
**Produits alimentaires — Méthodes
d'analyse pour la détection des
organismes génétiquement modifiés
et des produits dérivés — Méthodes
qualitatives basées sur l'utilisation
des acides nucléiques**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid
based methods*

[ISO 21569:2005](#)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-
d92000f7af51/iso-21569-2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005)



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21569:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005>

© ISO 2005

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Version française parue en 2006

Publié en Suisse

Sommaire

Page

| | |
|--|-----------|
| Avant-propos | iv |
| Introduction | v |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Références normatives | 1 |
| 3 Termes et définitions | 1 |
| 4 Principe de la méthode | 2 |
| 5 Réactifs | 2 |
| 6 Appareillage et équipements | 3 |
| 7 Mode opératoire | 3 |
| 8 Interprétation | 6 |
| 9 Expression des résultats et assurance qualité | 6 |
| 10 Rapport d'essai | 7 |
| Annexe A (informative) Méthodes spécifiques au taxon | 8 |
| Annexe B (informative) Méthodes de criblage | 25 |
| Annexe C (informative) Méthodes spécifiques au construit | 41 |
| Annexe D (informative) Méthodes spécifiques aux événements | 64 |
| Bibliographie | 69 |

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'ISO 21569 a été élaborée par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21569:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005>

Introduction

La recherche d'une origine génétiquement modifiée dans les ingrédients est réalisée au moyen des étapes successives (ou simultanées) suivantes. Après la collecte d'échantillons, des acides nucléiques sont extraits de la prise d'essai et peuvent être encore purifiés, simultanément ou après le processus d'extraction. Ensuite, ces acides nucléiques sont quantifiés (si nécessaire), dilués (si nécessaire) et soumis à des procédures d'analyse (comme la PCR). Ces étapes sont détaillées dans la présente Norme internationale et dans la série de Normes internationales suivante, qui a pour titre général: *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés*:

- *Échantillonnage* (ISO 21568);
- *Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques* (ISO 21570);
- *Extraction des acides nucléiques* (ISO 21571).

D'autres informations relatives aux exigences générales et aux définitions incluant les étapes mentionnées ci-dessus sont rassemblées dans l'ISO 24276.

La détection qualitative permet de déterminer si des séquences d'ADN cibles sont présentes ou non à l'aide de témoins appropriés et dans les limites de détection de la méthode analytique employée et de la prise d'essai analysée.

Les méthodes décrites dans les Annexes A à D vont des méthodes de criblage pour la détection des séquences d'ADN communes caractéristiques des OGM aux méthodes d'identification spécifique d'un construit ou d'évènement de transformation spécifique.

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) attire l'attention sur le fait que la conformité avec le présent document peut impliquer l'utilisation d'un brevet relatif à la technologie PCR.

L'ISO ne prend pas position en ce qui concerne la preuve, la validité et le domaine d'application du droit de propriété intellectuelle concerné.

L'ISO a été informée que Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. et F. Hoffman La Roche Ltd. détiennent des droits de propriété intellectuelle relatifs à la technologie PCR. Ces sociétés ont garanti à l'ISO qu'elles souhaitent négocier des licences à des conditions raisonnables et non discriminatoires avec les demandeurs du monde entier. À cet égard, les déclarations des détenteurs de ces droits de propriété intellectuelle sont enregistrés avec l'ISO. Il est possible d'obtenir des informations aux adresses suivantes:

Licensing Department

Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
USA

et

Roche Molecular Systems, Inc.
Licensing Department
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
USA

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues autres que ceux identifiés ci-devant. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21569:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005>

Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit le mode opératoire pour la détection qualitative des organismes génétiquement modifiés (OGM) et produits dérivés par analyse des acides nucléiques extraits de l'échantillon à l'étude. Elle couvre principalement les méthodes d'amplification fondées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Elle concerne les exigences générales relatives à la détection et l'identification spécifiques de séquences d'acides nucléiques cibles (ADN) et à la confirmation de l'identité de la séquence d'ADN amplifiée.

Les lignes directrices, les exigences minimales et les critères de performance exposés dans la présente Norme internationale ont pour but de garantir l'obtention de résultats comparables et reproductibles dans différents laboratoires.

La présente Norme internationale a été élaborée pour les matrices alimentaires mais pourrait également être appliquée pour d'autres matrices (par exemple des aliments pour animaux et des échantillons de plantes issus de l'environnement).

Des exemples spécifiques de méthodes sont fournis dans les Annexes A à D.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 21571:2005, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Extraction des acides nucléiques*

ISO 24276:—¹⁾, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Exigences générales et définitions*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 24276 s'appliquent.

1) À publier.

4 Principe de la méthode

4.1 Généralités

Une analyse qualitative consiste en la détection spécifique des séquences d'acides nucléiques cibles dans les échantillons pour essai. Chaque méthode doit spécifier la séquence cible.

Un résultat qualitatif doit clairement indiquer la présence ou l'absence de l'élément génétique à l'étude, recherchée à l'aide de témoins appropriés, dans les limites de détection de la méthode analytique employée et de la prise d'essai analysée.

4.2 Amplification par PCR

L'amplification de la séquence cible est réalisée *in vitro* par une réaction catalysée par une ADN polymérase en présence d'amorces d'oligonucléotides et de désoxyribonucléosides triphosphates dans un tampon de réaction déterminé^{[1], [2]}. Pour pouvoir réaliser l'amplification de la séquence cible, il est important de vérifier auparavant que le mélange réactionnel ne contient pas d'inhibiteur de polymérase. L'amplification de l'ADN est un processus cyclique comprenant:

- la dénaturation de l'ADN double brin en acide nucléique simple brin par chauffage;
- l'hybridation des amorces de la séquence cible à une température appropriée; et
- l'élongation des amorces, qui sont liées à chacun des simples brins, par une ADN polymérase à une température appropriée.

4.3 Détection et confirmation des produits de PCR

Les produits de PCR sont détectés par électrophorèse sur gel ou à l'aide d'une autre technique appropriée, si besoin est, après isolation réalisée suivant un mode opératoire de séparation adéquat.

L'identité de toute séquence cible détectée peut être vérifiée au moyen d'une méthode appropriée (par exemple par des analyses utilisant des enzymes de restriction, par hybridation ou par analyse des séquences d'ADN).

Dans les analyses par PCR en temps réel, l'amplification et la détection sont simultanées.

5 Réactifs

Il est en général conseillé de stocker les solutions de réaction nécessaires pour la méthode d'analyse à environ -20 °C, sauf indication contraire.

Il peut également être approprié d'aliquoter les solutions de réaction nécessaires pour la méthode d'analyse afin d'éviter de les soumettre à des cycles répétés de congélation-décongélation et/ou de réduire les risques de contamination croisée.

5.1 ADN cible/témoin

5.2 Eau

5.3 Solution de désoxynucléotide triphosphate (dNTP), contenant les nucléotides dATP, dCTP, dGTP, et dTTP ou dUTP.

NOTE L'utilisation de dUTP peut avoir une incidence sur les analyses des produits de PCR avec des enzymes de restriction.

5.4 Solution tampon pour PCR

La solution tampon pour PCR est généralement livrée avec l'ADN polymérase, qui peut contenir ou non du $MgCl_2$ dont la concentration répond aux spécifications du fabricant. Les concentrations finales de $MgCl_2$ sont spécifiques à chaque méthode et sont, par conséquent, répertoriées dans chaque annexe. Des réactifs prêts à l'emploi peuvent être disponibles dans le commerce; il convient de se conformer aux instructions du fabricant.

5.5 ADN polymérase thermostable

5.6 Amorce sens

5.7 Amorce antisens

6 Appareillage et équipements

Voir l'ISO 24276 et les Annexes A à D pour les détails.

7 Mode opératoire

7.1 Qualité, intégrité et amplifiabilité des acides nucléiques extraits

La solution d'acide nucléique doit être suffisamment pure pour l'analyse ultérieure^[3]. La qualité et la quantité d'acides nucléiques extraits à l'aide d'une méthode spécifique donnée sur une matrice donnée doivent être à la fois répétables et reproductibles.

NOTE La qualité, l'intégrité et la quantité de la matrice d'ADN influencent le résultat de la PCR, et donc les résultats analytiques obtenus. La limite de détection d'une méthode spécifique peut donc dépendre du fait que le produit à analyser a été transformé ou raffiné et du degré de dégradation de l'ADN qui en résulte.

Il convient que les acides nucléiques utilisés pour la PCR soient en grande partie exempts d'inhibiteurs de PCR^[4]. Les témoins d'inhibition de PCR doivent toujours être prévus comme décrit dans l'ISO 24276.

7.2 Critères de performance

Les critères de performance généraux sont décrits dans l'ISO 24276.

Les valeurs des caractéristiques de performance sont fournies pour chaque méthode comme indiqué dans les Annexes A à D. Il convient que ces valeurs prennent en compte la taille des génomes; voir la Référence [5].

Il convient que les conditions de réactions, en particulier la concentration de $MgCl_2$ et les conditions thermiques, soient optimisées pour chaque paire et/ou système d'amorces. Lorsqu'un système d'amorces est utilisé pour la première fois, il est nécessaire de vérifier au préalable que les conditions du cycle choisi pour la matrice particulière à étudier ne favorisent pas la formation de produits concurrents indésirables qui réduiraient la sensibilité de la détection PCR.

Dans une réaction optimale, moins de 40 cycles sont nécessaires pour amplifier 10 molécules cibles afin d'obtenir un produit qui soit facilement détectable à l'aide des méthodes normalisées. Plus le nombre de cycles augmente, plus les co-produits peuvent s'accumuler. Il convient que la PCR optimisée permette d'amplifier, en 40 cycles PCR, à partir d'un échantillon de référence pur de 100 copies d'ADN matrice, suffisamment de produit de PCR pour être détecté. Le profil température/temps caractéristique de chaque système d'amorces, le mélange réactionnel approprié à l'appareil utilisé et le nombre de cycles doivent être respectés scrupuleusement.

En général, il convient que la spécificité de la réaction soit accentuée autant que possible, par exemple en utilisant la PCR à démarrage à chaud (PCR «hot start»). La PCR à démarrage à chaud est recommandée comme moyen pour réduire les réactions parallèles telles que l'amplification de séquences d'ADN non cibles (mispriming) et l'oligomérisation des amorces (augmentant ainsi la spécificité).

Les valeurs dérivées de l'étude de validation peuvent ne pas être applicables pour les gammes de concentrations d'analyte et les matrices autres que celles données dans les annexes respectives.

7.3 Aspects de la conception de la PCR

7.3.1 Généralités

Comme il convient que les performances de chaque PCR soient comparables à celles d'autres PCR spécifiques, les aspects suivants de la conception de PCR doivent être pris en compte.

7.3.2 Taille des produits de PCR

La taille de la séquence cible doit être sélectionnée de façon à ce qu'elle corresponde à la gamme de poids moléculaires présente dans l'extrait d'acide nucléique à l'étude.

EXEMPLE Pour de l'ADN fortement dégradé provenant d'aliments transformés, il convient que la taille du produit de PCR soit comprise entre 60 bp et 150 bp. Pour les aliments bruts, une gamme de tailles de produits de PCR plus étendue s'applique, allant par exemple jusqu'à 250 bp.

Toutefois, si des études expérimentales sont réalisées au préalable pour déterminer la validité de systèmes d'amorces permettant d'obtenir des produits de PCR de tailles différentes, ces amorces peuvent être utilisées avec la matrice pour laquelle elles ont été validées.

7.3.3 Amorces

ISO 21569:2005

7.3.3.1 Généralités

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005>

Les Annexes A à D contiennent des informations relatives à la séquence d'amorces.

7.3.3.2 Conception d'amorces

Il convient, de préférence, que les séquences d'amorces aient, si possible, les caractéristiques suivantes:

- longueur de chaque amorce: 18 à 30 nucléotides;
- température optimale d'hybridation ≈ 60 °C (qu'il convient d'établir expérimentalement), c'est-à-dire une température de dénaturation par la chaleur estimée ≤ 65 °C;
- rapport GC:AT = 50:50 si possible, ou aussi proche que possible de ce rapport;
- stabilité interne élevée (éviter la concentration de Gs et de Cs dans les segments d'amorce courts);
- complémentarité minimale avec l'extrémité 3' pour éviter la formation de dimères d'amorces;
- structure secondaire interne minimale;
- formation de dimère minimale avec une ou plusieurs sondes de détection spécifiques conçues pour la PCR.

Il existe des logiciels d'aide à la conception d'amorces.

7.3.3.3 Validation des amorces

7.3.3.3.1 Généralités

La capacité des amorces à détecter la séquence cible doit être validée.

Il convient d'effectuer la validation des amorces en deux étapes: une première étape d'évaluation théorique, et une seconde étape de validation expérimentale.

7.3.3.3.2 Évaluation théorique de la spécificité

L'évaluation théorique doit au moins consister en une recherche d'homologies de séquences [par exemple à l'aide de FastA, Blast^{®2)}] sur l'une des principales bases de données de séquences d'acides nucléiques [par exemple, EMBL, GenBank^{®2)}]. Des séquences de gène homologues peuvent être récupérées dans les bases de données de séquences et alignées afin d'obtenir une estimation de la probabilité de trouver des séquences homologues dans le taxon cible ou dans d'autres organismes.

7.3.3.3.3 Évaluation expérimentale de la spécificité

Quels que soient les critères de conception retenus, la spécificité des amorces doit toujours être évaluée expérimentalement pour confirmer leur capacité à faire la distinction entre la cible et les séquences non-cibles fortement apparentées.

Il convient de démontrer que les amorces conçues pour détecter les séquences cibles spécifiques au taxon sont capables de détecter de manière fiable ces séquences dans un nombre représentatif de membres différents du taxon.

(standards.iteh.ai)

7.4 Description des cibles PCR

Pour la détection qualitative et l'identification des OGM, différentes PCR peuvent être effectuées selon le type de matrice à étudier et/ou les exigences analytiques. Ces analyses peuvent être orientées vers des séquences spécifiques aux taxons cibles, construits génétiques et événements de transformation, ainsi que vers des éléments appropriés aux besoins du criblage.

7.5 Témoins

Du fait du risque d'obtenir des résultats de type faux positifs et/ou faux négatifs, des témoins appropriés doivent être inclus lors des analyses de routine (voir l'ISO 24276).

Il convient d'utiliser, dans la mesure du possible, du matériel de référence certifié comme témoins positif et négatif.

7.6 Réaction PCR, détection et confirmation des produits de PCR

Les Annexes A à D décrivent en détail les étapes du mode opératoire de PCR spécifique.

NOTE En cas de détection de produits de PCR par électrophorèse sur gel, la taille des produits de PCR peut être estimée à l'aide d'un marqueur de taille d'ADN approprié, de longueur connue, à analyser en parallèle des autres produits de PCR soumis à essai.

2) Blast et GenBank sont des exemples de produits adaptés disponibles dans le commerce. Ces informations sont données pour le confort de l'utilisateur de la présente Norme internationale mais ne constitue aucunement une approbation de ces produits de la part de l'ISO. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

Il peut être souhaitable, dans certains cas, d'avoir confirmation d'un résultat positif ou négatif concernant une modification génétique. Cela peut être fait en employant des amorces conçues pour une autre séquence cible; ceci est particulièrement approprié pour la confirmation des résultats des essais de criblage.

L'identification positive d'une séquence d'ADN cible spécifique peut être confirmée au moyen d'une méthode appropriée autre que la détermination de la taille du produit de PCR, par exemple

- par hybridation du produit de PCR avec des sondes d'ADN; ou
- par des analyses de digestion enzymatiques du produit de PCR. La longueur des fragments qui en résultent doit correspondre à la longueur attendue de la séquence d'ADN cible après digestion; ou
- par séquençage du produit de PCR; ou
- par un autre moyen de confirmation équivalent.

Si les amorces utilisées sont conçues pour détecter les séquences dérivées d'organismes infectieux (organisme non génétiquement modifié présent dans la nature tel qu'un virus ou une bactérie), il est fortement recommandé de vérifier que l'ADN détecté est effectivement dérivé d'un OGM. Pour ce faire, il est possible de vérifier l'absence d'autre ADN, dérivé d'un organisme infectieux.

EXEMPLE Le promoteur 35S est dérivé du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), donc la détection du promoteur 35S du CaMV peut être due à la présence d'ADN dérivé d'un OGM comme à la présence d'ADN dérivé d'un CaMV [6]. Si aucun autre ADN dérivé du CaMV n'est détecté, il peut être possible de confirmer que le promoteur 35S du CaMV provient d'un OGM.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

8 Interprétation

8.1 Généralités

[ISO 21569:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005>

Le résultat de la PCR sera soit

- a) positif si un produit de PCR spécifique est détecté et que tous les résultats des témoins sont conformes à l'ISO 24276:—, Tableau 2; soit
- b) négatif si un produit de PCR spécifique n'a pas été détecté et que tous les résultats des témoins sont conformes à l'ISO 24276:—, Tableau 2.

NOTE Les séquences cibles spécifiques à un événement sont parfois présentes en association avec d'autres séquences spécifiques à un événement dans un OGM unique (par exemple en raison d'un empilement de gènes^[7]).

Si les résultats obtenus sont ambigus, le mode opératoire doit être répété; voir l'ISO 24276.

8.2 Vérification

La vérification de résultats positifs ou négatifs concernant les séquences cibles peut être effectuée comme décrit en 7.6.

9 Expression des résultats et assurance qualité

9.1 Généralités

Les résultats doivent être exprimés sans ambiguïté, c'est-à-dire jamais sous la forme «±».

Un résultat négatif ne doit jamais être exprimé sous la forme «absence d'OGM».

Idéalement, il convient d'indiquer la limite de détection (LOD) avec une référence à l'échantillon pour essai. Cependant, ceci requiert du matériel particulier, de l'ADN de qualité exceptionnelle et/ou des équipements de laboratoires sophistiqués qui ne sont pas disponibles dans tous les laboratoires. C'est pourquoi l'analyse peut s'avérer très laborieuse et/ou coûteuse et donc non applicable en pratique aux tâches de routine.

La LOD doit faire référence à au moins un matériel de référence et à une valeur relative fondée sur une matrice donnée (de préférence une quantité donnée de solution d'ADN génomique, par exemple 100 ng d'ADN GTS 40-3-2 à 0,01 %).

9.2 Expression d'un résultat négatif

Le texte suivant doit apparaître dans le rapport d'essai:

«Pour l'échantillon X, la séquence cible Y n'a pas été détectée.

La LOD de la méthode est de x % déterminé sur ABC (identifier le matériel de référence).»

S'il n'est pas possible de démontrer que la quantité d'ADN cible présent dans la PCR est suffisante pour que la limite de détection soit atteinte, alors la mention suivante doit être ajoutée:

«Toutefois, la quantité d'ADN cible extraite de l'espèce X n'était/n'est peut être pas suffisante pour que la LOD s'applique à cet échantillon.»

NOTE La LOD de l'échantillon est déterminée par la quantité d'ADN des espèces comprises dans la réaction analytique (nombre de copies) et par le rapport relatif à la LOD absolue de la cible GM (nombre de copies) [7].

9.3 Expression d'un résultat positif

Le texte suivant doit apparaître dans le rapport d'essai:

«Pour l'échantillon X, la séquence cible Y a été détectée.»

L'identité de l'OGM peut être mentionnée, le cas échéant.

9.4 Exigences relatives à l'assurance qualité

Les résultats obtenus avec les différentes prises d'essai doivent être cohérents. Si une prise d'essai donne un résultat positif et que l'autre donne un résultat négatif, alors l'analyse doit être répétée (voir l'ISO 24276), si possible en augmentant la quantité d'acide nucléique matrice dans la réaction afin d'obtenir des résultats cohérents pour les deux prises d'essai. En outre, il convient de vérifier au moins la pureté de l'acide nucléique matrice en incluant un témoin d'inhibition de PCR. D'autres témoins destinés à vérifier la longueur et l'intégrité de l'acide nucléique matrice peuvent être utiles.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit être rédigé conformément à l'ISO 24276 et doit au moins contenir les informations suivantes:

- la limite de détection et la matrice utilisée pour déterminer cette limite;
- la description de la spécificité de la méthode analytique;
- les résultats exprimés conformément à l'Article 9.

Annexe A (informative)

Méthodes spécifiques au taxon

A.1 Méthodes spécifiques au taxon pour la détection de composés dérivés du soja

A.1.1 Généralités

Il s'agit d'un mode opératoire de routine pour la détection d'un gène monocopie spécifique à l'espèce soja (*Glycine max*).

Cette méthode peut être utilisée afin d'évaluer l'amplifiabilité de l'ADN provenant de produits dérivés du soja.

A.1.2 État de validation et critères de performance

A.1.2.1 Essai interlaboratoire

La méthode a été validée dans le cadre d'essais interlaboratoires^[8] ^[9] organisés par le groupe de travail «Développement de méthodes pour l'identification des aliments produits à l'aide de techniques de génie génétique» de l'institut fédéral allemand pour la protection de la santé des consommateurs et de médecine vétérinaire (BgVV) conformément à l'Article 35 de la loi fédérale allemande sur les aliments. En ce qui concerne l'extraction d'ADN, la méthode employant le CTAB, indiquée dans l'ISO 21571:2005, A.3, a été utilisée (mais avec une prise d'essai de 100 mg).

Les données des essais interlaboratoires sont énumérées dans le Tableau A.1.

Tableau A.1 — Résultats des essais interlaboratoires

| Année de l'essai interlaboratoire | 1997 ^[8] | 1998/1999 ^[9] |
|---|---------------------|--------------------------|
| Nombre de laboratoires | 25 | 27 |
| Nombre de laboratoires présentant des résultats | 22 | 20 |
| Nombre d'échantillons par laboratoire | 10 | 3 |
| Nombre de résultats acceptés | 220 | 60 |
| Nombre d'échantillons contenant du soja | 220 | 50 |
| Faux positifs | 0 | 1 (2 %) |
| Faux négatifs | 0 | 1 (2 %) |

A.1.2.2 Spécificité moléculaire

A.1.2.2.1 Généralités

La présente annexe répond aux exigences de l'Article 7.

La méthode a été conçue pour détecter une séquence décrite dans GenBank^{®3)} sous la Référence K00821 = M30884.

A.1.2.2.2 Aspects théoriques

Le gène de la lectine de soja *Le1*^[10] obtenu à partir des bases de données a été choisi comme séquence cible.

Aucune homologie de séquence avec les séquences d'ADN d'autres plantes cultivées (légumineuses, céréales, potagères) n'a été déterminée (recherche effectuée à l'aide de NCBI BlastN^{®3)} dans la base de données European Molecular Biology Laboratory (EMBL) le 28 septembre 2001). Cependant, GMO3 présente 100 % d'homologie avec les séquences des références suivantes: AX033509 (séquence 17 du brevet DE19906169), AX033507 (séquence 15 du brevet DE19906169) et AX033501 (séquence 9 du brevet DE19906169), tandis que GM04 ne présente d'homologie qu'avec la référence AX033509 (séquence 17 du brevet DE19906169). À noter que la référence n° M30884 est la même que la référence K00821, une entrée GenBank[®] apparue pour la première fois en 1993.

Le nombre de copies de la séquence cible n'a pas été déterminé, mais il est présupposé qu'il s'agit d'un gène monocopie.

A.1.2.2.3 Aspects expérimentaux

Aucune amplification n'a été observée à partir d'ADN provenant d'autres plantes cultivées (légumineuses, céréales, potagères), ou de bœuf et de porc. Le test PCR soja apparaît spécifique à l'ADN de soja^{[10], [11]}.

A.1.2.3 Limite de détection (LOD)

La LOD absolue n'a pas été déterminée, mais il a été démontré que la méthode permet de détecter au moins 0,1 ng d'ADN de soja dosé par fluorimétrie.

[ISO 21569:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d9163883-7a32-4c03-b061-d92000f7af51/iso-21569-2005>

A.1.3 Adaptation

Aucune information spécifique n'est disponible.

A.1.4 Principe

Un fragment de 118 bp issu du gène de lectine de soja est amplifié par PCR et séparé par électrophorèse sur gel d'agarose.

A.1.5 Réactifs

Pour déterminer la qualité des réactifs à utiliser, voir l'ISO 24276.

A.1.5.1 Eau.

A.1.5.2 Tampon PCR, (sans MgCl₂), 10×⁴⁾.

A.1.5.3 Solution de MgCl₂, c(MgCl₂) = 25 mmol/l.

3) GenBank et BlastN sont des exemples de produits adaptés disponibles dans le commerce. Ces informations sont données pour le confort de l'utilisateur de la présente Norme internationale mais ne constitue aucunement une approbation de ces produits de la part de l'ISO. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

4) 10× signifie 10 fois, soit un tampon PCR contenant 1,5 mol/l Tris-Cl, pH 8,3.