

---

---

**Microbiologie des aliments — Réaction  
de polymérisation en chaîne (PCR)  
pour la recherche de micro-organismes  
pathogènes dans les aliments —  
Essais de performance des  
thermocycleurs**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain  
reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens —  
Performance testing for thermal cyclers*

[ISO/TS 20836:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-214befb222c7/iso-ts-20836-2005)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-  
214befb222c7/iso-ts-20836-2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-214befb222c7/iso-ts-20836-2005)



**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/TS 20836:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-214befb222c7/iso-ts-20836-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-214befb222c7/iso-ts-20836-2005>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Version française parue en 2007

Publié en Suisse

**Sommaire**

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Installation des thermocycleurs</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Maintenance des thermocycleurs</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Essais de performance</b> .....	<b>2</b>
<b>6.1</b> <b>Généralités</b> .....	<b>2</b>
<b>6.2</b> <b>Essai biochimique de performance</b> .....	<b>3</b>
<b>6.3</b> <b>Essai physique de performance</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Rapport d'essai et relevé des écarts</b> .....	<b>3</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Essai biochimique de performance — Méthode de PCR pour le contrôle de l'exactitude des températures</b> .....	<b>4</b>
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Essai physique de performance</b> .....	<b>12</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>14</b>

[ISO/TS 20836:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-214befb222c7/iso-ts-20836-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-214befb222c7/iso-ts-20836-2005>

## 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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents normatifs:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

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

L'ISO/TS 20836 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*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

## Introduction

La présente Spécification technique fait partie d'une série de Normes internationales regroupées sous le titre *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche 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);
- *Essais de performance des thermocycleurs* (ISO/TS 20836);
- *Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour les méthodes qualitatives* (ISO 20838).

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) souhaite indiquer qu'il est possible que la conformité au présent document implique l'utilisation d'un ou plusieurs brevets relatifs aux techniques de PCR.

L'ISO ne prend aucunement position concernant la réalité, la validité et le champ d'application de ces droits de brevet.

L'ISO a été informée que Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. et F. Hoffman-La Roche Ltd. détiennent des droits de brevet relatifs aux techniques de PCR. Les entreprises ont assuré l'ISO qu'elles sont prêtes à négocier des licences aux demandeurs dans le monde entier avec des conditions générales raisonnables et non discriminatoires. À cet égard, les déclarations des détenteurs de ces droits de brevet sont enregistrées auprès de l'ISO. Les informations sont disponibles aux adresses suivantes:

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-214befb222c7/iso-ts-20836-2005>

et

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

L'ISO attire également l'attention sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de brevet autres que ceux indiqués ci-dessus. L'ISO ne peut être tenue responsable de l'identification de l'un quelconque ou de la totalité de tels droits de brevet.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO/TS 20836:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-214befb222c7/iso-ts-20836-2005>

# Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Essais de performance des thermocycleurs

**AVERTISSEMENT** — L'utilisation de la présente Spécification technique peut impliquer des matériaux, opérations ou matériels dangereux. L'objectif de la présente Spécification technique n'est pas de couvrir tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente Spécification technique d'établir les pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer les conditions d'application des restrictions réglementaires avant utilisation.

## 1 Domaine d'application

La présente Spécification technique précise des exigences fondamentales concernant l'installation, la performance et la maintenance des thermocycleurs. Bien que ces équipements soient des dispositifs solides, ils nécessitent une maintenance régulière. Leurs éléments chauffants/refroidissants, à effet Peltier ou équivalent, ont une durée de vie limitée. Le bon fonctionnement de l'élément chauffant/refroidissant dépend à la fois de la qualité des dispositifs de chauffage/refroidissement et d'une utilisation et de maintenances appropriées.

En plus de la définition des exigences pour un programme de maintenance défini, des modes opératoires pour la détermination de la performance des thermocycleurs par des méthodes biochimiques ou physiques sont décrits (voir les Annexes A et B).

## 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 22174, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions*

ISO/CEI 17025, *Exigences 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 donnés dans l'ISO 22174 ainsi que les suivants s'appliquent.

### 3.1

#### **couvercle chauffant**

élément facultatif d'un thermocycleur servant à éviter l'évaporation à partir du tube de réaction

### 3.2

#### **uniformité de la température**

homogénéité de la température qui règne au sein de l'unité thermiquement contrôlée (bloc chauffant par exemple)

**3.3**  
**essai biochimique de performance**  
mode opératoire d'essai qui détermine la performance d'un thermocycleur par voie biochimique (PCR thermosensible par exemple)

**3.4**  
**essai physique de performance**  
mode opératoire qui détermine la performance d'un thermocycleur par voie physique

**3.5**  
**système de PCR non robuste**  
système de PCR pour lequel de petits écarts par rapport au protocole thermique ou chimique prescrit ont pour résultat une amplification plus faible

**3.6**  
**espace critique**  
espace ou positions dans le portoir du thermocycleur où il est le plus probable que la température de l'échantillon présentera un écart par rapport à la valeur affichée, par comparaison avec les autres positions

## 4 Installation des thermocycleurs

Il convient de suivre les instructions du fabricant.

Il est recommandé de prendre en considération les aspects suivants:

- a) il convient d'installer les thermocycleurs de manière à les faire fonctionner à une température et à une humidité appropriées;
- b) il convient de placer les thermocycleurs: [ISO/TS 20836:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-014b872b7161/iso-ts-20836-2005)  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0762cd24-bf54-4da2-aed6-014b872b7161/iso-ts-20836-2005>
- de façon à pouvoir les soumettre à un examen visuel;
  - de manière à permettre des échanges de chaleur constants avec l'environnement et une libre circulation de l'air; et
  - dans un environnement stable.

## 5 Maintenance des thermocycleurs

Il est recommandé que le laboratoire établisse et mette en œuvre un programme de maintenance défini pour chaque thermocycleur, sur la base du nombre d'heures d'utilisation ou du nombre de cycles de fonctionnement enregistrés.

## 6 Essais de performance

### 6.1 Généralités

Il convient d'une part, d'établir les essais de performance de chaque thermocycleur soit indirectement par le biais d'un essai biochimique, soit directement en mettant en œuvre un essai physique et, d'autre part, de les consigner par écrit.

## 6.2 Essai biochimique de performance

Il convient d'établir un mode opératoire biochimique pour les essais de performance des thermocycleurs, telle une méthode de PCR non robuste thermosensible.

L'Annexe A décrit un exemple de méthode appropriée. Il est également possible d'utiliser toute autre méthode de PCR pourvu qu'il puisse être démontré qu'elle remplit les exigences requises.

Pour définir la fréquence des essais de performance, il convient de s'appuyer sur les heures d'utilisation consignées par écrit ou sur le nombre de cycles de fonctionnement de chacun des thermocycleurs.

## 6.3 Essai physique de performance

Il convient de réaliser un essai physique pour mesurer la température réelle de l'échantillon à l'intérieur de chaque puits pendant le cycle de température et de comparer la valeur ainsi obtenue à celle affichée.

L'Annexe B décrit un exemple de méthode appropriée. Il y a lieu de réaliser un essai physique de performance si l'on n'a pas effectué d'essai biochimique de performance ou si l'essai biochimique réalisé a indiqué une amplification inefficace.

Pour définir la fréquence des essais de performance, il convient de s'appuyer sur les heures d'utilisation consignées par écrit ou sur le nombre de cycles de fonctionnement de chacun des thermocycleurs.

## 7 Rapport d'essai et relevé des écarts

Le rapport d'essai doit être en conformité avec l'ISO/CEI 17025 et il est recommandé qu'il contienne au moins les informations ci-après:

- le numéro d'identification du thermocycleur;
- une référence à la présente Spécification technique et à l'Annexe mise en œuvre pour l'essai;
- la date des essais;
- le visa de la personne responsable de l'analyse;
- les résultats d'essai;
- tout point particulier observé pendant l'essai;
- les écarts, ajouts ou suppressions par rapport à la spécification d'essai;
- toute autre information pertinente pour l'essai considéré.

Il convient que le laboratoire utilise des modes opératoires documentés pour identifier et traiter les éventuels écarts concernant les performances du thermocycleur (voir également l'ISO/CEI 17025).

## Annexe A (informative)

### Essai biochimique de performance — Méthode de PCR pour le contrôle de l'exactitude des températures

#### A.1 Généralités

La présente méthode vérifie l'exactitude du contrôle de la température d'hybridation des thermocycleurs. Cet essai est sensible à un accroissement de la température d'hybridation réelle par rapport à la température affichée, pendant un cycle défini du programme de température.

#### A.2 Principe

L'exactitude de la température programmée/affichée est vérifiée lors d'un essai en mettant en œuvre une PCR spécifiquement conçue. Les échantillons de PCR sont très sensibles à un dépassement de la température d'hybridation pendant les cycles de température.

Une séquence d'ADN de 362 paires de base (pb) qui contient la séquence cible à amplifier est générée par amplification de la région adjacente du site de clonage du vecteur pGEM avec un couple d'amorces de séquençage M13 standard. La séquence clonée est représentée sur la Figure A.1.

(standards.iteh.ai)

<u>CAGGAAACAG</u>	<u>CTATGACCAT</u>	<u>GATTACGCCA</u>	<u>AGCTATTTAG</u>	<u>GTGACACTAT</u>	<u>AGAATACTCA</u>	<u>AGCTATGCAT</u>
<u>CCAACGCGTT</u>	<u>GGGAGCTCTC</u>	<u>CCATATGGTC</u>	<u>GACCTGCAGG</u>	<u>CGGCCGCAC</u>	<u>AGTGATTAGC</u>	<u>AACCTCGGTA</u>
<u>CCATATACTA</u>	<u>ACTCGATAACA</u>	<u>GAAACATCGG</u>	<u>TTGGTGATCG</u>	<u>ATCGAGGTTT</u>	<u>TTAAAAACCC</u>	<u>CCTCTAGCTA</u>
<u>GCTAGCTAGC</u>	<u>GATTGCTTCA</u>	<u>CCAAGAAGAG</u>	<u>CTCCAACAGC</u>	<u>CTGATGGCAT</u>	<u>CAAGTTACAC</u>	<u>AATCCGCGG</u>
<u>CCATGGCGGC</u>	<u>CGGGAGCATG</u>	<u>CGACGTCGGG</u>	<u>CCCAATTTCG</u>	<u>CCTATAGTGA</u>	<u>GTCGTATTAC</u>	<u>AATTCACTGG</u>
<u>CCGTCGTTTT</u>	<u>AC</u>					

**Figure A.1 — Séquences de la cible et des amorces utilisées lors de l'essai de performance d'un thermocycleur**

La séquence du produit d'amplification (du produit PCR) a été obtenue en utilisant les amorces M13 (double trait de soulignement) lors de l'amplification PCR de la séquence cible à partir du plasmide pGEM modifié [pSC17<sup>1)</sup>]. Les amorces utilisées dans le système d'essai en vue de la validation du thermocycleur sont surlignées et représentées séparément (VAL1 et VAL2, voir A.3.5.3 et A.3.5.4). La séquence du produit de PCR généré lors de cet essai de performance est soulignée. Un mauvais appariement est mis en évidence par une police en gras.

Le couple d'amorces VAL1 et VAL2 engendrent un produit de PCR de 116 pb qui est détecté par électrophorèse en gel d'agarose. En raison du mauvais appariement à l'extrémité 3' de l'amorce VAL1, la PCR est sensible à un dépassement de la température d'hybridation par rapport à la température définie. Un dépassement de 63 °C à 66 °C provoque une amplification moins efficace et conduit à un produit PCR de 116 pb non détectable.

1) Il s'agit d'un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est fournie par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Spécification technique et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Il est possible d'utiliser des produits équivalents s'il peut être démontré qu'ils conduisent au même résultat.

Les échantillons doivent être placés aux emplacements représentatifs de la zone thermocontrôlée, y compris les espaces critiques. Lorsque ces derniers ne sont pas connus, il convient de déposer les échantillons aux emplacements situés dans les coins et au centre <sup>[1]</sup>.

Un exemple de thermocycleur à 96 puits est représenté sur la Figure A.2.

### A.3 Réactifs

N'utiliser que des réactifs analytiquement purs, aptes à être employés avec les méthodes de détection appliquées en biologie moléculaire.

#### A.3.1 Eau.

Pour la réaction d'amplification, utiliser de l'eau toujours exempte de désoxyribonucléase et de ribonucléase. Il existe dans le commerce de l'eau de haute pureté adaptée.

**A.3.2 Tampon pour PCR** (sans  $MgCl_2$ ), 10× (150 mmol/l de TRIS, pH 8, 500 mmol/l de KCl).

**A.3.3 Solution de  $MgCl_2$** ,  $c(MgCl_2) = 25$  mmol/l.

**A.3.4 Solution de dNTP**,  $c(dNTP) = 10$  mmol/l (chacun).

#### A.3.5 Oligonucléotides.

Les oligonucléotides exigent une purification après la synthèse.

##### A.3.5.1 Amorce sens pour la construction de la séquence cible de 362 pb.

Vecteur de clonage phage M13mp8 (GenBank N° d'accès M77826.1).

Amorce M13(-26): 5'-CAG gAA ACA gCT ATg AC-3'.

##### A.3.5.2 Amorce antisens pour la construction de la séquence cible de 362 pb.

Vecteur de clonage phage M13mp8 (GenBank N° d'accès M77826.1).

Amorce M13(-20): 5'-gTA AAA CgA Cgg CCA gT-3'.

##### A.3.5.3 Amorce sens pour l'essai de contrôle de la température d'hybridation des thermocycleurs.

Produit de synthèse:

Amorce VAL1: 5'-gAT ACA gAA ACA TCg gTT ggC-3'.

##### A.3.5.4 Amorce antisens pour l'essai de contrôle de la température d'hybridation des thermocycleurs.

Produit de synthèse:

Amorce VAL2: 5'-gTg TAA CTT gAT gCC ATC Agg-3'.

#### A.3.6 Plasmide pSC17 <sup>2)</sup>.

2) Il s'agit d'un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est fournie par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Spécification technique et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Il est possible d'utiliser des produits équivalents s'il peut être démontré qu'ils conduisent au même résultat.