodstuffs - Nucleic acid based methods of analysis of genetically modified organisms and derived products - Information to be supplied and procedure for the addition of methods to ISO 21569, ISO 21570 or ISO 21571 (КО/ТС 21098 Продукты пищевые. Методы исследования генетически модифицированных организмов и продуктов, являющихся их производными, основанные на определении нуклеиновых кислот. Информация, которая должна быть предоставлена, и процедура добавления методов к ISO 21569, ISO 21570 или ISO 21571)

УДК 579.672:637.065:006.354

МКС 67.040

IDT

Ключевые слова: пищевые продукты, методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов, корма для животных, семена, общие требования и определения

Электронный текст документа
подготовлен АО "Кодекс" и сверен по:
сайт Национального фонда технических
правовых нормативных актов
www.tnra.by
по состоянию на 18.04.2022