

STN	Kvalita vody Detekcia a kvantifikácia <i>Legionella</i> spp. a/alebo <i>Legionella pneumophila</i> metódou koncentrovania a metódou génovej amplifikácie s použitím kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (qPCR)	STN P ISO/TS 12869 75 7855
------------	--	--

Water quality. Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Qualité de l'eau. Détection et quantification de *Legionella* spp. et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)

Wasserbeschaffenheit. Nachweis und Quantifizierung von *Legionella* spp. und/oder *Legionella pneumophila* durch Konzentration und genische Verstärkung mittels Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Táto predbežná norma obsahuje slovenskú verziu ISO/TS 12869: 2012.

This prestandard includes the Slovak version of ISO/TS 12869: 2012.

Táto predbežná STN je určená na overenie. Pripomienky zasielajte Úradu pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo Slovenskej republiky najneskôr do 30. 6. 2015.

119077

Úrad pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo SR, 2014

Podľa zákona č. 264/1999 Z. z. v znení neskorších predpisov sa môžu slovenské technické normy rozmnožovať a rozširovať iba so súhlasom Úradu pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo SR.

Národný predhovor

Normatívne referenčné dokumenty

Nasledujúce dokumenty, celé alebo ich časti, sú v tomto dokumente normatívnymi odkazmi a sú nevyhnutné pri jeho používaní. Pri datovaných odkazoch sa použije len citované vydanie. Pri nedatovaných odkazoch sa použije najnovšie vydanie citovaného dokumentu (vrátane všetkých zmien).

POZNÁMKA. – Ak bola medzinárodná publikácia zmenená spoločnými modifikáciami, čo je indikované označením (mod), použije sa príslušná EN/HD.

ISO 19458 zavedená v STN EN ISO 19458 Kvalita vody. Odber vzoriek na mikrobiologickú analýzu (ISO 19458) (75 7770)

Vypracovanie normy

Spracovateľ: Výskumný ústav vodného hospodárstva Bratislava, RNDr. Miloslava Prokšová, CSc.,
Mgr. Daša Borovská

Technická komisia: TK 27 Kvalita a ochrana vody

Kvalita vody
Detekcia a kvantifikácia *Legionella* spp. a/alebo
***Legionella pneumophila* metódou koncentrovania**
a metódou génovej amplifikácie s použitím
kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (qPCR)

ISO/TS 12869
 Prvé vydanie
 2012-11-01

ICS 07.100.20

Obsah

	strana
Predhovor	5
Úvod	5
1 Predmet normy	6
2 Normatívne odkazy	6
3 Termíny a definície	6
4 Podstata	8
5 Odber vzoriek	8
6 Všeobecné skúšobné podmienky	9
6.1 Všeobecne	9
6.2 Pracovníci	9
6.3 Priestory	9
6.4 Prístroje a spotrebný materiál (okrem činidiel)	9
6.5 Činidlá	10
6.6 Dekontaminácia zariadení a priestorov	11
6.7 Nakladanie s odpadom a jeho zneškodňovanie	12
7 Postup	12
7.1 Koncentrovanie	12
7.2 Extrakcia DNA	12
7.3 Amplifikácia DNA použitím PCR	12
7.4 Kvantitatívna detekcia	14
8 Vyjadrenie výsledkov	16
9 Protokol o skúške	16
10 Technický postup charakterizácie a validácie metódy	17
10.1 Všeobecne	17
10.2 Inkluzivita a exkluzivita sond a primerov	18
10.3 Overenie kalibračnej funkcie kvantitatívnej fázy PCR	18

10.4	Overenie kvantifikačného limitu PCR, LQ_{qPCR}	22
10.5	Overenie detekčného limitu PCR (LD_{qPCR})	23
10.6	Výťažnosť metódy.....	24
10.7	Robustnosť	25
10.8	Neistota celej metódy merania	25
11	Kontrola kvality	26
11.1	Všeobecne	26
11.2	Nadväznosť kalibračného roztoku a referenčného materiálu na primárny štandard	26
11.3	Monitorovanie pracovných charakteristík	28
11.4	Pozitívna a negatívna kontrola metódy.....	28
11.5	Slepý pokus na kontrolu činidiel PCR.....	29
11.6	Kontrola inhibície	29
Príloha A	(informatívna) – Príklad postupu prípravy kvantitatívneho štandardného roztoku DNA	31
Príloha B	(informatívna) – Príklad metódy stanovenia prahového cyklu	32
Príloha C	(informatívna) – Príklad štúdie kalibračnej funkcie kvantitatívnej PCR	33
Príloha D	(informatívna) – Špecifické Studentovo rozdelenie	36
Príloha E	(informatívna) – Príklad hodnotenia výťažnosti	37
Príloha F	(informatívna) – Príklad hodnotenia celkovej neistoty	38
Príloha G	(normatívna) – Hodnotenie pracovných charakteristík metódy validovanej treťou stranou	39
Literatúra	40

Predhovor

ISO (Medzinárodná organizácia pre normalizáciu) je celosvetová federácia národných normalizačných organizácií (členov ISO). Na medzinárodných normách zvyčajne pracujú technické komisie ISO. Každý člen, ktorý sa zaujíma o predmet, pre ktorý sa vytvorila technická komisia, má právo byť zastúpený v tejto komisii. Na práci sa zúčastňujú medzinárodné organizácie, vládne aj mimovládne, s ktorými ISO nadviazala pracovný kontakt. ISO úzko spolupracuje s Medzinárodnou elektrotechnickou komisiou (IEC) na všetkých problémoch, ktoré sa týkajú elektrotechnickej normalizácie.

Medzinárodné normy sa navrhujú podľa pravidiel uvedených v smerniciach ISO/IEC v časti 2.

Hlavnou úlohou technických komisií je príprava medzinárodných noriem. Návrhy medzinárodných noriem prijaté technickými komisiami sa rozosielaajú členom ISO na hlasovanie. Vydanie medzinárodnej normy si vyžaduje súhlas najmenej 75 % z hlasujúcich členov.

Technická komisia môže za určitých okolností, predovšetkým ak existuje naliehavá požiadavka trhu, rozhodnúť, že vydá iný typ normatívneho dokumentu, a to:

- verejne dostupnú špecifikáciu ISO (ISO/PAS), ktorá predstavuje dohodu technických expertov v pracovnej skupine ISO a jej schválenie na vydanie vyžaduje súhlas viac ako 50 % hlasujúcich členov príslušnej technickej komisie;
- technickú špecifikáciu ISO (ISO/TS), ktorá predstavuje dohodu členov technickej komisie a jej schválenie na vydanie vyžaduje súhlas 2/3 hlasujúcich členov technickej komisie.

ISO/PAS a ISO/TS sa revidujú po troch rokoch, aby sa rozhodlo, či sa ich platnosť potvrdí na ďalšie tri roky, či sa budú revidovať a vydajú sa ako medzinárodná norma, alebo sa zrušia. Ak sa platnosť ISO/PAS alebo ISO/TS potvrdí, revidujú sa zase o ďalšie tri roky, keď sa musia buď transformovať na medzinárodnú normu, alebo zrušiť.

Do úvahy treba brať možnosť, že niektoré ustanovenia tohto dokumentu môžu byť predmetom patentových práv. ISO nie je zodpovedná za identifikáciu akýchkoľvek alebo všetkých patentových práv.

ISO/TS 12869 pripravila technická komisia ISO/TC 147 Kvalita vody, subkomisia SC 4, Mikrobiologické metódy.

Úvod

Táto technická špecifikácia opisuje metódu detekcie a kvantifikácie *Legionella* (spp.) a *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) vo vode pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (qPCR).

Prítomnosť *L. pneumophila* alebo *Legionella* spp. vo vzorkách vody sa preukazuje a kvantifikuje pomocou amplifikácie sekvencií DNA (PCR) špecifickými oligonukleotidmi. Špecifickosť detekcie je zaistená použitím fluorescenčne značenej sondy špecifickej pre cieľovú sekvenciu. Nárast množstva amplikónov DNA sa meria a vizualizuje v reálnom čase zariadením na kvantitatívnu PCR s filtrami špecifickými pre použité fluorofory.

Na kvantifikáciu sa používa kalibračná krivka. Tieto pokyny, minimálne požiadavky a pracovné charakteristiky majú zabezpečiť, aby boli výsledky spoľahlivé a reprodukovateľné v rámci rozličných laboratórií.

Táto technická špecifikácia opisuje stanovenie výťažnosti extrakcie DNA. Nepokrýva však úplne pracovné charakteristiky postupu extrakcie (účinnosť lýzy nie je presne stanovená).

UPOZORNENIE. – S *Legionella* spp. môžu bezpečne manipulovať skúsení mikrobiológovia na otvorenom laboratórnom stole v konvenčnom mikrobiologickom laboratóriu so stupňom bezpečnostnej ochrany 2. Infekciu spôsobuje inhalácia organizmov; preto sa odporúča preveriť všetky laboratórne techniky, či sa pri ich používaní netvorí aerosóly. V prípade pochybností sa pracuje v bezpečnostnom boxe.

1 Predmet normy

Táto technická špecifikácia opisuje metódu detekcie a kvantifikácie *Legionella* spp. a *L. pneumophila* pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie (qPCR). Špecifikuje všeobecné metodologické požiadavky, požiadavky na pracovné charakteristiky a požiadavky na kontrolu kvality.

Technické podrobnosti sa v tejto technickej špecifikácii uvádzajú len na informáciu. Všetky technické riešenia, ktoré spĺňajú uvedené požiadavky na pracovné charakteristiky, sú vyhovujúce.

POZNÁMKA. – Požiadavky na pracovné charakteristiky pozri v kapitole 10.

Táto technická špecifikácia je určená na bakteriologickú analýzu všetkých typov vôd (teplých aj studených), ak charakter a/alebo množstvo suspendovaných látok a/alebo sprievodnej flóry neruší stanovenie. Tieto interferencie môžu negatívne ovplyvniť detekčný aj kvantifikačný limit.

Výsledky sa vyjadrujú ako počet genómových jednotiek *Legionella* spp. a/alebo *L. pneumophila* na liter vzorky.

Metóda opísaná v tejto technickej špecifikácii je použiteľná na všetky typy vôd. Niektoré prídavné látky, napríklad chemikálie používané na úpravu vody, môžu rušiť a/alebo ovplyvňovať citlivosť metódy.

Metódy qPCR nerozlišujú živé a mŕtve bunky.

2 Normatívne odkazy

Nasledujúce dokumenty, celé alebo ich časti, sú v tomto dokumente normatívnymi odkazmi a sú nevyhnutné pri jeho používaní. Pri datovaných odkazoch sa použije len citované vydanie. Pri nedatovaných odkazoch sa použije posledné vydanie citovaného dokumentu (vrátane všetkých zmien).

ISO 19458 *Water quality – Sampling for microbiological analysis*. [Kvalita vody. Odber vzoriek na mikrobiologickú analýzu.]

koniec náhľadu – text ďalej pokračuje v platenej verzii STN