

Première édition
2005-11-01

AMENDEMENT 1
2013-04-15

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

iTeh STANDARD PREVIEW
AMENDEMENT 1
(standards.iteh.ai)

*Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid
based methods*

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013)

[0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013)

AMENDMENT 1



Numéro de référence
ISO 21570:2005/Amd.1:2013(F)

© ISO 2013

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 21570:2005/Amd 1:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au 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

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'Amendement 1 à l'ISO 21570:2005 a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21570:2005/Amd 1:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013>

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

AMENDEMENT 1

Dans le présent amendement, la numérotation des notes de bas de page n'a pas fait l'objet d'une mise à jour permettant de l'adapter à la numérotation adoptée dans l'ISO 21570:2005. Les renvois de note de bas de page indiqués sont donnés pour utilisation uniquement comme références au sein du présent amendement.

Page 1, Article 2

Mettre à jour les trois premières références comme suit et supprimer la note de bas de page 1).

ISO 21569:2005 + Amd.1:2013, *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*

ISO 21571:2005 + Amd.1:2013, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Extraction des acides nucléiques*

ISO 24276:2006 + Amd.1:2013, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Exigences générales et définitions*

Page 3, 7.1, dernier alinéa; Page 9, A.1.5.1; Page 16, B.1.5.1; Page 24, C.1.5.1; Page 32, C.2.5.1; Page 40, C.3.5.1; Page 48, C.4.5.1; Page 56, C.5.5.1; Page 64, C.6.5.1; Page 72, C.7.5.1; Page 80, C.8.5.1; Page 88, C.9.5.1; Page 96, D.1.5.1; Page 103, D.2.5.1

Remplacer «ISO 24276» par «ISO 24276:2006».

Pages 4 et 5, Articles 8 à 10

Remplacer le texte existant par le texte suivant.

Interprétation

Le résultat de la PCR sera soit a) soit b).

- a) Approprié pour quantifier la séquence cible fournie si
- le résultat est positif conformément à l'ISO 21569:2005, 8.1;
 - l'inhibition de la réaction observée n'est pas significative;
 - l'analyse produit des mesures sans équivoque;
 - la quantification de la séquence cible se situe dans la gamme dynamique de la méthode;

— l'analyse est étalonnée de façon acceptable (voir 7.3).

b) Inadapté pour quantifier la séquence cible si l'une des conditions indiquées en a) n'est pas remplie.

Interprétation de résultats non cohérents obtenus pour la même prise d'essai: en cas de résultats +/- pour les deux réplicats, répéter les deux PCR pour la prise d'essai considérée. Si les deux nouveaux réplicats donnent des résultats +/- ou -/-, le résultat est considéré comme négatif.

Interprétation de résultats non cohérents obtenus entre deux prises d'essai: en cas de résultats +/- pour les deux prises d'essai d'un échantillon, les extractions et les analyses de deux nouvelles prises d'essai doivent être refaites. Si ces résultats s'avèrent à nouveau +/-, alors le résultat est considéré comme négatif conformément à l'ISO 24276:2006, 6.3.

L'incertitude de mesure doit être suffisamment faible pour permettre au laboratoire d'en tirer des conclusions pertinentes.

Les Annexes A à D décrivent le mesurage des quantités d'ADN cible. Ces quantités peuvent être utilisées pour déterminer le contenu en OGM. Ces opérations prennent en compte les facteurs biologiques pertinents tels que l'homozygotie ou l'hétérozygotie des séquences cibles.

Si le contenu en séquences cibles GM ou en séquences cibles basées sur les taxons est inférieur à la limite de quantification, alors les résultats doivent être seulement exprimés qualitativement.

NOTE L'expression d'un contenu en ADN OGM inférieur à la LQ pratique (accompagné d'une justification de cette LQ) est considérée comme l'expression d'un résultat positif.

9 Expression des résultats

Les résultats doivent clairement indiquer la quantité de séquence cible GM en fonction de la séquence spécifique des taxons cibles. Il convient également de fournir les résultats relatifs aux valeurs d'incertitude de mesure, comme l'écart-type ou le coefficient de variation. En outre, il convient que la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) de la méthode ainsi que la LD et la LQ pratiques soient consignées. Il convient d'indiquer que le résultat concerne uniquement des cibles OGM. Pour l'analyse de criblage quantitatif portant sur des matrices complexes, il est recommandé de préciser si le signal OGM peut venir de taxons qui n'ont pas de lien avec la cible.

Les séquences cibles peuvent être ou non détectées, ou la quantité de l'une d'entre elles peut être inférieure à la limite de quantification. Le Tableau 1 décrit les quatre cas alternatifs et l'expression du résultat correspondant à inclure dans le rapport d'essai.

Le contenu en ADN OGM peut être également rapporté comme étant supérieur ou inférieur à une valeur particulière, tout en prenant en compte l'incertitude de mesure.

Tableau 1 — Expression des résultats

Résultat	Expression du résultat
La séquence spécifique des taxons cibles n'est pas détectée.	«Pour l'espèce X, l'ADN n'a pas été détecté.»
La séquence spécifique des taxons cibles est détectée alors que la séquence cible GM ne l'est pas.	Conformément à l'ISO 21569. «Pour l'échantillon X, la séquence cible GM Y n'a pas été détectée. La LD de la méthode est de x %, mesurée à partir d'ABC (identifier le matériel de référence).» S'il est impossible de prouver que la taille de l'échantillon pour essai et la quantité d'ADN cible dans la PCR sont suffisantes pour appliquer la LD, alors la phrase suivante doit être ajoutée: «Cependant, la quantité de l'ADN cible extrait de l'espèce X peut être/ était insuffisante pour que la LD soit applicable à cet échantillon. La LD de l'échantillon est de x %.» (Spécifier l'unité de mesure utilisée.) NOTE La LD de l'échantillon est déterminée par la quantité relative d'ADN de l'espèce introduite dans la réaction analytique (nombre de copies), et par rapport à la LD absolue de la cible GM (nombre de copies) et dans le cas des graines et des semences, le nombre de graines ou de semences dans la portion qui a été broyée.
La séquence spécifique des taxons cibles et la séquence cible GM sont toutes les deux détectées mais la quantité obtenue est inférieure à la LQ pour au moins une des séquences cibles.	Pour chaque OGM, indiquer: «Le contenu en ADN OGM (spécifier le type d'OGM) tel que déterminé par la détection de (spécifier la séquence cible) provenant de (spécifier l'espèce) a été détecté, mais sa valeur était inférieure à la limite de quantification pratique.» En outre, le cas échéant: «La limite de quantification pratique est de x %.» (Spécifier l'unité de mesure utilisée.)
La séquence spécifique des taxons cibles et la séquence cible GM sont toutes les deux détectées et leur quantité est supérieure à la LQ des deux séquences cibles.	Pour chaque OGM, indiquer: «Le contenu en ADN OGM (spécifier l'OGM) tel que déterminé par la détection de (spécifier la séquence cible) provenant de (spécifier l'espèce) est de $x \pm u_{\text{meas}} \%$ où u_{meas} est l'incertitude de mesure.» (Spécifier l'unité utilisée.)

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit être rédigé conformément à l'ISO 24276 et l'ISO 21569 et doit contenir au moins les informations complémentaires suivantes:

- la LQ de la méthode et la matrice utilisée pour l'établir;
- la LQ pratique;
- une référence à la méthode d'extraction de l'ADN utilisée;
- une référence aux méthodes employées pour l'amplification des séquences ADN cibles;
- le matériel de référence utilisé;
- les résultats exprimés conformément à l'Article 9;
- la cible PCR, en particulier si cette cible est considérée comme «spécifique de l'événement» ou «spécifique du construit», ou comme un «criblage»;
- la définition de l'incertitude de mesure utilisée.

NOTE Pour les points g) et h), les informations peuvent figurer dans différents documents (par exemple revue de contrat, fiches techniques).

Page 12, Annexe A

Ajouter A.2 et A.3.

A.2 Méthode spécifique du taxon cible pour détecter l'ADN de riz

A.2.1 Principe

Le gène *SPS* du riz a été décrit comme un gène endogène de référence, parfaitement adapté pour identifier et quantifier du riz génétiquement modifié (Référence [59]). Le laboratoire de détection des OGM de l'Université Jiao Tong de Shanghai (GMDL-SJTU) a organisé un essai interlaboratoires pour valider l'applicabilité du gène codant pour la saccharose phosphate synthase (*SPS*) du riz comme gène endogène pour l'analyse quantitative du riz génétiquement modifié (GM) ou non génétiquement modifié (non-GM). Douze laboratoires situés en Espagne, en Corée, en Lituanie, en Slovénie, au Japon, en Italie et en Chine ont participé à cet essai.

Le mode opératoire de l'essai interlaboratoires comprenait les modules suivants.

- PCR quantitative en temps réel pour quantifier des échantillons d'ADN de riz sélectionnés en aveugle pour construire des courbes étalons.
- PCR quantitative en temps réel pour quantifier des échantillons d'ADN de tomate sélectionnés en aveugle à l'aide des courbes étalons construites.

L'essai interlaboratoires a été réalisé conformément aux lignes directrices suivantes reconnues au niveau international:

- ISO 5725^[51]-^[56]; <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013>
- protocole pour la conception, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes de l'IUPAC (Référence [12]).

Les résultats de cet essai interlaboratoires ainsi que le protocole correspondant sont indiqués en A.2.3.3.

A.2.2 Domaine d'application

La méthode a été optimisée pour les grains de riz et ses produits dérivés contenant des mélanges de riz et d'autres matrices comme le maïs et le soja. L'applicabilité du gène *SPS* a été évaluée lors d'essais interlaboratoires en utilisant des échantillons d'ADN extraits de grains de riz.

A.2.3 Statut de validation et critères de performance

A.2.3.1 Robustesse de la méthode

La robustesse du système de PCR quantitative en temps réel appliqué au gène *SPS* a été évaluée par le concepteur de la méthode sur différents programmes d'amplification (c'est-à-dire en deux ou trois phases) et sur trois échantillons différents d'ADN contenant des quantités connues d'ADN de riz (échantillons d'ADN génomique de riz de 10 ng, 1 ng et 0,1 ng). Pour chaque échantillon, trois répétitions ont été effectuées. Les systèmes de PCR quantitative en temps réel ont démontré leur robustesse et ont parfaitement fonctionné aux différents programmes d'amplification et pour les trois concentrations utilisées pour les échantillons d'ADN de riz.

Le système de PCR quantitative appliqué au gène *SPS* a également été soumis à essai sur d'autres instruments de PCR en temps réel (Rotor gene 3000A¹⁾, Corbett Research et ABI7700¹⁾, Applied Biosystems), en utilisant trois volumes de réaction différents (20 µl, 25 µl et 30 µl; trois répétitions par volume). Le système de PCR quantitative en temps réel a démontré sa robustesse et a parfaitement fonctionné sur les divers instruments de PCR en temps réel et avec les différents volumes de réaction.

A.2.3.2 Essai intralaboratoire

Pour la préparation des échantillons, tous les échantillons d'ADN ont été extraits à l'aide de la méthode au bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) tirée de l'ISO 21571. La quantification spectrométrique de la quantité d'ADN total extrait a été effectuée en utilisant la méthode tirée de l'ISO 21571:2005, B.1. Après la quantification de l'ADN, une analyse PCR quantitative en temps réel a été réalisée pour déterminer si la réaction PCR pouvait être inhibée.

Trois chercheurs ont soumis à essai le système PCR appliqué au gène *SPS* en utilisant l'ADN génomique de riz. Les résultats étaient satisfaisants; en particulier, pour la PCR quantitative, le biais était inférieur de 25 % par rapport à la gamme dynamique (c'est-à-dire entre 0,05 ng et 1,00 ng).

A.2.3.3 Essai interlaboratoires

La PCR quantitative a été utilisée pour établir des courbes étalons à partir d'échantillons d'ADN dilués en série extraits de quatre cultivars de riz par le laboratoire GMDL-SJTU. L'efficacité de la réaction PCR du système de PCR appliqué au gène *SPS*, calculée à partir de la pente de la courbe étalon à l'aide de la formule $(10^{-1/a} - 1) \times 100$, où a est la pente, comprise entre 0,846 3 et 1,223 3, et du coefficient de régression de la linéarité, R_c^2 , était en moyenne égale à 0,997.

Le Tableau A.5 présente les résultats des huit échantillons d'ADN sélectionnés en aveugle. Ces résultats sont évalués sur la base des critères d'acceptation et des exigences de performance de la méthode, établis par le Réseau européen de laboratoires sur les OGM (ENGL) et adoptés par le Laboratoire européen de référence pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés (EU-RL GMFF) (Référence [60]). Le Tableau A.5 indique les estimations de répétabilité et de reproductivité pour chaque concentration de riz, après identification et suppression des valeurs aberrantes par l'essai de Cochran.

1) Exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

Tableau A.5 — Résultats obtenus pour la PCR quantitative en temps réel

Paramètre	Échantillons sélectionnés en aveugle							
	0,5 ng	0,5 ng	1ng	1 ng	2 ng	5 ng	5 ng	10 ng
Laboratoires présentant des résultats	12	12	12	12	12	12	12	12
Échantillons par laboratoire	1	1	1	1	1	1	1	1
Nombre de données total	108	108	108	108	108	108	108	108
Données exclues	4	2	0	8	0	0	0	0
Raison invoquée pour l'exclusion	Essai de Cochran	Essai de Cochran	—	Essai de Cochran	—	—	—	—
Valeur moyenne	0,407 8	0,412 1	0,814 6	0,734 4	1,857 5	5,261 0	5,445 7	10,889 6
Écart-type de répétabilité	0,058 3	0,071 9	0,143 5	0,111	0,336 2	0,936 4	1,142 7	1,867 7
Coefficient de variation de répétabilité, %	14,29	17,44	17,62	15,11	18,10	17,80	20,98	17,15
Écart-type de reproductibilité	0,130 2	0,061 8	0,249 6	0,092 7	0,201 3	0,810 9	0,989 6	1,617 5
Coefficient de variation de reproductibilité, %	31,92	14,99	30,65	12,63	10,84	15,41	18,17	14,85
Biais, valeur absolue	0,092 2	0,087 8	0,185 3	0,265 5	0,142 4	-0,261 0	-0,445 8	-0,889 6
Biais, %	-18,44	-17,57	-18,54	-26,53	-7,12	5,22	8,92	8,90

ISO 21570:2005/Amd 1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/87c2eba2-0b40-4c94-8277-0451dc063025/iso-21570-2005-amd-1-2013>

A.2.3.4 Sélectivité moléculaire

A.2.3.4.1 Généralités

Le Tableau A.6 répertorie les amorces et la sonde ciblant le fragment d'ADN du gène *SPS* de 81 pb.

Tableau A.6 — Séquences des amorces et de la sonde oligonucléotidiques

Nom	Séquence ADN des oligonucléotides (sens 5'-3')
Séquence des amorces et de la sonde pour PCR quantitative en temps réel	
Amorce F <i>SPS</i>	TTgCgCCTgAACggATAT
Amorce R <i>SPS</i>	CggTTgATCTTTTCgggATg
Sonde <i>SPS</i>	HEX- TCCgAgCCgTCCgTgCgTC -TAMRA

A.2.3.4.2 Expérience

Les échantillons d'ADN extraits de matériels provenant de onze plantes différentes (dont le riz) ont été analysés à l'aide de la méthode PCR appliquée au gène *SPS*. Sur les onze échantillons, seul l'ADN de riz a donné des résultats positifs. Les dix autres échantillons (c'est-à-dire le bambou, la sétaire verte, l'orge, le blé, le millet sauvage, le colza, la tomate, la patate, le soja et l'*Arabidopsis*) se sont révélés négatifs.

Les échantillons d'ADN extraits de douze cultivars de riz différents ont été analysés à l'aide de la méthode PCR spécifique développée pour détecter le gène *SPS*. Les douze échantillons ont donné des résultats positifs.

A.2.3.4.3 Théorie

La spécificité théorique des amorces et de la sonde pour le gène *SPS* a été évaluée par une recherche de similitude à l'aide du programme BLASTN 2.0MP-WashU (Référence [64], date de la recherche: 2010-01-09). La séquence de 81 pb utilisée comme séquence de recherche est référencée sous le numéro NCBI U33175 (nucléotides 1055-1135). Les résultats de la recherche avec le programme Blast ont confirmé l'identité totale de la séquence de recherche avec la séquence du gène *SPS* du riz, et l'absence de similitude avec d'autres gènes et espèces.

A.2.4 Principe et résumé

Un fragment de 81 pb du gène *SPS* est amplifié en utilisant deux amorces spécifiques du gène *SPS* du riz. L'accumulation de produits PCR est mesurée à la fin de chaque cycle PCR (en temps réel) à l'aide d'une sonde oligonucléotidique spécifique du gène *SPS* du riz marquée avec deux colorants fluorescents: FAM, utilisé comme rapporteur, et TAMRA, utilisé comme «quencher» (voir le Tableau A.6). À cet effet, la chimie TaqMan®¹) est utilisée. Le signal de fluorescence mesuré dépasse une valeur seuil définie par l'utilisateur après un certain nombre de cycles. Ce nombre est appelé valeur C_t . Pour la quantification de la quantité d'ADN du gène *SPS* du riz dans un échantillon inconnu, la valeur C_t est convertie en une valeur du nombre de copies correspondante par comparaison avec une courbe d'étalonnage dont les valeurs C_t sont directement liées aux nombres de copies connus (analyse de régression).

A.2.5 Termes et définitions

Pour les besoins du présent article, les termes et définitions donnés dans l'ISO 5725-1^[51] et l'ISO 24276 s'appliquent.

A.2.6 Type et quantités d'échantillon

Pour cet essai interlaboratoires, la construction des courbes étalons a été effectuée en utilisant des échantillons d'ADN extraits de grains provenant de quatre cultivars de riz. Huit échantillons sélectionnés en aveugle ont ensuite été analysés en utilisant les quatre courbes étalons construites.

Les participants ont reçu les échantillons suivants.

- Quatre échantillons d'ADN provenant de différentes variétés de riz (3M, variété Indica provenant des États-Unis; Balilla, variété Japonica provenant d'Italie; Guangluai, variété Indica provenant du sud de la Chine et Shennong265, variété Japonica d'origine chinoise). Chaque échantillon avait une concentration de 50 ng/μl pour un volume de 30 μl chacun. Chaque ADN de cultivar de riz a été dilué et utilisé pour générer la courbe étalon correspondante.
- Huit échantillons d'ADN de riz sélectionnés en aveugle provenant de quatre variétés différentes de riz (concentrations variant entre 0 ng/μl et ~50 ng/μl), pour un volume de 50 μl chacun.
- Témoin négatif d'ADN cible (étiqueté N): ADN de sperme de saumon (20 ng/μl).
- Témoin positif d'ADN cible (étiqueté P): ADN génomique (Guangluai4) (20 ng/μl). Tous les échantillons d'ADN ont été purifiés en utilisant la méthode CTAB établie par le GMDL-SJTU. Les témoins négatifs et positifs d'ADN cible ont été utilisés pour chaque plaque PCR.
- Les amorces et les sondes pour le système PCR appliqué au gène *SPS* (voir le Tableau A.6) et les réactifs pour d'autres réactions étaient les suivants:
 - solution Master Mix pour PCR en temps réel (1 ml × 6);
 - solution pour diluer l'ADN (0,1× TE, 1,2 ml).

A.2.7 Limite de quantification (LQ), domaine d'utilisation

Conformément à la méthode utilisée, la LQ absolue de la méthode est de 0,01 ng/μl. La LQ relative de la PCR quantitative n'a pas été évaluée lors d'un essai interlaboratoires.