

STN	Kvalita vody Detekcia a kvantifikácia <i>Legionella</i> spp. a/alebo <i>Legionella pneumophila</i> metódou koncentrovania a 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: 2019.

This prestandard includes the Slovak version of ISO/TS 12869: 2019.

Nahradenie predchádzajúcich noriem

Táto predbežná norma nahrádza STN P ISO/TS 12869 z augusta 2014 v celom rozsahu.

132390

Úrad pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo Slovenskej republiky, 2021

Slovenská technická norma a technická normalizačná informácia je chránená zákonom č. 60/2018 Z. z. o technickej normalizácii.

Národný predhovor

Obrázky v tejto norme sú prevzaté z elektronických podkladov dodaných z ISO, © 2019 ISO, ref. č. ISO/TS 12869: 2019 E.

Norma obsahuje dve národné poznámky.

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

POZNÁMKA 2. – Aktuálne informácie o platných a zrušených STN možno získať na webovej stránke www.unms.sk.

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, Mgr. Daša Borovská

Technická komisia: TK 27 Kvalita a ochrana vody

Obsah

	strana
Predhovor	6
Úvod	7
1 Predmet normy	8
2 Normatívne odkazy	8
3 Termíny, definície, symboly a skratky	8
3.1 Termíny a definície	8
3.2 Symboly a skratky	10
4 Podstata	10
5 Odber vzoriek	10
6 Všeobecné skúšobné podmienky	11
6.1 Všeobecne	11
6.2 Pracovníci	11
6.3 Priestory	11
6.4 Prístroje a spotrebný materiál (okrem činidiel)	12
6.4.1 Prístroje	12
6.4.2 Spotrebný materiál	12
6.4.3 Koncentrovanie	12
6.4.4 Extrakcia a PCR (detekcia a kvantifikácia)	12
6.5 Činidlá	12
6.5.1 Všeobecne	12
6.5.2 Činidlá PCR	13
6.5.3 Iné činidlá	13
6.6 Dekontaminácia zariadení a priestorov	14
6.7 Nakladanie s odpadom a jeho zneškodňovanie	14
7 Postup	14
7.1 Koncentrovanie	14
7.2 Extrakcia DNA	14
7.2.1 Všeobecne	14
7.2.2 Postupy	14
7.2.3 Stabilita extraktov DNA	14
7.3 Amplifikácia DNA použitím PCR	15
7.3.1 Všeobecne	15
7.3.2 Cieľové sekvencie, priméry a sondy	15
7.3.3 Príprava amplifikačnej zmesi	17
7.4 Kvantitatívna detekcia	17

7.4.1	Všeobecne	17
7.4.2	PCR protokol.....	18
7.5	Kvalitatívna detekcia	19
8	Vyjadrenie výsledkov	19
9	Technický postup charakterizácie a validácie metódy.....	21
9.1	Všeobecne	21
9.2	Inkluzivita a exkluzivita sond a primérov.....	21
9.3	Overenie kalibračnej funkcie kvantitatívnej fázy PCR	22
9.3.1	Všeobecne	22
9.3.2	Princíp overenia kalibračnej krivky	22
9.3.3	Postup hodnotenia kalibračnej krivky	22
9.3.4	Analýza výsledkov	23
9.3.5	Použitie kalibračnej krivky.....	26
9.4	Overenie kvantifikačného limitu PCR, LQ_{qPCR}	26
9.4.1	Podstata	26
9.4.2	Priebeh experimentu.....	26
9.4.3	Analýza výsledkov	26
9.4.4	Teoretický kvantifikačný limit celej metódy	28
9.5	Overenie detekčného limitu PCR (LD_{qPCR})	28
9.6	Výťažnosť metódy.....	28
9.6.1	Podstata	28
9.6.2	Postup	28
9.6.3	Výpočty	29
9.7	Robustnosť	29
9.8	Neistota celej metódy merania	29
10	Kontrola kvality.....	30
10.1	Všeobecne	30
10.2	Nadväznosť kalibračného roztoku a referenčného materiálu na primárny štandard.....	30
10.2.1	Podstata	30
10.2.2	Postup	31
10.2.3	Analýza údajov.....	31
10.3	Monitorovanie pracovných charakteristík	32
10.3.1	Pracovné charakteristiky kalibrácie	32
10.3.2	Monitorovanie pracovných charakteristík na úrovni kvantifikačného limitu	33
10.4	Pozitívna a negatívna kontrola metódy.....	33
10.5	Kontrola bez templátu	33
10.6	Kontrola inhibície	33
10.6.1	Všeobecne	33
10.6.2	Kontrola inhibície s použitím cieľového úseku DNA	33
10.6.3	Kontrola inhibície s použitím plazmidu alebo oligonukleotidu	34

11	Protokol o skúške	35
Príloha A	(informatívna) – Príklad postupu prípravy kvantitatívneho štandardného roztoku DNA	36
Príloha B	(informatívna) – Príklad metódy stanovenia prahového cyklu	37
Príloha C	(informatívna) – Príklad štúdie kalibračnej funkcie kvantitatívnej PCR	38
Príloha D	(informatívna) – Špecifické Studentovo rozdelenie	41
Príloha E	(informatívna) – Príklad hodnotenia výťažnosti	42
Príloha F	(informatívna) – Príklad hodnotenia celkovej neistoty	43
Príloha G	(normatívna) – Hodnotenie pracovných charakteristík metódy validovanej treťou stranou	44
Príloha H	(informatívna) – Medzilaboratórne štúdie	45
Literatúra	48

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

ISO/TS 12869
Druhé vydanie
04-2019

ICS 07.100.20

Predhovor

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

Postupy použité pri tvorbe tohto dokumentu, ako aj tie, ktoré sú určené na jeho ďalšie udržiavanie sú opísané v smernici ISO/IEC, Časť 1. Mali by sa vziať do pozornosti najmä rozdielne kritériá schvaľovania pri rôznych typoch dokumentov ISO. Tento dokument bol vypracovaný podľa edičných pravidiel smernice ISO/IEC, Časť 2. (pozri www.iso.org/directives).

Upozorňuje sa na možnosť, že niektoré časti tohto dokumentu môžu byť predmetom patentových práv. ISO nezodpovedá za identifikáciu ktoréhokoľvek alebo všetkých takýchto patentových práv. Podrobnosti o akýchkoľvek patentových právach identifikovaných počas tvorby dokumentu sú uvedené v úvode dokumentu a/alebo v zozname patentových deklarácií ISO (pozri www.iso.org/patents).

Akákoľvek obchodná značka použitá v tomto dokumente slúži len na informáciu pre používateľa a neznamena jej schválenie organizáciou ISO.

Vysvetlenie princípu dobrovoľného používania noriem, významu špecifických termínov a výrazov ISO súvisiacich s posudzovaním zhody, a aj informácie, ako ISO dodržiava princípy Svetovej obchodnej organizácie (WTO) týkajúce sa technických prekážok obchodu (TBT), možno nájsť na URL: www.iso.org/iso/foreword.html.

Tento dokument pripravila technická komisia ISO/TC 147 *Kvalita vody*, subkomisia CS 4 *Mikrobiologické metódy*.

Toto druhé vydanie ruší a nahrádza prvé vydanie (ISO/TS 12869: 2012), ktoré sa technicky revidovalo. Hlavné zmeny v porovnaní s predchádzajúcim vydaním sú:

- splnenie očakávaní zákazníkov a vládnych organizácií, ktorí čelia riziku legionel;
- aktualizácia informácií o riadení, hlavne o potrebe rýchleho výsledku;
- možnosť používania nových technológií, zatiaľ čo sa sleduje práca rôznych aktérov na vývoji v tomto sektore;
- zohľadnenie spätnej väzby so skúsenosťami laboratórií používajúcich túto metódu od roku 2006;
- doplnenie informácií o vývoji požiadaviek na používanie komerčných kitov validovaných treťou stranou v prílohe G.

Akákoľvek spätná väzba alebo otázky k tomuto dokumentu sa majú adresovať národnému normalizačnému orgánu používateľa. Úplný zoznam týchto orgánov možno nájsť na www.iso.org/members.html.

Úvod

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 fluorofóry.

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.

Tento dokument opisuje stanovenie výťažnosti extrakcie DNA. Nepokrýva však všetky pracovné charakteristiky postupu extrakcie (účinnosť lýzy nie je zohľadnená).

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 aerosól. V prípade pochybností sa pracuje v bezpečnostnom boxe.

1 Predmet normy

Tento dokument 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 tomto dokumente uvádzajú len na informáciu. Všetky technické riešenia, ktoré spĺňajú uvedené požiadavky na pracovné charakteristiky, sú vyhovujúce.

POZNÁMKA 1. – Požiadavky na pracovné charakteristiky pozri v kapitole 9.

Tento dokument je určený na bakteriologickú analýzu všetkých typov vôd (teplej aj studenej vody, vody z chladiacich veží atď.), ak charakter a/alebo množstvo suspendovaných látok a/alebo sprievodnej flóry neovplyvňuje detekciu. Tieto interferencie môžu negatívne ovplyvniť detekčný aj kvantifikačný limit.

POZNÁMKA 2. – Požiadavky na validáciu pozri v 9.7.

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

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

Metódy qPCR neposkytujú informácie o fyziologickom stave legionel.

2 Normatívne odkazy

Na nasledujúce dokumenty sa odkazuje v texte takým spôsobom, že časť ich obsahu alebo ich celý obsah predstavuje požiadavky tohto dokumentu. Pri datovaných odkazoch sa používa len citované vydanie. Pri nedatovaných odkazoch sa používa najnovšie vydanie citovaného dokumentu (vrátane akýchkoľvek 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