

---

---

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

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain  
reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens —  
Requirements for amplification and detection for qualitative methods*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a054755d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>



**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 20838:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>

© ISO 2006

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)

Publié en Suisse

**Sommaire**

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Termes et définitions</b> .....	2
4 <b>Principe</b> .....	2
5 <b>Réactifs</b> .....	2
6 <b>Appareillage et matériel</b> .....	4
7 <b>Mode opératoire</b> .....	4
8 <b>Interprétation</b> .....	6
9 <b>Performances</b> .....	7
10 <b>Rapport d'essai</b> .....	7
Bibliographie.....	8

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

ISO 20838:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>

## 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 20837 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).

ITEH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 20838:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>

## Introduction

L'amplification et la détection de séquences d'acide nucléique cible sont réalisées afin de détecter la présence éventuelle de certaines séquences d'acides nucléiques dans la prise d'essai. Cette détermination dépend du caractère approprié des témoins et des limites de détection de la méthode analytique utilisée et de la prise d'essai analysée.

La présente Norme internationale décrit le mode opératoire permettant de détecter les micro-organismes pathogènes présents dans les aliments par une analyse des acides nucléiques extraits d'aliments, d'aliments pour animaux et d'échantillons environnementaux, ou de cultures ou de suspensions cellulaires préparées à partir de l'aliment. Les modes opératoires appropriés relatifs à la préparation des échantillons, la mise en culture des micro-organismes et l'extraction des acides nucléiques font l'objet d'une description séparée dans l'ISO 20837.

La présente Norme internationale s'intéresse essentiellement aux méthodes d'amplification par PCR. Cependant, au vu des évolutions constantes de la technologie relative à ce domaine, d'autres techniques d'amplification et méthodes de détection peuvent être envisagées.

La présente Norme internationale fait partie d'une série de normes 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*

La présente Norme internationale fait partie d'une série de normes 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);
- *Critères de performances pour les thermocycleurs* (ISO/TS 20836);
- *Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour des méthodes qualitatives* (ISO 20838).

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 ou plusieurs brevets intéressant la technologie 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 informé que les sociétés Applied Biosystems, Roche Molecular Systems Inc., et F. Hoffmann-La Roche Ltd., détiennent des droits de propriété concernant la technologie PCR. Les sociétés précitées ont donné l'assurance à l'ISO qu'ils consentent à négocier des licences avec des demandeurs du monde entier, à des termes et conditions raisonnables et non discriminatoires. À ce propos, la déclaration des détenteurs de ces droits de propriété est enregistrée à l'ISO. Des informations peuvent être demandées à:

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

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 20838:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>

# Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour les méthodes qualitatives

**AVERTISSEMENT** — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer l'intervention de produits, d'opérations et d'équipements à caractère dangereux. La présente norme n'a pas la prétention d'aborder tous les problèmes de sécurité concernés par son usage. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente norme d'établir des règles de sécurité et d'hygiène appropriées et de déterminer l'application des restrictions réglementaires avant utilisation.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale fournit le cadre de travail général des méthodes qualitatives pour la détection des micro-organismes pathogènes présents dans les aliments à l'aide de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Elle concerne les exigences générales relatives à l'amplification spécifique des séquences d'acide nucléique cible et à la détection et la confirmation de la nature de la séquence d'acide nucléique amplifiée.

Les lignes directrices, les exigences minimales et les caractéristiques de performances décrites dans la présente Norme internationale visent 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 et les matrices alimentaires ou isolés de ces derniers, mais elle peut également s'appliquer à d'autres matrices, par exemple les échantillons environnementaux, ainsi que pour la détection d'autres micro-organismes.

## 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 16140, *Microbiologie des aliments — Protocole pour la validation des méthodes alternatives*

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*

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 22174 s'appliquent.

### 4 Principe

#### 4.1 Généralités

Pour les besoins de la présente Norme internationale, l'analyse qualitative comprend le dépistage global et/ou la détection spécifique des séquences d'acides nucléique cible dans les échantillons d'essai. La spécificité peut être définie au niveau du genre, de l'espèce, ou à un niveau taxonomique inférieur.

Un résultat qualitatif doit indiquer clairement la présence ou l'absence de la séquence cible étudiée, en fonction des témoins appropriés et dans les limites de détection de la méthode analytique utilisée et de la prise d'essai analysée.

L'analyse est généralement constituée des opérations suivantes:

- a) l'amplification par PCR des séquences cibles spécifiques;
- b) la détection du produit PCR;
- c) la confirmation de l'identité du produit PCR; et/ou
- d) la confirmation au moyen d'une méthode de culture microbiologique normalisée (par exemple une Norme internationale).

ITEH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 20838:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a034735d-61e1-41c2-9024-72255dd9489c/iso-20838-2006>

### 5 Réactifs

Dans tous les cas, les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique et adaptés à des applications de biologie moléculaire. Il est généralement recommandé de préparer des aliquotes des solutions de réaction nécessaires à une méthode PCR et de les conserver dans des conditions appropriées, par exemple à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.1 ADN polymérase

Une polymérase thermostable (comprenant éventuellement une activité de transcriptase inverse) est utilisée pour la PCR. Il peut s'agir d'une enzyme naturelle purifiée ou d'une forme transgénique de l'enzyme, recombinée et purifiée.

Il convient de l'utiliser conformément aux instructions du fabricant.

Chaque ADN polymérase peut nécessiter des conditions expérimentales différentes, par exemple tampon, température.

#### 5.2 Transcriptase inverse

Cette enzyme est utilisée pour la transcription de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) simple brin pouvant être ultérieurement amplifié par PCR.

Il convient de l'utiliser conformément aux instructions du fabricant.



### 5.3 Solution tampon de réaction

Il convient d'utiliser la solution tampon appropriée conformément aux instructions du fabricant de l'enzyme. Des réactifs prêts à l'emploi sont disponibles dans le commerce. Les matériaux utilisés pour la préparation d'une solution tampon de réaction de PCR doivent être stables dans les conditions de stockage et de thermocyclage.

Il convient de l'utiliser conformément aux instructions du fabricant.

### 5.4 Désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), pour PCR

Des solutions contenant les désoxyribonucléosides triphosphates dATP, dCTP, dGTP, dTTP et/ou dUTP, selon le cas, de qualité requise pour la biologie moléculaire doivent être utilisées. Elles doivent rester stables pendant la période de conservation et dans les conditions de la PCR. Elles sont disponibles dans le commerce.

### 5.5 Amorces

Il convient de choisir les amorces à partir d'une séquence conçue spécifiquement pour détecter l'ADN du micro-organisme cible.

### 5.6 Eau

Pour la réaction d'amplification, il convient de toujours utiliser de l'eau exempte de DNase et de RNase. De l'eau ultrapure appropriée est disponible dans le commerce.

### 5.7 Chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>)

Ce composé est fourni sous forme soit d'un composant de la solution tampon de réaction, soit d'une solution séparée.

### 5.8 Produits chimiques pour la détection des produits PCR

Il convient que les produits chimiques utilisés pour le système de détection décrit dans une méthode PCR soient de qualité appropriée.

### 5.9 Réactifs supplémentaires optionnels

#### 5.9.1 Huile minérale

Elle est distribuée sur le mélange réactionnel afin de minimiser l'évaporation au cours des cycles thermiques de la PCR.

#### 5.9.2 Activateurs

Il s'agit de substances telles que le polyéthylène glycol ou l'albumine de sérum bovin qui peuvent être ajoutées à la réaction de PCR pour réduire l'effet inhibiteur de substances issues de la matrice <sup>[1]</sup>.

#### 5.9.3 Inhibiteurs de ribonucléase (RNase)

Ils sont ajoutés lors d'une RT-PCR afin d'empêcher la dégradation de l'ARN cible par des RNases susceptibles d'avoir contaminé les réactifs ou le matériel plastique utilisé lors de l'opération d'extraction. Les inhibiteurs de RNase sont disponibles dans le commerce.