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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Real-time polymerase
chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens —
General requirements and definitions*

ISO 22119:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 22119:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2011

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	1
4 Principe	5
4.1 Généralités	5
4.2 Sondes pour PCR en temps réel	5
5 Exigences générales relatives aux laboratoires	6
6 Réactifs et matériaux	6
7 Appareillage	7
8 Échantillon pour laboratoire	8
9 Mode opératoire	8
9.1 Préparation de l'échantillon	8
9.2 Amplification	8
9.3 Témoins	9
9.4 Analyse des données de fluorescence	9
10 Évaluation et documentation	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'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 22119 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).

[ISO 22119:2011](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

Introduction

Il a été démontré que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode spécifique rapide et sensible pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments. De nouveaux progrès technologiques permettent de détecter des produits PCR spécifiques générés par le processus d'amplification. Le principe repose sur l'excitation de marqueurs fluorescents pendant le processus PCR.

La présente Norme internationale fait partie d'une série de documents présentés sous le titre général *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments*:

ISO/TS 20836, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Essais de performance des thermocycleurs*

ISO 20837, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation 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 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*

ISO 22118, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection et la quantification des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Caractéristiques de performance*

ISO 22119, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions*

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*

La Spécification technique suivante est en cours d'élaboration:

ISO/TS 13136, *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la détection d'Escherichia coli produisant des Shiga-toxines (STEC) appartenant aux séro-groupes O157, O111, O26, O103 et O145 — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qualitative en temps réel*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 22119:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

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

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale définit les termes relatifs à la détection de micro-organismes pathogènes présents dans les aliments et les extraits obtenus à partir de ces aliments, en faisant appel à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La présente Norme internationale spécifie également les exigences relatives à l'amplification et à la détection des séquences d'acide nucléique (ADN ou ARN après transcription inverse) par une PCR en temps réel.

Les exigences minimales spécifiées dans la présente Norme internationale servent de base pour l'obtention de résultats comparables et reproductibles au sein d'un laboratoire et dans des laboratoires différents.

La présente Norme internationale peut également être utilisée, par exemple, pour la détection de micro-organismes pathogènes d'origine alimentaire dans des prélèvements environnementaux ainsi que dans les aliments pour animaux.

NOTE En raison de la rapidité des progrès dans ce domaine, les exemples fournis sont ceux les plus fréquemment utilisés au moment de l'élaboration de la présente Norme internationale.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

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 (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 20838, *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*

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 suivants s'appliquent.

3.1

réaction de polymérisation en chaîne en temps réel PCR en temps réel

méthode enzymatique combinant l'amplification in vitro de segments spécifiques d'ADN par un processus de dénaturation, d'hybridation d'amorces spécifiques et de synthèse de l'ADN avec la détection de produits PCR spécifiques pendant le processus d'amplification

NOTE 1 En général, le mélange réactionnel d'amplification contient une ou plusieurs sondes d'ADN spécifiques, associées à un ou plusieurs colorants fluorescents. Grâce à cette technologie, le signal est généré après hybridation spécifique des sondes avec la séquence d'acide nucléique cible et excitation par une lumière de longueur d'onde définie.

NOTE 2 L'utilisation de l'ADN non spécifique liée à des colorants fluorescents peut être appliquée si des résultats positifs sont vérifiés conformément à l'ISO 20838.

3.2

produit PCR

ADN amplifié par PCR

[ISO 22174:2005, 3.4.5]

3.3

transfert d'énergie de fluorescence par résonance

FRET

⟨détection des micro-organismes pathogènes présents dans les aliments par PCR⟩ transfert d'énergie entre une molécule donneuse et une molécule accepteuse, tributaire de la distance, aboutissant à une plus grande fluorescence de la molécule accepteuse après excitation par un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde définie

NOTE Extrait de la Référence [2].

3.4

reporter

donneur

⟨détection des micro-organismes pathogènes présents dans les aliments par PCR⟩ molécule fluorescente utilisée pour détecter l'hybridation de sondes spécifiques après excitation par un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde appropriée

3.5

quencher

capteur

⟨détection des micro-organismes pathogènes présents dans les aliments par PCR⟩ molécule fluorescente servant d'accepteur d'énergie et éteignant ainsi le signal de fluorescence du reporter (donneur)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

3.6

quencher (capteur) sombre

molécule servant d'accepteur, et n'émettant pas d'énergie dans un domaine spectral détecté par le système de détection optique de l'instrument de PCR en temps réel

3.7

activité exonucléasique 5'-3'

aptitude d'une enzyme, par exemple une polymérase d'acide nucléique, à cliver une molécule d'acide nucléique hybridée dans la direction 5'-3'

NOTE L'activité exonucléasique 5'-3' est spécifique à l'ADN bicaténaire. Elle dépend du type d'enzyme et peut se manifester par exemple avec les polymérases Taq, Tth et Tfl.

3.8

sonde fluorescente

oligonucléotide ou analogue d'oligonucléotide d'une séquence définie associée à une ou plusieurs molécules fluorescentes

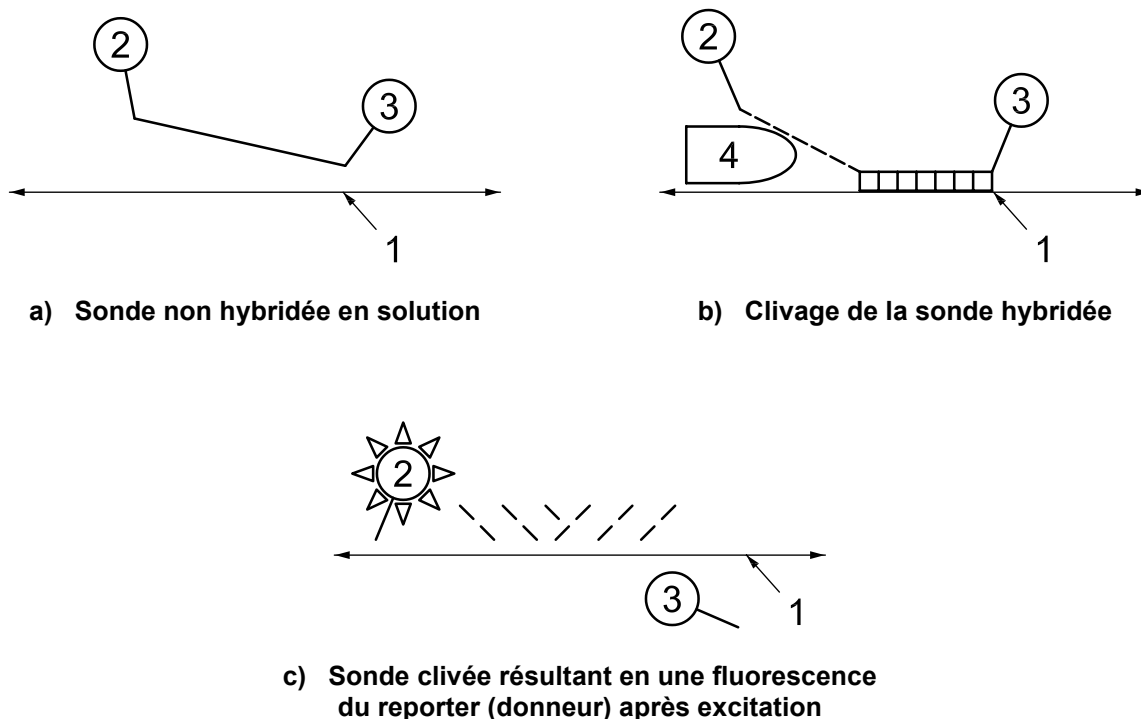
NOTE Tout système émettant un signal de fluorescence après hybridation spécifique à la séquence d'acide nucléique cible qui peut être détecté par l'équipement spécifique peut être utilisé comme sonde fluorescente.

3.9

sonde d'hydrolyse

sonde fluorescente associée à deux molécules fluorescentes qui subissent une séparation stérique du fait de l'activité exonucléasique 5'-3' de l'enzyme pendant le processus d'amplification

NOTE Le principe de la sonde d'hydrolyse est illustré à la Figure 1.



Légende

- 1 support ADN
- 2 molécule fluorescente (reporter)
- 3 molécule éteinte
- 4 enzyme

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 22119:2011

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

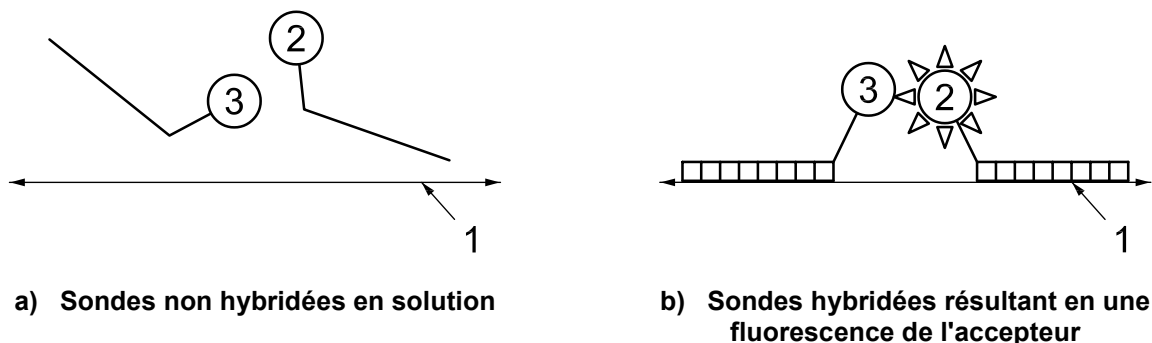
Figure 1 — Principe d'une sonde d'hydrolyse

3.10

sonde d'hybridation

système de deux sondes fluorescentes associées chacune à une molécule fluorescente, dans lequel une molécule sert de donneur et l'autre d'accepteur

NOTE Le principe de la sonde d'hybridation est illustré à la Figure 2.



Légende

- 1 support ADN
- 2 molécule accepteuse
- 3 molécule donneuse

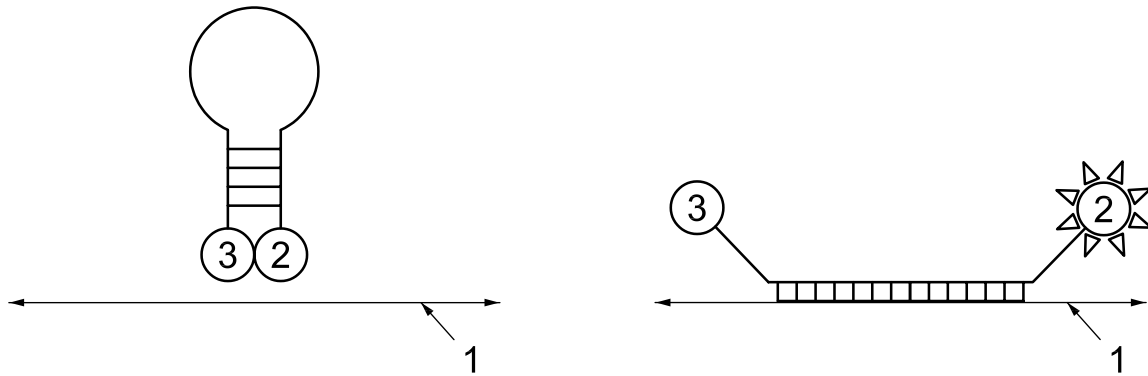
Figure 2 — Principe d'une sonde d'hybridation

3.11

balise moléculaire

sonde fluorescente constituée de trois parties différentes: une partie centrale complémentaire de la séquence d'acide nucléique cible, plus une partie 5' et une partie 3' complémentaires l'une de l'autre; le reporter (donneur) est fixé sur un bras de la molécule, l'extrémité de l'autre bras portant un quencher (capteur)

NOTE Le principe d'une balise moléculaire est illustré à la Figure 3.



a) Balise moléculaire non hybridée en solution b) Balise moléculaire hybridée résultant en une fluorescence du reporter (donneur)

Légende

- 1 support ADN
- 2 molécule fluorescente (reporter)
- 3 molécule éteinte

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Figure 3 — Principe d'une balise moléculaire

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c39004e8-99bb-46f1-8296-9be0707d9b5b/iso-22119-2011>

3.12

sonde de détection d'une séquence d'ADN d'un micro-organisme pathogène spécifique

sonde dont une séquence est complémentaire de l'ADN d'un micro-organisme pathogène et dont le reporter (donneur) émet un signal de longueur d'onde définie qui peut être détecté par le système de détection optique

3.13

sonde de détection d'une séquence d'acide nucléique d'un témoin interne

sonde comprenant un reporter (donneur) et conçue pour confirmer les performances de l'amplification

NOTE 1 La sonde émet un signal qui se distingue facilement du signal de la sonde conçue pour détecter un micro-organisme pathogène spécifique.

NOTE 2 La mise en œuvre de témoins internes nécessite l'utilisation d'un instrument capable de détecter des signaux de différentes longueurs d'onde.

3.14

référence passive

molécules fluorescentes présentes dans le mélange réactionnel, utilisées pour normaliser le signal

NOTE Il peut s'agir de séquences d'acide nucléique couplées ou d'autres molécules n'intervenant pas dans la réaction.

3.15

ligne de base de niveau de détection de fluorescence

«ligne de base»

point auquel une réaction atteint une intensité de fluorescence supérieure au bruit de fond

3.16**bruit de fond de fluorescence**

«bruit de fond»

niveau intrinsèque de fluorescence résultant des réactifs et des consommables utilisés

3.17**point de franchissement du cycle seuil**

point de la courbe d'amplification à partir duquel le signal de fluorescence s'élève au-dessus de la ligne de base ou franchit un seuil prédéfini

4 Principe**4.1 Généralités**

L'analyse PCR en temps réel comprend généralement:

- a) l'amplification de séquences cibles spécifiques par PCR en présence de sondes fluorescentes;
- b) la liaison des sondes fluorescentes pendant chaque cycle d'amplification;
- c) la génération d'un signal de fluorescence par excitation pendant chaque cycle;
- d) la surveillance des signaux de fluorescence par le système de détection optique;
- e) l'analyse des données.

NOTE À des fins de criblage, les signaux de fluorescence émis par des colorants se liant à l'ADN bicaténaire peuvent également être utilisés.

4.2 Sondes pour PCR en temps réel**4.2.1 Sondes d'hydrolyse**

La sonde d'hydrolyse est un oligonucléotide spécifique présent dans l'analyse PCR avec les amorces de PCR. Une extrémité de la sonde porte une molécule reporter (donneur), fluorescente, dont le spectre d'émission est éteint par une seconde molécule située à l'autre extrémité.

La sonde s'hybride sur la séquence d'acide nucléique cible. Lors de la phase d'extension, l'activité exonucléasique 5'-3' de l'ADN polymérase clive la sonde hybridée. Après le clivage, le reporter (donneur) est séparé du quencher (capteur), ce qui engendre une augmentation de l'intensité de la fluorescence du reporter (donneur). Le signal de fluorescence obtenu est proportionnel à la production d'un produit PCR spécifique.

Il convient de bloquer l'extrémité 3' de la sonde pour empêcher son extension pendant la PCR.

4.2.2 Sondes d'hybridation

Deux sondes d'hybridation sont présentes dans l'analyse PCR sous forme d'oligonucléotides spécifiques en plus des amorces de PCR. Ces sondes, contenant chacune une molécule fluorescente dont l'une sert de donneur et l'autre d'accepteur, s'hybrident aux séquences d'acide nucléique cible. Après l'hybridation, les deux colorants sont extrêmement proches, permettant ainsi un transfert d'énergie de fluorescence par résonance lors de l'excitation, et la molécule accepteuse génère un signal détectable. Le signal de fluorescence obtenu est proportionnel à la production d'un produit PCR spécifique.

Il convient de bloquer l'extrémité 3' des sondes pour empêcher son extension pendant la PCR.