
**Microbiologie des aliments — Réaction
de polymérisation en chaîne (PCR) pour
la recherche de micro-organismes
pathogènes dans les aliments —
Exigences générales et définitions**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain
reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General
requirements and definitions*
(standards.iteh.ai)

[ISO 22174:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0c5544c0-7d77-4c2c-94bc-b857f6678c68/iso-22174-2005)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0c5544c0-7d77-4c2c-94bc-
b857f6678c68/iso-22174-2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0c5544c0-7d77-4c2c-94bc-b857f6678c68/iso-22174-2005)



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 22174:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0c5544c0-7d77-4c2c-94bc-b857f6678c68/iso-22174-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0c5544c0-7d77-4c2c-94bc-b857f6678c68/iso-22174-2005>

© 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

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	6
4.1 Généralités	6
4.2 Enrichissement microbien préliminaire	7
4.3 Préparation de l'acide nucléique	7
4.4 Amplification par PCR	7
4.5 Détection et confirmation des produits PCR	7
5 Matériau d'essai	7
6 Exigences générales de laboratoire	8
6.1 Généralités	8
6.2 Personnel	8
6.3 Équipement du laboratoire	8
6.4 Gestion des déchets	9
7 Réactifs	9
8 Appareillage et équipement	9
8.1 Généralités	9
8.2 Considérations particulières	9
9 Mode opératoire	9
9.1 Préparation de l'échantillon	9
9.2 Amplification	9
9.3 Réaction des témoins	9
9.4 Confirmation des résultats de la PCR	10
10 Évaluation	10
11 Rapport d'essai	11
Bibliographie	12

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 22174 a été élaborée par le Comité européen de normalisation (CEN) Comité Technique CEN/TC 275, *Analyse des denrées alimentaires — Méthodes horizontales* en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 22174:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0c5544c0-7d77-4c2c-94bc-b857f6678c68/iso-22174-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0c5544c0-7d77-4c2c-94bc-b857f6678c68/iso-22174-2005>

Introduction

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode spécifique rapide et sensible pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments. Bien que la PCR soit une technologie relativement récente, les méthodes d'analyse des produits alimentaires fondées sur la PCR sont de plus en plus utilisées.

En résumé, les protocoles existants peuvent être répartis en deux groupes principaux, selon le type d'acide nucléique utilisé comme cible de l'amplification:

- l'amplification de l'ARN (RT-PCR);
- l'amplification de l'ADN (PCR).

Il existe de nombreuses variantes de ces méthodes, qui peuvent être caractérisées par leur niveau de complexité et d'automatisation. Le niveau de spécificité des méthodes varie entre des essais de criblage détectant les séquences d'acide nucléique communes à un genre microbien et des essais spécifiques identifiant des séquences d'acide nucléique propres à une souche particulière ou à un type de souches.

La présente Norme internationale dresse une liste complète d'exigences relatives à l'utilisation des méthodes fondées sur la PCR pour la détection de micro-organismes dans des échantillons de produits alimentaires. Cette norme contient des termes et des définitions qui s'appliquent à la PCR et à la RT-PCR.

L'ISO 22174 fait partie d'une série de Normes internationales et d'une spécification technique réunies sous le titre générique *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments*:

- *Exigences générales et définitions* (ISO 22174);
- *Exigences relatives à la préparation des échantillons pour la détection qualitative* (ISO 20837)¹⁾;
- *Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour les méthodes qualitatives* (ISO 20838)¹⁾;
- *Critères de performances des thermocycleurs* (ISO/TS 20836)¹⁾.

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) attire l'attention sur le fait qu'il est déclaré que la conformité avec les dispositions du présent document peut impliquer l'utilisation d'un brevet intéressant la technologie de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à la portée de ces droits de propriété.

L'ISO a été informée que Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. et F. Hoffman-La Roche Ltd. détiennent les droits de propriété de la technologie de la PCR. Les compagnies ont donné l'assurance à l'ISO qu'elles consentent à négocier des licences avec des demandeurs du monde entier, à des termes et conditions raisonnables et non discriminatoires. À ce propos, les déclarations des détenteurs des droits de propriété sont enregistrées à l'ISO. Des informations peuvent être demandées à:

Licensing Department
Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
États-Unis

1) À publier.

et

Roche Molecular Systems, Inc.
Licensing Department
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
États-Unis

L'attention est d'autre part attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété autres que ceux qui ont été mentionnés ci-dessus. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de l'identification de ces droits de propriété en tout ou partie.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 22174:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0c5544c0-7d77-4c2c-94bc-b857f6678c68/iso-22174-2005>

Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions

AVERTISSEMENT — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer la manipulation de matériaux et d'équipements dangereux et la réalisation d'opérations comportant des risques. La présente Norme internationale n'a pas pour objectif de traiter toutes les questions de sécurité associées à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente Norme internationale de mettre en place des pratiques appropriées en matière de sécurité et de santé et de déterminer l'applicabilité des limites réglementaires avant utilisation.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale s'applique aux essais d'aliments et aux extraits obtenus à partir de ces aliments pour la détection de micro-organismes pathogènes en faisant appel à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et stipule les exigences générales relatives à l'amplification in vitro des séquences d'acide nucléique (ADN ou ARN).

Les exigences minimales déclarées dans la présente Norme internationale sont destinées à garantir l'obtention de résultats comparables et reproductibles dans des laboratoires différents.

La présente Norme internationale a été conçue pour les micro-organismes pathogènes présents dans les aliments ou extraits d'aliments et de matrices d'aliments mais elle peut également s'appliquer à d'autres matrices, comme les échantillons environnementaux, ainsi que pour la détection de micro-organismes non pathogènes.

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 3534-1, *Statistique — Vocabulaire et symboles — Partie 1: Probabilité et termes statistiques généraux*

ISO 5725-1, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 1: Principes généraux et définitions*

ISO 20837, *Microbiologie des aliments — Réaction des polymérases en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences relatives à la préparation des échantillons pour la détection qualitative*

ISO 20838, *Microbiologie des aliments — Réaction des polymérases en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences relatives à l'amplification et détection pour des méthodes qualitatives*

ISO/CEI 17025, *Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent. Pour les définitions relatives à la validation, voir l'ISO 3534-1 et l'ISO 5725-1.

3.1 Définitions générales

3.1.1

acide nucléique

macromolécule support de l'information génétique ou permettant l'expression de cette information

NOTE Il existe deux types d'acides nucléiques, l'ADN et l'ARN.

3.1.2

ADN

acide désoxyribonucléique

polymère de désoxyribonucléotides se présentant sous la forme de double brin (ADNdb) ou de brin simple (ADNsb)

3.1.3

ARN

acide ribonucléique

polymère de ribonucléotides se présentant sous la forme de double brin ou de brin simple

3.1.4

matrice

produits soumis à analyse et pouvant présenter des différences de composition chimique et d'état physique

3.1.5

conditions de répétabilité

conditions dans lesquelles les résultats d'essais indépendants sont obtenus selon la même méthode sur une population d'essai identique dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps

[ISO 3534-1]

3.1.6

conditions de reproductibilité

conditions dans lesquelles les résultats d'essais sont obtenus selon la même méthode sur une population d'essai identique dans différents laboratoires, par différents opérateurs utilisant des équipements différents

[ISO 3534-1]

3.1.7

détection

reconnaissance de la présence de l'acide nucléique cible

3.1.8

limite de détection

plus petite concentration ou teneur en organisme cible par quantité définie de matrice pouvant être immanquablement détectée dans les conditions expérimentales décrites par la méthode

3.1.9

identification

processus permettant de déterminer qu'une souche isolée appartient à l'un des taxons déterminés

3.2 Termes relatifs à l'extraction et à la purification de l'ADN/ARN

3.2.1

extraction de l'acide nucléique

préparation d'un échantillon pour la libération de l'acide nucléique cible

3.2.2

purification de l'acide nucléique

méthode permettant d'obtenir un ADN purifié

NOTE Dans le contexte du présent document, la pureté renvoie à la réduction d'effets observables d'inhibiteurs de PCR sur les témoins d'inhibition de PCR.

3.2.3

ADN de qualité PCR

matrice d'ADN de longueur et en quantité suffisantes pour la PCR

3.2.4

ARN de qualité RT-PCR

matrice d'ARN de longueur et en quantité suffisantes pour la transcription inverse et la PCR

3.3 Termes relatifs à la transcription inverse (RT) de l'ARN en ADN

3.3.1

RT

transcription inverse

processus de synthèse de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN utilisant l'activité enzymatique d'une transcriptase inverse associée à une amorce de RT en présence de dNTP

3.3.2

transcriptase inverse

enzyme qui catalyse la transcription inverse de l'ARN en ADN en utilisant des amorces de RT

3.3.3

ribonucléase

enzyme qui dégrade l'ARN

3.3.4

inhibiteur de ribonucléase

substance qui bloque l'activité de la ribonucléase

3.3.5

amorce de RT

amorce utilisée pour la transcription inverse

3.3.6

mélange RT

mélange de réactifs nécessaires à la transcription inverse

3.3.7

désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP)

solution composée de dATP, dCTP, dGTP, dTTP et/ou dUTP

3.4 Termes relatifs à l'amplification de l'ADN par PCR/RT-PCR

3.4.1

réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

méthode enzymatique permettant l'amplification in vitro de l'ADN

3.4.2

RT-PCR

méthode consistant en deux réactions, à savoir une transcription inverse (RT) de l'ARN en ADN suivie d'une PCR

3.4.3

RT-PCR en une étape

méthode associant une transcription inverse (RT) de l'ARN en ADN et une PCR en une seule réaction

3.4.4

RT-PCR en deux étapes

méthode consistant en une transcription inverse (RT) et en une PCR sous la forme de deux réactions distinctes

NOTE Les deux réactions de la RT-PCR en deux étapes peuvent être réalisées l'une après l'autre, dans un seul tube ou dans deux tubes différents.

3.4.5

produit PCR

ADN amplifié par PCR

3.4.6

détection du produit PCR

procédé permettant de reconnaître la présence d'un produit PCR

3.4.7

confirmation du produit PCR

procédé apportant la preuve que le produit PCR est issu de la séquence cible

3.4.8

PCR-ELISA

méthode de détection des produits PCR en phase liquide après leur rétention sur une surface solide, par exemple dans les puits d'une micro-plaque

NOTE La présence de produit PCR est visualisée par hybridation suivie d'une détection immunoenzymatique.

3.4.9

PCR «hot start»

activation d'une ADN polymérase thermostable par une étape initiale de chauffage pour éviter une amplification non spécifique

3.4.10

PCR gigogne

PCR amplifiant une séquence interne du produit de la PCR précédente

3.4.11

PCR multiplex

PCR qui utilise des paires d'amorces multiples

3.4.12

amorce

oligonucléotide de longueur et de séquence définies, complémentaire d'un segment d'une séquence d'ADN pertinente pour l'analyse

NOTE Une amorce délimite l'une des extrémités de la séquence d'ADN cible.

3.4.13

ADN cible

séquence d'ADN utilisée pour l'amplification

3.4.14**dénaturation**

processus qui a pour résultat la fusion de l'ADN bicaténaire en ADN monocaténaire

3.4.15**hybridation**

liaison d'une amorce et d'une séquence complémentaire d'acide nucléique dans des conditions spécifiques

3.4.16**extension de l'amorce**

réaction enzymatique conduisant à la synthèse d'un nouveau brin d'ADN par addition d'un désoxyribonucléotide à l'extrémité 3' de la séquence d'amorce

3.4.17**ADN polymérase pour PCR**

enzyme thermostable permettant la synthèse répétée d'ADN

3.4.18**mélange maître**

mélange des réactifs nécessaires à une PCR, à l'exception de la matrice d'ADN cible et des témoins

3.4.19**UNG****uracyle N-glycosylase**

enzyme pouvant couper toute séquence d'acide nucléique contenant de la déoxyuridine (dUTP), au niveau de ce nucléotide

3.4.20**thermocycleur**

appareil automatique qui réalise les cycles de chauffage et de refroidissement nécessaires à la PCR

3.4.21**analyse au point final**

analyse qualitative destinée à détecter les produits PCR

3.4.22**analyse en temps réel**

méthode de détection des produits PCR pendant l'amplification

3.5 Définitions relatives aux témoins**3.5.1****témoin positif de processus**

échantillon dopé en micro-organisme cible qu'il convient de traiter de la même manière que les échantillons d'essai

3.5.2**témoin négatif de processus**

échantillon de la matrice de produit alimentaire exempt de micro-organisme pathogène cible qui passe par toutes les étapes du processus analytique

NOTE Le procédé peut inclure la préparation de l'échantillon, l'enrichissement, l'extraction d'ADN et l'amplification de la cible.