

Première édition
2005-02-15

AMENDEMENT 1
2013-03-15

**Produits alimentaires — Méthodes
d'analyse pour la détection des
organismes génétiquement modifiés
et des produits dérivés — Extraction
des acides nucléiques**

AMENDEMENT 1

iTeh STANDARD PREVIEW

*Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction*

AMENDMENT 1

ISO 21571:2005/Amd 1:2013

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-
b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013)



Numéro de référence
ISO 21571:2005/Amd.1:2013(F)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21571:2005/Amd 1:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-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 21571:2005 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/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21571:2005/Amd 1:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/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

AMENDEMENT 1

Page v, Introduction

Supprimer la référence à l'ISO 21568.

Remplacer la référence à l'ISO 24276 par ce qui suit:

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

Page 1, Article 2

Remplacer la référence à l'ISO 24276:— par ce qui suit:

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

Supprimer la référence à la note de bas de page 1) ainsi que la note de bas de page elle-même.

Supprimer la référence à l'ISO 21568.

Page 3, 5.1.1, alinéa 2, ligne 2

Supprimer «par exemple 3 000 particules pour une limite de détection de 0,1 %, afin de permettre une analyse statistiquement valable (voir l'ISO 21568)».

Page 3, 5.1.2, alinéa 1, ligne 2

Remplacer «conformément aux procédures décrites dans l'ISO 24276» par «conformément à la conception du laboratoire spécifiée dans l'ISO 24276:2006, 5.3.2».

Page 3, 5.1.2, alinéa 2

Remplacer le texte existant par «Les échantillons de laboratoire doivent être suffisamment homogènes avant de les réduire ou broyer et avant de prélever la prise d'essai.»

Page 3, 5.1.2, alinéa 4, lignes 4 et 7

Supprimer «conformément à l'ISO 21568».

Page 3, 5.1.2, alinéa 8

Remplacer la première phrase par «Après ce traitement, homogénéiser l'ensemble de l'échantillon de laboratoire.»

Page 5, 5.2.1, alinéa 7

Après la phrase «Remettre l'ADN en solution dans l'eau ou dans une solution tampon qui évite la dégradation de l'ADN», insérer un exemple comme suit:

EXEMPLE Un tampon tris/EDTA (TE, 1× ou 0,1×) ajusté à pH 8,0 est approprié pour remettre l'ADN en solution ou le diluer.

Page 5, 5.3.1, alinéa 1

Ajouter une nouvelle phrase à la fin de l'alinéa:

«Il convient de déterminer la quantité totale d'ADN utilisé pour la PCR. La quantité totale d'ADN taxonomique cible doit également être considérée car l'ADN taxonomique non cible peut affecter le rendement de la PCR.»

Page 6, Article 6, alinéa 2

Remplacer la phrase entre parenthèses par «(par exemple si l'analyse à effectuer est une PCR, il convient d'évaluer la qualité de l'ADN extrait en utilisant des contrôles PCR appropriés).»

ITh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Page 10, A.1.1.6.5

Remplacer 2) par 1) et renuméroté la note de bas de page.

ISO 21571:2005/Amd 1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013>

Page 11, A.1.1.8

Remplacer 3) par 2) et renuméroté la note de bas de page.

Page 20, A.1.4.2, alinéa 2

Supprimer la phrase: «Cette méthode appliquée aux fragments microbiens ou aux couches de mycélium a été soumise à des essais de validation interlaboratoires [17].»

Page 35, après A.5.1.8, ajouter A.5.2

A.5.2 Méthode à la guanidine - chloroforme: protocole pour lécithine de soja

A.5.2.1 Objectif, pertinence et base scientifique

La lécithine de soja est un ingrédient couramment utilisé dans de nombreux produits alimentaires comme émulsifiant. Elle peut être produite en utilisant du soja génétiquement modifié (GM) ou non. La méthode décrite ici permet d'extraire l'ADN présent dans l'échantillon afin de procéder à des analyses ultérieures par PCR pour détecter les séquences d'ADN génétiquement modifiées dérivées de sojas GM.

La méthode est fondée sur la Référence [44], et un mode opératoire très similaire a été validé dans le cadre d'un essai interlaboratoires réalisé en Suisse. Lors de cette étude, la quantité d'ADN extrait a été déterminée par spectrométrie (Référence [35], section 1.3) à des fins d'interprétation. L'Institut chimique et vétérinaire de Fribourg (Allemagne) a réalisé un essai interlaboratoires complémentaire

avec 12 laboratoires participants et la quantité d'ADN de soja extractible et amplifiable a été déterminée par une PCR quantitative en temps réel. Pour les résultats, voir la Référence [45].

A.5.2.2 Domaine d'application

Cette méthode décrit un mode opératoire pour extraire l'ADN des lécithines de soja des huiles végétales brutes et pressées à froid. Si la teneur en ADN de l'échantillon est faible, la technique de PCR en temps réel est utilisée pour quantifier l'ADN isolé à partir d'une prise d'essai, et pour calculer la limite de détection pratique qui peut être obtenue lors de l'analyse par PCR de l'ADN extrait.

A.5.2.3 État de validation et critères de performance

A.5.2.3.1 Critères de validation

La méthode décrite dans le présent paragraphe a été validée dans le cadre d'un essai interlaboratoires en déterminant la quantité d'ADN de soja extractible et amplifiable par une PCR quantitative en temps réel. L'étude interlaboratoires a été réalisée selon le protocole IUPAC (Référence [46]).

A.5.2.3.2 Robustesse de la méthode

La méthode a été utilisée en routine pendant plus de 10 ans dans les laboratoires privés d'essais sur les OGM et les laboratoires de contrôle allemands et suisses, et aucun problème n'a été rapporté. Bien qu'aucune donnée spécifique sur la robustesse (par exemple en modifiant les paramètres de la méthode) ne soit disponible, les expériences des laboratoires ont montré que de faibles variations des conditions n'affectent pas les performances de la méthode.

A.5.2.3.3 Essai intralaboratoire

Les matériels utilisés dans le cadre de l'essai interlaboratoires ont été soumis à essai dans le laboratoire des développeurs de la méthode afin de déterminer la fidélité intralaboratoire de la méthode.

Pour estimer la fidélité de la méthode, cinq extractions d'ADN de chacune des cinq lécithines de soja ont été réalisées et mesurées par PCR en temps réel dans des conditions de répétabilité, en utilisant une méthode spécifique aux gènes de lécithine de soja, conformément à l'ISO 21570:2005^[41], C.2. Les résultats sont indiqués dans le Tableau A.6.

Tableau A.6 — Validation intralaboratoire de la méthode d'extraction d'ADN avec cinq échantillons de lécithine de soja ($n = 5$ extractions chacun)

Échantillon de lécithine n°	Nombre moyen de copies de lectine	Écart-type de répétabilité, s_r nombre de copies	Coefficient de variation de répétabilité, $C_{V,r}$ %
1	20 464	5 367	26
2	3 203	620	19
3	2 005	306	15
4	6 978	331	5
5	14	8	61

Avant l'essai interlaboratoires, l'ADN a été extrait de cinq lécithines de soja du commerce et l'effet inhibiteur de PCR a été soumis à essai. L'ADN préparé à partir de chaque échantillon a été dilué dans un tampon TE (1 volume d'ADN dilué dans 4 volumes de TE; 1 volume de première dilution d'ADN dilué dans 4 volumes de TE, 1 volume de seconde dilution d'ADN dilué dans 4 volumes de TE). Les préparations d'ADN étaient exemptes d'inhibiteurs de PCR car il s'est avéré que la différence entre la valeur C_t calculée (extrapolée) de l'échantillon non dilué d'ADN et la valeur C_t mesurée de chaque préparation d'ADN était inférieure à 0,1.

A.5.2.3.4 Essai interlaboratoires

Un essai interlaboratoires (étude de validation) a été réalisé dans 12 laboratoires (Référence [45]). Cinq échantillons de lécithine de soja du commerce ont été utilisés. Chaque laboratoire a reçu 15 échantillons codés et un étalon d'ADN pour l'étalonnage. Les échantillons ont été répartis de manière que chaque participant reçoive trois échantillons identiques de chacune des cinq lécithines de soja. Chaque laboratoire a réalisé une seule extraction d'ADN par échantillon. Les résultats remis ont été affectés aux cinq échantillons différents de lécithine pour l'évaluation de l'essai interlaboratoires.

Les ADN extraits ont été soumis à essai par PCR en temps réel en amplifiant une séquence d'ADN du gène de lectine de soja conformément à la méthode l'ISO 21570:2005[41], C.2. L'étalon d'ADN pour l'étalonnage a été préparé à partir de farine de soja [ERM BF410a³⁾] en utilisant le Plant Mini Kit³⁾ (Qiagen, Hilden/Allemagne) et en débutant par une extraction au CTAB (voir A.3). La concentration d'ADN a été estimée par la méthode de fluorométrie PicoGreen³⁾ dsDNA (Référence [17]). Les étalons d'ADN ont été définis par le nombre de copies (cp) en équivalents génome haploïde par microlitre. Pour les calculs, la masse supposée de génome haploïde du soja était de 1,13 pg. Une série de dilutions a été réalisée, variant de 50 000 cp/5 µl environ à 80 cp/5 µl. Sept laboratoires ont utilisé des équipements de PCR en temps réel ABI³⁾ (ABI 7000, 7500, 7700), et cinq laboratoires ont utilisé le Light Cycler³⁾ (Roche) en apportant les modifications suivantes au protocole décrit dans l'ISO 21570:2005[41], C.2: la PCR a été réalisée dans un volume final de 20 µl contenant le mélange maître PCR QuantiTect Probe³⁾ (Qiagen), les amorces GM1-F et GM1-R à 500 nmol/l chacune et 150 nmol/l de sonde GM1. Le programme de PCR en temps réel était: étape initiale de 900 s à 95 °C, puis 45 cycles de 10 s à 95 °C, 30 s à 60 °C et 30 s à 72 °C. Les signaux de fluorescence ont été acquis à l'étape d'élongation. La vitesse de la rampe de température était fixée à 2 °C/s.

Pour vérifier l'adéquation de la méthode, la limite de détection pratique, LOD_{prac}, a été déterminée pour le soja génétiquement modifié, conformément à l'ISO 24276. La valeur a été calculée individuellement pour chaque échantillon à l'aide de la Formule (A.1):

$$LOD_{\text{prac}} \% = \frac{LOD_{\text{abs}}}{c_{s, \text{DNA}}} \times 100 \quad \text{ISO 21571:2005/Amd 1:2013} \quad (\text{A.1})$$

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cc188997-c48e-419f-a888-b38b24dca9f5/iso-21571-2005-amd-1-2013>

où

LOD_{abs} est la LOD de la méthode PCR en temps réel spécifique à l'événement et utilisée pour la quantification, en copies par PCR;

NOTE Pour les calculs du Tableau A.7, une LOD de 10 copies est supposée.

c_{s, DNA} est la quantité d'ADN de soja amplifiable dans l'échantillon, en copies par PCR, déterminée par la méthode PCR en temps réel spécifique à un gène de référence du soja.

Le Tableau A.7 récapitule les résultats de l'essai interlaboratoires. Dans quatre échantillons de lécithine sur cinq, des valeurs moyennes de LOD_{prac} inférieures à 0,9 % (exemple pour un seuil législatif en vigueur) ont été obtenues. Pour l'échantillon de lécithine n° 2, la LOD_{prac} était supérieure à 0,9 % dans un seul laboratoire, pour l'échantillon de lécithine n° 3 dans deux laboratoires. Pour l'échantillon de lécithine n° 5, tous les laboratoires ont amplifié moins de 80 copies du gène de lectine et, par conséquent, une LOD_{prac} inférieure ou égale à 0,9 % n'a pas pu être obtenue. De plus, les coefficients de variation de reproductibilité ont été calculés pour les nombres de copies de lectine rapportés pour les cinq échantillons de lécithine. Au total, les données de PCR en temps réel de 36 extractions par échantillon de lécithine ont été utilisées pour l'évaluation. Aucune valeur aberrante n'a été éliminée pour calculer le coefficient de variation de reproductibilité, C_{V,R}. Pour l'échantillon n° 5, aucune donnée concernant la fidélité n'a pu être déterminée en raison de la faible quantité de copies de lectine inférieures à la LOQ de la méthode. Il faut noter que les données relatives à la fidélité reflètent le coefficient de variation de reproductibilité

3) Produit 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. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

des nombres de copies extraites des échantillons de lécithine, dans les conditions de reproductibilité de l'essai interlaboratoires.

Tableau A.7 — Résumé des données de validation

Échantillon de lécithine n°	Nombre moyen de copies de lectine	Coefficient de variation de reproductibilité $C_{V,R}$ %	Limite de détection pratique moyenne LOD_{prac} %	Nombre de laboratoires avec $LOD_{prac} < 0,9$ %
1	17 044	67	0,06	12/12
2	3 630	63	0,28	11/12
3	2 318	57	0,43	10/12
4	8 325	52	0,12	12/12
5	<80	non déterminé	>10	0/12

A.5.2.4 Principe et résumé

L'échantillon visqueux est homogénéisé après chauffage et extrait à l'aide d'hexane après addition d'un tampon de thiocyanate de guanidine. Les substances susceptibles de perturber l'analyse sont séparées par extraction à l'aide de chloroforme, et l'ARN présent dans la solution est digéré par la RNase A. L'ADN est précipité à l'isopropanol en présence de glycogène, puis rincé à l'éthanol et dissout dans de l'eau. Pour la purification de l'ADN, une étape ultérieure de filtration sur gel est réalisée (en utilisant un gel de dextrane réticulé pour chromatographie d'exclusion stérique).

A.5.2.5 Termes et définitions

Pour les besoins du présent paragraphe, les termes et définitions donnés dans l'ISO 5725-1^[43] et l'ISO 24276 s'appliquent.

A.5.2.6 Type d'échantillon et quantités

S'assurer que l'échantillon est représentatif de l'échantillon pour laboratoire. Les mesures et les étapes opératoires à prendre en compte sont décrites en 5.1. Il convient d'utiliser des échantillons aussi homogènes que possible.

A.5.2.7 Estimation de l'incertitude de mesure

L'incertitude de mesure des données de PCR en temps réel de la lectine évaluée lors de l'essai interlaboratoires est donnée sous forme de coefficient de variation de reproductibilité a été évaluée dans le cadre d'une étude interlaboratoires. Les résultats sont indiqués dans le Tableau A.7.

A.5.2.8 Interférences

Le degré de raffinage de la lécithine peut réduire la capacité d'extraction d'ADN des échantillons car ce traitement s'accompagne d'une dégradation de l'ADN.

A.5.2.9 Conditions physiques et environnementales

Aucune condition spécifique n'est requise. Voir l'ISO 24276 pour de plus amples détails.

A.5.2.10 Appareillage

Matériel de laboratoire courant et, en particulier, ce qui suit.

A.5.2.10.1 Centrifugeuse de table, pour récipients de centrifugation de 1,5 ml ou 2 ml, au moins 12 000g.