
**ЕВРАЗИЙСКИЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И
СЕРТИФИКАЦИИ(EACС)**

**EURO-ASIAN COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND
CERTIFICATION(EASC)**



**МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ**

ГОСТ
*(проект,
первая редакция)*

**ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР,
ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРОКОПЧЁНЫХ
КОЛБАС И СЫРОВЯЛЕННОЙ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ**

Общие требования

Настоящий проект стандарта не подлежит применению до его утверждения

Москва
Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации
2016

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

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, применения, обновления и отмены».

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности имени В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандартом)

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № от)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК(ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК(ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
--	-----------------------------------	---

4 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.

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в указателе (каталоге) «Межгосударственные стандарты», а текст этих изменений – в информационных указателях «Межгосударственные стандарты». В случае пересмотра или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Межгосударственные стандарты».

Исключительное право официального опубликования настоящего стандарта на территории указанных выше государств принадлежит национальным (государственным) органам по стандартизации этих государств.

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	3
4 Общие положения	3
5 Требования к условиям проведения испытаний	4
6 Требования к персоналу	5
7 Требования безопасности	5
8 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы	5
9 Отбор проб, их транспортирование и хранение, подготовка к анализу	7
10 Выделение ДНК	9
10.1 Высвобождение и очистка ДНК	9
10.2 Качество и количество ДНК, условия хранения	10
11 Проведение ПЦР в реальном времени	10
11.1 ПЦР в реальном времени	10
11.2 Контроль процедуры испытаний	11
11.3 Подтверждение результатов	11
11.4 Основные требования к ПЦР в реальном времени	12
11.4 Требования к дизайну праймеров	12
11.5 Подтверждение специфичности праймеров	13
12 Обработка и оформление результатов	13
12.1 Обработка результатов	13
12.2 Оформление результатов	13
Приложение А (рекомендуемое) Последовательности генов «домашнего хозяйства» целевых видов микроорганизмов, рекомендуемые для подбора праймеров и зондов	15

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРОКОПЧЁНЫХ КОЛБАС И СЫРОВЯЛЕ-НОЙ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Общие требования

Species-specific identification of starter cultures used in the production of fer-mented sausages and jerked meat products. General requirements

Дата введения –

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на сырокопчёные и сыровяленые мясные изделия и устанавливает общие требования к проведению видовой идентификации стартовых культур, используемых при их производстве, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Настоящий стандарт может быть также применён для исследования бактериальных препаратов и изолированных из них культур целевых микроорганизмов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность общие требования

ГОСТ 12.1.005–88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

ГОСТ 12.4.009-83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.1.019–79* Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.1.021–75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ OIMLR 76–1–2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ISO 3696–2013** Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы контроля

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147–80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9792–73 Колбасные изделия и продукты из свинины, баранины, говядины и мяса других видов убойных животных и птиц. Правила приемки и методы отбора проб

ГОСТ ISO 16140–2011 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов

ГОСТ ISO 20837–2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Требования к подготовке образцов для качественного обнаружения

ГОСТ 31719–2012 Продукты пищевые и корма. Экспресс-метод определения сырьевого состава (молекулярный)

* В Российской Федерации действует ГОСТ Р 12.1.019–2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

** В Российской Федерации действует ГОСТ Р 52501–2005 (ИСО 3696:1987) «Вода для лабораторного анализа. Технические условия».

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории государства по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом, следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ 31719 и ГОСТ ISO 20837, а также следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 интеркалирующий краситель: Флюоресцентный краситель, интеркалирующий в двуцепочечные молекулы ДНК.

3.2 гены домашнего хозяйства: Гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне.

4 Общие положения

4.1 Идентификацию стартовых культур, используемых при производстве сырокопченые и сыровяленые мясные изделия, проводят с целью установления их видовой принадлежности.

4.2 Идентификация основана на выявлении при помощи ПЦР фрагментов ДНК, присутствие которых в анализируемой пробе однозначно свидетельствует о наличии в ней целевого микроорганизма.

4.3 Определение стартовых культур состоит из следующих последовательных этапов:

- а) выделение ДНК в результате клеточного лизиса и очистка;
- б) ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров.

4.4 ПЦР в реальном времени состоит из трех этапов:

- а) денатурация двуцепочечной ДНК (дцДНК);
- б) отжиг праймеров на комплементарной целевой последовательности;

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

в) элонгация гибридизовавшихся праймеров с помощью термостабильной ДНК-полимеразы.

П р и м е ч а н и е – Этапы б) и в) могут быть объединены в один в зависимости от свойств ДНК-полимеразы.

5 Требования к условиям проведения испытаний

5.1 Основным требованием к организации работы в лаборатории является обеспечение физического разделения ДНК из анализируемых проб и амплифицированной ДНК, полученной в ходе ПЦР. Случайная контаминация ДНК может возникать от пыли и распределения аэрозолей. Поэтому организация рабочей зоны в лаборатории и системы управления качеством должны основываться:

а) на систематическом выполнении всех методологических этапов, связанных с получением результатов;

б) на принципе «прямого потока» при проведении испытаний.

5.2 Для предотвращения контаминации реакционной смеси амплифицированными в предыдущих ПЦР целевыми последовательностями ПЦР-лаборатория должна иметь отдельные рабочие зоны с собственными комплектами оборудования:

- зона приема и регистрации;
- зона первичной обработки проб;
- зона выделения ДНК;
- зона для приготовления реакционных смесей (при необходимости);
- зона проведения ПЦР.

5.3 Каждая зона ПЦР-лаборатории должна быть оснащена индивидуальным набором соответствующего лабораторного оборудования, расходных материалов и рабочей одежды. Допускается использование одноразовой одежды и одноразовых перчаток.

5.4 Деконтаминация

Керамическую посуду и инструменты из нержавеющей стали деконтаминируют сухим жаром при 160°C в течение 2 ч.

Дистиллированную воду стерилизуют автоклавированием при температуре 121°C в течение 30 мин.

5.5 Утилизацию отходов и их деkontаминацию проводят в установленном порядке.

6 Требования к персоналу

6.1 Персонал, участвующий в проведении исследований, должен иметь соответствующее специальное образование.

6.2. Персонал допускается к работе после прохождения специальной подготовки и инструктажа по соблюдению техники безопасности.

7 Требования безопасности

7.1 Помещение, в котором проводятся испытания, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

7.2 Работу необходимо проводить, соблюдая правила личной гигиены и противопожарной безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.004, и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

7.3 При работе с электроприборами необходимо соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.019.

7.4 При подготовке и проведении испытаний необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007.

8 Средства измерений, вспомогательное оборудование, материалы и реактивы

Весы неавтоматического действия по ГОСТ OIMLR 76-1 специального или высокого класса точности с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более $\pm 0,001$ г.

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

Микропробирки полипропиленовые конические вместимостью 1,5 см³ с крышкой.

Перчатки резиновые или латексные неопудренные.

Пробирки пластиковые вместимостью 15 см³ с крышкой.

Шпатели одноразовые

Ступки фарфоровые с пестиком по ГОСТ 9147.

Оксид алюминия, ч.д.а..

Амплификатор для ПЦР в реальном времени.

Дозаторы автоматические одноканальные с переменным объемом. Должны быть поверены по показателям предела относительной погрешности и предела среднеквадратичного отклонения.

Наконечники к дозаторам автоматическим с аэрозольными барьерами, свободными от ДНКаз и РНКаз.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Вода для лабораторного анализа по ГОСТ ISO 3696 первой степени очистки, свободная от ДНКаз и РНКаз.

Наборы реагентов для амплификации-ПЦР:

- ДНК-полимераза. Термостабильная полимераза, используемая для ПЦР, представляет из себя очищенный фермент или рекомбинантную форму данного фермента. Её использовать и хранить в соответствующих условиях (состав буфера, температура, и т.д.) согласно инструкции производителя;

- реакционный буфер. Должен соответствовать требованиям для ДНК полимеразы (7.1), допускается использовать коммерческий, готовый к использованию буфер. Реагенты, используемые для его приготовления, должны быть стабильны в условиях хранения и в течение реакции амплификации;

- дезоксирибонуклеозид трифосфаты (dNTP) для ПЦР. Растворы, содержащие соответствующую концентрацию dATP, dCTP, dGTP, dTTP и/или dUTP. Они должны быть стабильны в условиях хранения и реакции амплификации. Допускается применение коммерческих растворов;

- смесь праймеров и зондов. Праймеры и зонды должны быть подобраны по целевым последовательностям генов исследуемого микроорганизма. Рекоменду-

емые целевые последовательности приведены в приложении Б (рекомендательное)

- хлорид магния. Может быть использован как отдельный раствор и/или входить в состав реакционного буфера;

- интеркалирующие красители. Могут быть использованы как отдельный раствор или входить в состав реакционного буфера;

Положительный контрольный образец (K+), содержащий целевую последовательность ДНК исследуемых микроорганизмов;

Отрицательный контрольный образец (K-), не содержащий целевой последовательности ДНК исследуемых микроорганизмов;

П р и м е ч а н и е – Для проведения испытаний следует использовать чистые для анализа реактивы. Растворы реактивов для проведения ПЦР рекомендуется готовить заранее и хранить при температуре – 20°C.

Дезинфицирующие растворы, вызывающие деградацию ДНК для обработки полов и стен лаборатории, а также рабочих поверхностей лабораторной мебели, рекомендуется использовать хлорсодержащие препараты.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и вспомогательного оборудования с техническими характеристиками не хуже, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных в настоящем стандарте.

9 Отбор проб, их транспортирование и хранение, подготовка к анализу

9.1 Отбор проб

9.1.1 Отбор проб сырокопченых колбас и сыровяленой мясной продукции проводят по ГОСТ 9792.

9.1.2 Отбор проб стартовых культур производят в количестве не менее трех упаковочных единиц от партии.

9.1.3 Отбор проб проводят таким образом, чтобы не происходила перекрестная контаминация (загрязнение одного образца другим). Для этого отбор проб про-

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

водят в перчатках, а инструменты, применяемые для отбора и измельчения пробы, используют однократно или после очистки, мойки и деkontаминации. Отбор проб производят в пластиковую посуду или одноразовые пластиковые пакеты.

9.1.4 Каждую отобранную пробу маркируют этикетками с указанием наименования продукта, предприятия изготовителя, номера партии, даты отбора проб, цели исследования, подписей лиц, отбиравших пробу.

9.1.5 Обобранные пробы, предназначенные для исследования вне предприятия-изготовителя, пломбируют и опечатывают печатью организации, отвечающей за контролируемую продукцию, и транспортируют в лабораторию.

9.1.6 Транспортирование проб осуществляется при температуре, рекомендованной для их хранения. Длительность транспортирования не должна превышать срока годности исследуемого материала. При невозможности доставки пробы в течение срока годности продукта или при исследовании пробы продукции, отобранной в течение производственного цикла до готовности допускается ее замораживание.

9.1.7 Пробы исследуемого материала хранят в течение 1 мес (при необходимости повторного анализа), согласно условиям, указанным производителем или при температуре минус $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$.

9.2 Подготовка проб (первичная обработка)

9.2.1 Подготовка проб проводят в условиях ПЦР-лаборатории в зоне первичной обработки проб.

9.2.2 При исследовании сырокопченых колбас и сыровяленой мясной продукции от поступившего на исследование образца отбирают не менее 10 навесок (по 5 – 10 г каждая) и измельчают в фарфоровой ступке с добавлением оксида алюминия, массой не более 15% от массы навески. Измельченный материал помещают в одноразовый полиэтиленовый пакет размером 20 × 30 см, перемешивают, формируя объединенную пробу (50 – 100 г). Затем от гомогенной средней пробы одноразовым шпателем отбирают 30 – 60 мг материала, помещают в одноразовую микропробирку вместимостью 1,5 см³ с целью получения лабораторной пробы для выделения ДНК и маркируют.

9.2.3 Допускается для проведения исследований использовать выделенные изолированные колонии микроорганизмов, полученные на плотных дифференциально-диагностических средах в результате микробиологического анализа данного образца продукта. Для этого отбирают изолированную колонию с дифференциально-диагностической среды, суспендируют ее в одноразовой микропробирке вместимостью 1,5 см³ с 200 мкл стерильной дистиллированной воды и маркируют.

9.2.4 При исследовании бактериальных препаратов от каждой упаковочной единицы отбирают по 5 г препарата в одноразовый полиэтиленовый пакет размером 20 × 30 см делают первичное десятикратное разведение, используя стерильную дистиллированную воду в качестве растворителя.

9.2.5 Микропробирки с лабораторными пробами маркируют номером, нанесенным на пробирки (контейнеры) со средними пробами. После получения лабораторных проб пробирки (контейнеры) с оставшимися средними пробами хранят в течение 1 мес в условиях, указанных производителем исследуемого материала

9.2.5 Микропробирки с лабораторными пробами маркируют номером, нанесенным на пробирки (контейнеры) со средними пробами. После получения лабораторных проб пробирки (контейнеры) с оставшимися средними пробами помещают на хранение в течение 1 мес в условиях, указанных производителем исследуемого материала.

10 Выделение ДНК

10.1 Высвобождение и очистка ДНК

Допускается комбинация нескольких принципов выделения ДНК. Для выделения ДНК из сырокопчёных колбас (продуктов с высокой жирностью) необходимо использовать протоколы выделения, включающие в себя этап обработки лизата хлороформом.

Для выделения ДНК могут быть использованы и другие методы, включая имеющиеся в продаже наборы реагентов, а также роботизированные станции выделения нуклеиновых кислот, при условии, что получаемые результаты сравнимы.

10.2 Качество и количество ДНК, условия хранения

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

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

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

В целом следует избегать повторных замораживания размораживания растворов ДНК.

Для хранения ДНК с низким количеством копий используют подходящую пластиковую посуду.

11 Проведение ПЦР в реальном времени

11.1 ПЦР в реальном времени

Раствор нуклеиновых кислот добавляют в реакционную смесь и выполняют остальные этапы ПЦР с использованием соответствующих профиля температура-время и количества циклов для системы праймеров и реакционной смеси, используемых в соответствии с методом. Отсутствие ингибирования ПЦР должно быть подтверждено использованием соответствующих контролей (например, внутреннего положительного контроля). Амплификация ДНК – циклический процесс, состоящий из следующих этапов:

а) После денатурации двуцепочечной ДНК два однонуклеотидных праймера отжигаются (гибридизируются) на целевой амплифицируемый сегмент.

б) Двуцепочечные участки формируются в результате специфического соединения оснований между праймерами и целевой последовательностью, ограни-

чивающими амплифицируемый сегмент ДНК и выполняющими роль позиций начала синтеза ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы.

в) Повторяющийся циклический процесс тепловой денатурации, отжига праймеров и синтеза ДНК приводит к практически экспоненциальной амплификации ограниченного праймерами сегмента ДНК.

Детекция продуктов амплификации при постановке ПЦР в реальном времени проводится методом измерения флуоресценции интеркалирующих красителей, или флуоресцентных меток ДНК-зондов в процессе амплификации.

11.2 Контроль процедуры испытаний

Контроли, необходимые для обнаружения целевых микроорганизмов в сырокопчёных колбасах и сыровяленой мясной продукции методом ПЦР в реальном времени, перечислены в таблице 1.

Если один из основных контролей не дал ожидаемых результатов, то в процедуру испытаний следует включать дополнительные контроли (периодически или в каждую реакцию).

Т а б л и ц а 1

Наименование этапа	Отрицательный контроль выделения	Внутренний контроль амплификации ^а	Положительный контроль ПЦР ^б	Отрицательный контроль ПЦР ^б
Выделение ДНК	+	-	-	-
Амплификация	+	+	+	+
Обнаружение	+	+	+	+
^а Внутренний контроль амплификации может быть использован опционально ^б Контроль необходим для каждой партии проб в амплификаторе Примечание – Знак «+» означает, что на данном этапе используют контроль, знак «-» – не используют.				

11.3 Подтверждение результатов

Подтверждением результатов амплификации с использованием интеркалирующих красителей является постановка анализа плавления с последующим сравнением пиков производных кривых плавления образцов против пика производной кривой плавления положительного контроля.

11.4 Основные требования к ПЦР в реальном времени

Условия реакции и параметры циклов должны быть оптимизированы для каждой пары праймеров или систем праймер-зонд. В случае, когда ПЦР ставится в первый раз, следует убедиться, что условия реакции обеспечивают достижения предел обнаружения. Предел обнаружения для ПЦР – это минимальное количество целевой ДНК, необходимой для получения сигнала в течение минимум 40 циклов амплификации. По возможности, предел обнаружения должен составлять не более 100 копий целевой ДНК в объёме реакционной смеси.

По возможности, нужно достигать максимальной специфичности реакции, например применяя ПЦР с горячим стартом. Данный метод повышает специфичность за счёт снижения побочных реакций, таких как амплификация нецелевых последовательностей, образование димеров праймеров и т.д..

11.5 Требования к дизайну праймеров

Так как эффективность каждой специфичной ПЦР должна быть сопоставима с другими специфичными ПЦР необходимо следовать ряду условий в ходе дизайна праймеров:

- а) длина каждого праймера должна находиться в пределах от 18 до 30 bp;
- б) Соотношение GC:AT в составе праймеров должно быть приближено к 50:50;
- в) Не должно встречаться на отдельных участках праймеров идущих подряд G и C;
- г) Следует избегать комплиментарности праймеров и зонда по 3' концу, во избежание образования димеров;
- д) Не должно образовываться внутренних вторичных структур («шпикл»).

Для дизайна праймеров используют доступное программное обеспечение, в том числе имеющееся в он-лайн доступе. Последовательности генов, по которым возможно производить подбор праймеров приведены в приложении А (рекомендательное)

11.6 Подтверждение специфичности праймеров

Необходимо подтверждать способность праймеров обнаруживать целевую последовательность ДНК.

Специфичность праймеров может быть оценена теоретически или эмпирически. Желательно использовать оба подхода.

11.5.1 Теоретическая оценка должна проводиться сравнением последовательности праймера с геномами, в имеющихся открытых базах данных, например: в базе данных NCBI с использованием он-лайн программы BLAST-online.

11.5.2 Эмпирическая оценка проводится путём постановки ПЦР с использованием тестируемых праймеров и ДНК родственных целевому микроорганизмов. Требования к подтверждению специфичности праймеров к целевым видам микроорганизмов следует проводить по ГОСТ ISO 16140.

12 Обработка и оформление результатов

12.1 Обработка результатов

Интерпретация возможна, если результаты, описанные в 10.2 не противоречат друг другу.

Результаты ПЦР и их интерпретация приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Анализируемая проба	Положительный контроль ПЦР	Отрицательный контроль выделения	Внутренний контроль амплификации	Интерпретация результатов
+	+	-	+/-	Положительный
-	+	-	+	Отрицательный
-	+	+	+/-	Неоднозначный ^а
-	+	-	-	Неоднозначный ^б

^а Возможна контаминация
^б Возможно ингибирование

Примечание – Знак «+» означает, что обнаружен ПЦР-продукт, знак «-» – не обнаружен ПЦР-продукт, знак «+/-» – результат контроля не соответствует ожидаемому .

12.2 Оформление результатов

Протокол испытаний должен включать в себя следующую информацию:

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

- а) полную информацию, необходимую для идентификации лабораторной пробы;
- б) любую конкретную информацию, относящуюся к лабораторной пробе (например, недостаточное количество, плохое состояние);
- в) ссылку на использованный стандарт и методы анализа;
- г) дату приёма пробы на испытание;
- д) условия хранения;
- е) дату начала/окончания анализа;
- ж) информацию об ответственном исполнителе испытаний;
- и) размер анализированной порции;
- к) результаты испытаний;
- л) любые конкретные замечания, возникшие в ходе анализа;
- м) любые отклонения, добавления или изменения

Приложение А
(рекомендуемое)

Последовательности генов «домашнего хозяйства» целевых видов микроорганизмов, рекомендуемые для подбора праймеров и зондов

А.1 Общие положения

В данном разделе приведены прочтения генов «домашнего хозяйства», рекомендуемых для дизайна видоспецифических праймеров. Перечислены прочтения только для тех видов, для которых в базе данных NCBI есть референсные сиквенсы.

В случае отсутствия в международных базах данных референсных сиквенсов для иных видов микроорганизмов возможно использовать прочие (неподтверждённые) прочтения соответствующих генов.

Для подбора видоспецифических праймеров нами рекомендуется использовать следующие гены: ген рекомбиназы субъединица α (*recA*), ген гиразы субъединица β (*gyrB*).

А.1.1 *Lactobacillus sakei*

Референсный сиквенс – *Lactobacillus sakei* strain 23K complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_007576.1. Ген *recA*

```
TTGGCTAAAGATGAAAGACAAGCAGCACTTGATGCTGCCCTAAAGAAGATTGAAAAG
AATTTTGGTAAAGGTTCAATTATGCGAATGGGTGAAAAGGTTGATACACAAGTCTCAACAGT
TTCATCTGGTTCATTGGCATTGGACGAAGCGCTCGGAGTAGGTGGTTATCCTCGCGGCCG
GATCGTTGAAATTTACGGTCCTGAAAGTTCAGGTAACAACCGTTGCGTTACATGCTGTT
GCAGAAGTGCAAAAGCAAGGTGGAACGGCTGCTTATATCGATGCTGAAAATGCGATGGAT
CCTAAGTATGCAACAGCACTTGGCGTTAATATTGATGACTTACTCTTGTCAACAACCTGATAC
TGGTGAACAAGGCTTAGAAATTGCTGATGCCTTGGTATCAAGTGGGGCCGTTGATATTTTA
GTTGTGCGATTCAGTTGCTGCTTTGGTACCACGTGCTGAAATCGAAGGCGAAATGGGTGAC
GCCACGTTGGCTTACAAGCCCGTTTGATGTCACAAGCCTTACGTAAATTATCAGGGACGA
TTAATAAGACGAAGACGATTGCGTTATTCATTAACCAAATTCGTGAAAAGTCGGCGTGATG
TTTGGTAACCCCGAAGTCACACCAGGTGGTCGTGCTTTGAAGTTCTACTCAACTGTTCCGGC
TTGAAGTGCGTCGTGCTGAAACCATCAAAAATGGGACAGATATGATTGGGAACCGGGCCC
GAATCAAAGTCGTTAAGAATAAGGTTGCGCCACCATTTAAGGTGCGCTGAAGTTGATATCAT
GTACGGTCAAGGGATTTCCAGAACCGGTGAATTGGTTGATATGGCGGTGCAAAAAGACATT
ATCAATAAGAGTGGTTCTTGGTACTCTTATGGCTCAGAACGAATTGGCCAAGGGCGAGAAA
```

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

ATGCTAAGAACTATTTGGCTGATCACGAAGATGTCTGAAGATGAAGTTCGTTTGAAGGTCAG
AGCAGCTTATGGTATTTTTCAGATGTACCTGAAGAAGATCTCCCAACAACCTGAAGATGAACAA
ATAAATATTTTACCAGATGATTCAACAGAAGAATAA

A.1.2 *Lactobacillus plantarum*

Референсный сиквенс – *Lactobacillus plantarum* WCFS1, complete genome. NCBI Reference Sequence: NC_004567.2 Ген recA

СТАТТТТТTCGGTTGGTTGGTTCGCCGAGATCGAGAGCAGTTTCCGCTGGTGTCTGCTTT
AGTGGACTTACTTTGACCTTTACTGCCATTCTTAGCAGTTCCCTTATCCTTAGCTTCTTTGG
CCTGATCATCAGTTTCAGACGTTTCTTACCAGTTGCATCCATAACCGTATGCATCACGAACC
TTTTGGCGAATCTCCGTCATGACATCAGGATGCTCGTCCAATACTTCTTGGCATTTTTACG
GCCTTGACCAATGCGATCGTCACCATATGAATACCAAGAACCACTCTTCTTAACAATATCCT
TTTCAGCAGCCATATCAACAATTTACCAGTTTGTGAGATACCTTGACCATACATGATATCC
ACTTCGGCACGCTTAAATGGCGGTGCAACCTTGTTCTTAACGACTTTGATCCGGACACGGT
TACCAATAATATTGGTTCCTTCCCTTGATCTGTTCTGCCCGCCGTACTTCCAACGAATCGTG
GCGTAAAATTTCAAGGCCCGACCACCAGGAGTCGTTTCAGGATTACCAAACATCACACCAA
CTTTTTCACGAATTTGATTGATAAATAACGCGATTGTCTTGGTTTTGTTCAATGTCCCTGATA
ACTTCCGGAGCGCTTGTGACATCAGCCGCGCTTGTAAACCAACGTGTGCGTCACCCATTT
CACCTTCAATTTTCGGCACGTGGCACTAAGGCCGCCACCGAGTCAACAACCTAAAATATCGAC
CGCACCACTGGAAACTAAGGCATCTGCAATTTCAAGCCCTTGTTACCAGTATCTGGTTGC
GAAAGTAACAGGTCATCAATGTTGACCCCTAGGTGTTCCGCATAAACGGGGTCTAGTGCGT
TTTCAGCATCGATATAGGCCGCCGTACCACCCTGCTTTTGAACCTTCAGCAACCGCATGTAG
TGCCACGGTCGTTTTACCTGAACTTTTCAAGACCGTAGATTTCCACGATCCGACCACGTGGG
TAGCCGCCGACACCCAACGCGTCATCTAAGGCCAACGATCCACTTGAAATCGTTGAAATAG
TCGTCTGGGCAGCGTCACC

A.1.3 *Staphylococcus carnosus*

Референсный сиквенс – *Staphylococcus carnosus* subsp. *carnosus* TM300 complete genom, NCBI Reference Sequence: NC_012121.1. Ген gyrB

TAGAAATCCAAGTTCGCATATACAGCGTTGTCTTCGATGAATTGTCTACGATTTTCAA
CCACATCGCCCATCAACATTTCAAATGTCGTATCCGCTTCAATCGCATCTTCTAATGTAAC
TGAAGCATTGAACGGTGTCTGGGTTCAATTGTTGTTTCCATAATTGGTCAGCATCCATTT
TCCTAACCTTTATAACGAGAGATTGACCATTTTGGTGTGGTTTCAATTCTGATTTTAATTT
TTCCAATTCTTTTCGTTGAAGACATAATATTTTGTGTTGCCTTGTGTCAATTTGAACAATGG
CGGCTGTGCAATATAACATATCCTGCTTCAATCAACGGGCGCATAAAGCGGTAGAAGAAT
GTTAACAAGAGTGTCTGATATGGGCACCGTCGACATCGGCATCTGTCATAATAACGATTTT

ATGATAACGTGCTTTAGAAATATCAAATTCTCCGCCGATTCTGTACCGAATGCAGTAATCA
TTGAGCGGATTTCAATTATTATTTAAAATTCTGTCTAAGCGTGATTTTTCAACGTTCAAGATCT
TACCGCGCAATGGTAAAATCGCTTGTGTTCTAGAGTCACGTCCAAGTTTTGTAGACCCTCC
GGCAGAGTCACCTTCGACTAAGAAGATTTCACTTTCTTCAGGGTTTTTACTTGAGCAGTCTG
CTAATTTACCAGGTAAGCTGGAACTTCTAAAGCAGATTTTCTACGTGTTACTTCACGTGCT
TTTTTAGCTGCAATACGTGCACGAGAAGCCATCAGACCTTTTTCGATAATAATACGTGCAAC
TTGCGGATGTTCATACAAGAAACGTTCCATATCTTCAGCGGAAAGTCTGTCTACAATCTGAC
GTAATTCAGAGTTGCCGAGTTTTGTTTTGTTTGTCTTCGAACTGAGGATCTTCGTGTTTG
ATTGAGACAATTGCTGTCATACCTTCACGTGTATCTTCACCAGACAAACGTTCTTTATCCTC
TTTGATTAACCTGATTTTGTACCATAGCTGTTTAAACACACGTGTTAAGGCGCGTTTGAAGC
CATCTTCATGCGTTCCGCCTTCGTAAGTGTGAATGTTATTCGCATAAGATAATAAGTTTGT
GTGAAGCCGCTATTATATTGAATTGCGATTTCAACTTCTACATCATCTTTACGATCATGAACA
TATACAGGTTTCATCAAATAAAGGTTCTTTATTTTCATTCAATAATTCTACGTAAGACTTAATAC
CGCCTTCATAGTGGTATGAATCTTCGCGAATATTATCTTCATCACGTTTCATCACGTAAAGAG
ATTTGAATGCCTTTATTCAAGAAAGCCAATTCTCTAATACGTTTTTGTAACTTTCGTATTGG
TAAGTCGTTGTTTCTGTAAAAATTTCAAGGATCGGCTTTGAAACGGATTTCTGTACCGTTATG
TTCTGTTTCGCCGATGACTTTCAAATCATATTGCGGAATACCGCGTTTATAAGCTTGATTAT
AAATTTTATTATTTTCGGTGAACATAGACTTCTAAGTCTTCTGATAGTGCGTTTACAACAGATG
AACCTACACCATGCAATCCACCTGAACTTTGTATCCGCCGCCGCGCAATTTACCTCCGGC
ATGTAAAACAGTTAAGATAACTTCAACTGCAGGACGTCCCATTTTTTTCTTGAATATCAACAG
GAATACCACGTCCGTTATCTGTTACTCGAATCCAATTATCTTTTTCGATAATGACTTCGATTT
TATCAGCATAGCCAGCTAATGCTTCGTCAATACTATTGTCCACAATTTCCCAAATAAATGG
TGCAGACCTCTTTCTGAAGTTGAACCAATATACATACCTGGTCGCTTACGAACCGCTTCAA
GTCCTTCTAAAACCTTGAATTTGTCCAGCACCATATTTTCCGTGTTGTTACATCTGACAAT

A.1.4 *Pediococcus pentosaceus*

Референсный сиквенс – *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745, complete genome NCBI, Reference Sequence: NC_008525.11. Ген *gyrB*

TTGGCAGACGAAAAAGAAACGAAAGCAGAATTAGCCAGAGAATATGATGCGA
GTCAAATTCAGGTTTTAGAGGGGCTCGAAGCAGTTCGTAAACGCCAGGGATGTAT
ATTGGGTCGACTAGTTCTCAAGGACTACACCATTTGGTTTGGGAAATTATTGATAAT
GGTATTGATGAAGCTCTTGCAGGATTTGCAGACAAAATTGATGTGATCGTTGAAAAA
GACAATAGCATTACCGTCACTGATAATGGACGTGGGATTCCGGTTGATATCCAAAA

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

GAAAАCTGGAAAACCAGCTTTAGAAACAGTCTTTACGGTCCTACATGCCGGAGGTA
AATTCGGCGGTGGCGGTTATAAAGTTTCTGGAGGATTGCATGGTGTGGGTGCATCC
GTTGTAAATGCGTTATCAACGGAATTAGATGCGCGCGTCATGAAGGACGGTAAAAT
CTACTACATTGATTTTTCGCTAGGAAAAGTAAAAACACCGATGAAAACGATTGGTGA
TACTGAACATCCTGACGATCATGGAАCTATTGTTCAТТТTCGTTCCAGATCCAGATAT
TTTCCAAGAAACTACCACATATGACATTAATATCTTAAAAACACGAATTCGTGAATTA
GCCTTTTTGAACAAGGGTCTACGGATTACTTTGAAGGATATGCGTCCTGAAAAGCC
AACTGAAGACGACTTCTTGTACGAAGGTGGGATTCGCCACTACGTTGAАCTTAAA
CGAAGGCAAAGAAGTAATTTTCCCTGAACCTATCTATGTTGAAGGGGTTACAAAAG
GTATCACTGTTGAAGTAGCTATGCAATATATCGAAGGTTATCAAAGTAAATTGTTAAC
TTTTACTAACAATATTCATACCTACGAAGGCGGTACCCACGAAGAAGGTTTCAAACG
TGCTTTAACACGAGTTATTAACGATTACGCTAAAAACAACAATTTTTAAAAGAAAAT
GATGATAAATTGTCTGGTGATGATGTTTCGAGAAGGTTTGACGGCAGTAGTCAGCGT
TAAGCATCCTGATCCTCAATTCGAAGGACAAACGAAAACAAAATTGGGTAACTCAGA
TGCTCGGACAGCTGTTAACGAAGTGTTTGCTGAAACTTTCAATAAATTCTTATTGGA
AAATCCTAAGGTTGCACGTCAAATTGTTGATAAGGGAATCTTGGCAGCAAAGCAC
GAGTTGCCGCTAAACGAGCTCGTGAAGTTACGCGTAAGAAGAGTGGCCTAGAACT
CAATAATCTTCCTGGTAAATTAGCTGATAACTTCTAAGGATCCTTCAATTAGTGAA
TTATTCATTGTCGAGGGTGATTCTGCCGGTGGTAGTGCTAAGTCCGGACGTTCCGCG
TCTCACACAAGCTATTTTGCCAATTCGTGGGAAGATTTTGAACGTTGAAAAGCCAC
TTTGGATCGGGTTTTGGCCAATGAAGAAATTCGTTCACTCTTTACAGCGCTCGGAAC
TGGATTTGGTGAGGACTTTGATGTAAGTAAAGCCAАCTATCATAAATTGATTATCAT
GACCGATGCCGATGTСGATGGTGCTCATATTCGGACACTATTATTGACGCTGTTCT
ATCGTTACATGCGTCCAATGATTGATGCAGGATTTGTTTACATTGCTCAACCACCGC
TCTACCAAGTACGTCAAGGTAAGATGATCCAATATATCGATTCTGATGAAGAATTAG
AAACAGTACTTGGACAATTATCACCATCACCAAAACCTGTAATTCAACGTTATAAAG
GTCTTGGTGAAATGGATGCTGAGCAACTTTGGGAAACAACCATGAATCCAGAAAAT
CGACGCTTGTTACGAGTTTCAGCCGAAGATGCTGATGCTGCAAGTGGTGATTTTGA
AATGTTGATGGGTGACAAGGTTGAACCACGTCGTAAATTCATTGAAGAGAACGCTG
TGTTTGTТАAAAАCTTGGATATCTAA

УДК 57.083.18:637.523:006.354

МКС 67.120.10

Ключевые слова: сырокопчёные мясные изделия, сыровяленые мясные изделия, стартовые культуры, видовая идентификация, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, общие требования.

ГОСТ

(проект, RU, первая редакция)

Разработчики стандарта:

ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»

Директор

А.Б. Лисицын

Заместитель директора
по научной работе

А.А. Семенова

Заместитель директора
по научной работе

О.А. Кузнецова

Руководитель отдела технического
регулирования и систем управления
качеством

З.А. Юрчак

Руководитель направления «ПЦР»

М.Ю. Минаев

Младший научный сотрудник лаборатории
гигиены производства и микробиологии

К.А. Курбаков