
**Microbiologie des aliments —
Méthode horizontale pour la
recherche des virus de l'hépatite A
et norovirus dans les aliments par la
technique RT-PCR en temps réel —**

**Partie 2:
Méthode de détection qualitative**

*Microbiology of food and animal feed — Horizontal method for
determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-
time RT-PCR —*

Part 2: Method for qualitative detection

TRAITEMENT PARALLÈLE ISO/CEN

Le présent projet de Spécification technique a été élaboré dans le cadre du Comité européen de normalisation (CEN) et soumis selon le mode de collaboration **sous la direction du CEN**, tel que défini dans l'Accord de Vienne.

Le présent projet de Spécification technique est par conséquent soumis en parallèle aux membres (P) de l'ISO/TC concerné pour un vote de trois mois et au CEN pour un vote de trois mois.

PROOF / ÉPREUVE



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.itih.ai)
Full standard:
<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/9ad44345-acfe-4fd7-9447-0072931b910d/iso-ts-15216-2-2013>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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	3
4.1 Extraction de virus.....	3
4.2 Extraction d'ARN.....	3
4.3 Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR en temps réel).....	4
4.4 Témoins.....	4
4.5 Résultats des essais.....	4
5 Réactifs	5
5.1 Généralités.....	5
5.2 Réactifs utilisés dans l'état.....	5
5.3 Réactifs préparés.....	6
6 Appareillage et matériaux	7
7 Échantillonnage	8
8 Mode opératoire	8
8.1 Exigences de laboratoire générales.....	8
8.2 Extraction de virus.....	8
8.3 Extraction d'ARN.....	11
8.4 RT-PCR en temps réel.....	11
9 Interprétation des résultats	13
9.1 Généralités.....	13
9.2 Élaboration des courbes étalon d'ARN viral témoin de processus.....	13
9.3 Calcul de l'efficacité de l'amplification.....	13
9.4 Calcul du rendement d'extraction.....	14
9.5 Limite de détection théorique.....	14
10 Expression des résultats	14
11 Rapport d'essai	15
Annexe A (normative) Logigramme de mode opératoire	16
Annexe B (normative) Composition et préparation des réactifs et des tampons	18
Annexe C (informative) Extraction d'ARN par l'utilisation du système NucliSens® de chez BioMérieux	20
Annexe D (informative) Amorces et sondes d'hydrolyse de la technique RT-PCR en temps réel pour la détection du VHA, du norovirus GI et GII et du virus Mengo(témoin de processus)	22
Annexe E (informative) Composition des mélanges maîtres (MasterMix) de la technique RT-PCR en temps réel en une étape (One-step qRT-PCR) utilisant le système RNA Ultrasense™ one-step qRT-PCR de chez Invitrogen et paramètres de cycles	24
Annexe F (informative) Disposition de plaque optique type	25
Annexe G (informative) Croissance de la souche du virus Mengo MC₀ utilisé comme témoin de processus	27
Annexe H (informative) Préparations mères d'ARN témoin externe	28
Bibliographie	30

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:

- 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 15216-2 a été élaborée par le 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).

L'ISO/TS 15216 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel*:

- *Partie 1: Méthode de quantification*
- *Partie 2: Méthode de détection qualitative*

Introduction

Le virus de l'hépatite A (VHA) et les norovirus (NoV) sont des agents importants de maladies virales d'origine alimentaire, chez l'humain. Aucune méthode de routine n'existe pour la culture desdits virus à partir de matrices alimentaires. La détection dépend ainsi des méthodes moléculaires qui utilisent une transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR). Étant donné que de nombreuses matrices alimentaires contiennent des substances inhibitrices de la technique RT-PCR, il est nécessaire d'utiliser une méthode d'extraction produisant des préparations d'ARN extrêmement pures et prêtes à l'emploi. En ce qui concerne les surfaces alimentaires, les virus sont prélevés par écouvillonnage. L'extraction de virus dans les fruits rouges et les salades s'effectue par élution sous agitation suivie d'une précipitation au PEG/NaCl. Pour l'eau embouteillée, une adsorption et une élution utilisant des membranes chargées positivement, suivie d'une étape de concentration par ultrafiltration est utilisée, les virus des mollusques bivalves, sont eux extraits des tissus des glandes digestives par traitement avec une solution de protéinase K. Pour toutes les matrices qui ne sont couvertes par la présente Spécification technique, il est nécessaire de valider cette méthode. La méthode d'extraction d'ARN, commune à toutes les matrices, est basée sur la dislocation de la capsid du virus par des réactifs chaotropiques, suivie d'une adsorption de l'ARN sur des particules de silice. La technique de RT-PCR en temps réel permet de suivre l'amplification tout au long des cycles de PCR en mesurant l'excitation de molécules marquées par fluorescence. Lors d'une réaction RT-PCR en temps réel utilisant une nucléase marquée en 5', les composés fluorescents sont fixés à une sonde nucléotidique propre à une séquence (sonde d'hydrolyse), ce qui permet aussi une confirmation simultanée de la présence de l'ADN initial ciblé. Ces modifications augmentent la sensibilité et la spécificité de la méthode PCR, et rendent alors inutiles les étapes de confirmation post PCR par amplifications supplémentaires. En raison de la complexité de la méthode, il est nécessaire d'inclure une série exhaustive de témoins. La méthode décrite dans la présente partie de l'ISO/TS 15216 permet la détection qualitative des niveaux d'ARN de virus dans l'échantillon pour essai.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9ad44345-ace-4fd7-9447-0072931b910d/iso-ts-15216-2-2013>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel —

Partie 2: Méthode de détection qualitative

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO/TS 15216 décrit une méthode de détection qualitative des VHA et NoV des génogroupes I (GI) et II (GII) présents dans des échantillons pour essai d'aliments ou sur des surfaces alimentaires. Après libération des virus contenus dans l'échantillon pour essai, l'ARN viral est extrait par lyse à l'aide de thiocyanate de guanidine et par adsorption sur silice. Les séquences cibles de l'ARN viral sont amplifiées et détectées par la technique RT-PCR en temps réel.

Cette approche est aussi applicable pour la détection desdits virus sur des matières contaminées, ou d'autres virus humains dans les aliments, sur les surfaces alimentaires ou sur les matières contaminées en suivant une validation appropriée et en utilisant des jeux d'amorces et de sondes propres à la cible.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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 22174, *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 ainsi que les suivants s'appliquent.

3.1 aliment

substance utilisée ou préparée pour être utilisée comme aliment

NOTE Pour les besoins de la présente partie de l'ISO/TS 15216, cette définition inclut l'eau embouteillée.

3.2 surface alimentaire

<1> surface des aliments

3.3 surface alimentaire

<2> surface de préparation des aliments

3.4 matières contaminées

objets ou matériaux inanimés sur lesquels des agents infectieux peuvent être transportés

3.5
virus de l'hépatite A
VHA

membre de la famille des *Picornaviridae* responsable des hépatites infectieuses

NOTE 1 Génétiquement, le VHA peut être subdivisé en six génotypes sur la base de région VP1/2A (des génotypes 1, 2 et 3 ont été trouvés chez les humains alors que les génotypes 4, 5 et 6 sont d'origine simienne).

NOTE 2 Il n'existe qu'un sérotype. La transmission se fait par voie féco-orale de personne à personne, par la consommation d'aliments contaminés, au contact avec de l'eau ou des surfaces alimentaires contaminées, ou bien par le contact avec des matières contaminées. Le virus de l'hépatite A est classé comme étant un agent pathogène du groupe de risque 2 selon l'ACDP (Advisory Committee on Dangerous Pathogens, Royaume-Uni).

3.6
norovirus

membre de la famille des *Caliciviridae* responsable des cas sporadiques et des épidémies de gastroentérites aiguës

NOTE 1 Génétiquement, les norovirus peuvent être subdivisés en cinq génogroupes distincts.

NOTE 2 Trois de ces génogroupes, GI, GII et GIV ont été impliqués dans des troubles gastro-intestinaux chez l'homme. GI et GII sont responsables de la grande majorité des cas cliniques. La transmission se fait par voie féco-orale de personne à personne, par la consommation d'aliments contaminés, au contact avec de l'eau ou des surfaces alimentaires contaminées, ou bien par le contact avec des matières contaminées. Les norovirus des génogroupes I et II sont classés comme étant des agents pathogènes du groupe de risque 2 selon l'ACDP.

3.7
détection du virus de l'hépatite A

détection de l'ARN du VHA dans un rapport masse ou volume prédéterminé d'aliments, ou sur une superficie de surface alimentaire

3.8
détection des norovirus

détection de l'ARN du norovirus dans un rapport masse ou volume prédéterminé d'aliments, ou sur une superficie de surface alimentaire

3.9
virus témoin de processus

virus ajouté à la prise d'échantillon, à la première occasion précédant l'extraction du virus, afin de contrôler le rendement de l'extraction

3.10
ARN viral témoin de processus

ARN libéré par le virus témoin de processus permettant d'obtenir des données pour établir une courbe étalon en vue de l'estimation du rendement de l'extraction

3.11
témoin négatif d'extraction d'ARN

témoin sans ARN cible soumis à toutes les étapes du mode opératoire d'extraction d'ARN et de détection permettant de s'assurer de l'absence de contamination croisée

3.12
témoin négatif de processus

échantillon de la matrice d'aliment sans agent pathogène cible soumis à toutes les étapes du processus d'analyse

3.13
sonde d'hydrolyse

sonde fluorescente couplée à deux molécules fluorescentes qui sont séparées de façon stérique par l'activité d'exonucléase en 5'-3' de l'enzyme pendant le processus d'amplification

3.14**témoin négatif de RT-PCR**

aliquote d'eau très pure utilisée à la place de l'ADN initial dans une réaction RT-PCR en temps réel permettant de s'assurer de la non-contamination des réactifs de RT-PCR en temps réel

3.15**témoin externe d'ARN**

ARN de référence pouvant servir de cible pour une réaction PCR en temps réel appropriée, par exemple un ARN synthétisé par une transcription in vitro à partir d'un plasmide portant une copie du gène cible, qui est ajouté à une aliquote d'ARN de l'échantillon selon une quantité donnée servant de témoin pour l'amplification d'une réaction distincte

3.16**valeur C_q**

cycle de quantification, cycle de réaction PCR durant lequel la cible est quantifiée au cours d'une réaction donnée de PCR en temps réel

NOTE Cela correspond au point auquel la réaction de fluorescence dépasse un niveau seuil.

3.17**limite de détection théorique****LDDt**

niveau qui constitue la plus petite quantité de cible pouvant, en théorie, être détectée

NOTE Cela correspond à une copie d'un génome par unité de volume d'ARN cible soumis à essai mais qui varie en fonction de la matrice d'essai et de la quantité de matière disponible au départ.

3.18**limite de détection pratique****LDDp**

plus petite concentration de cible dans un échantillon essai qui peut être détectée de façon reproductible (intervalle de confiance de 95 %) dans les conditions expérimentales spécifiées dans la méthode, vérifiée par un essai de reproductibilité interlaboratoires ou une autre validation

NOTE La LDDp dépend de la prise d'essai, de la qualité ou de la quantité d'ARN initial et de la LDDt de la méthode.

4 Principe**4.1 Extraction de virus**

Les aliments et les surfaces alimentaires couverts par la présente partie de l'ISO/TS 15216 sont souvent des matrices hautement complexes et les virus cibles peuvent être présents à de petites concentrations. Il est donc nécessaire d'effectuer une extraction et/ou une concentration du virus propre à la matrice afin de produire un substrat pour les parties communes ultérieures du processus. Le choix de la méthode dépend de la matrice.

4.2 Extraction d'ARN

Il est nécessaire d'extraire l'ARN en utilisant une méthode qui permette d'obtenir des préparations d'ARN pures afin de réduire les effets des inhibiteurs de PCR. Dans la présente partie de l'ISO/TS 15216, le thiocyanate de guanidine, réactif chaotropique, est utilisé pour la dislocation de la capsid du virus. L'ARN est ensuite adsorbé sur silice afin de faciliter la purification à travers plusieurs étapes de lavage. L'ARN viral purifié est libéré de la silice dans un tampon avant la réaction RT-PCR en temps réel.

4.3 Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR en temps réel)

La présente Spécification technique se base sur la réaction RT-PCR en temps réel en une étape utilisant des sondes d'hydrolyse. Dans la technique RT-PCR en temps réel en une étape, la transcription inverse et l'amplification par PCR sont effectuées consécutivement dans le même tube.

La réaction PCR en temps réel utilisant des sondes d'hydrolyse emploie une sonde d'ADN courte marquée par une molécule fluorescente à une extrémité et un quencher fluorescent à l'extrémité opposée. La chimie de cette réaction PCR garantit qu'à mesure que la quantité de produit amplifié augmente, la sonde d'ADN est coupée et le signal fluorescent provenant du marqueur augmente proportionnellement.

En raison des faibles concentrations de virus dans les aliments et de la diversité des souches dans les virus ciblés, il est important de sélectionner de façon adéquate des réactifs pour RT-PCR en temps réel en une étape, des amorces PCR et des sondes d'hydrolyse pour les virus ciblés. Pour cela, des recommandations sont données en 5.2.17 et en 5.2.18. Des exemples détaillés de réactifs, d'amorces et de sondes (utilisés lors de l'élaboration de la présente partie de l'ISO/TS 15216) sont fournis dans les Annexe D et E.

4.4 Témoins

4.4.1 Virus témoin de processus

Des pertes de virus témoins peuvent se produire à différentes étapes lors de l'extraction de virus dans l'échantillon et de l'extraction de l'ARN. Afin de contrôler ces pertes, les échantillons sont contaminés artificiellement avant le processus avec une quantité définie de virus témoin de processus. Le niveau de récupération du virus témoin de processus doit être déterminé pour chaque échantillon.

Le virus sélectionné en tant que témoin de processus doit être un virus cultivable, sans enveloppe, à ARNs (simple brin) de polarité positive, de taille similaire aux virus cibles afin de fournir un modèle morphologique et physico-chimique correct. Le virus témoin de processus doit montrer une persistance dans l'environnement semblable aux virus cibles. Le virus doit être suffisamment différent sur le plan génétique par rapport aux virus cibles afin de ne pas avoir de réactions PCR croisées entre virus cibles et virus témoins, et sa présence dans les aliments à l'état naturel ne doit normalement pas être attendue.

Un exemple de préparation du virus témoin de processus (utilisé lors de l'élaboration de la présente partie de l'ISO/TS 15216) est fourni à l'Annexe G.

4.4.2 ARN témoin positif externe (TE)

Des substances inhibitrices de la réaction RT-PCR sont contenues dans de nombreux aliments, mais peuvent également provenir d'une contamination due à un traitement effectué en amont. Afin de vérifier l'éventuelle inhibition de la RT PCR dans un échantillon individuel, un ARN témoin positif externe (une espèce à ARN portant la séquence cible d'intérêt, 5.3.8) est ajouté à une aliquote d'ARN de l'échantillon et soumis à essai en utilisant la méthode RT-PCR. Une comparaison des résultats de cet essai avec les résultats d'un ARN témoin positif externe en l'absence d'ARN de l'échantillon permet la détermination du niveau d'inhibition de la réaction RT-PCR dans chaque échantillon soumis à essai. De plus, dans cette méthode, l'ARN témoin positif externe agit comme un témoin positif de la réaction RT-PCR.

Il est permis d'appliquer des approches différentes pour le contrôle de l'inhibition de la réaction RT-PCR sous réserve de faire la démonstration de l'équivalence de leurs performances par rapport à celles de la méthode utilisant l'ARN témoin externe.

4.5 Résultats des essais

En ce qui concerne les surfaces alimentaires, cette méthode fournit un résultat exprimé par «génomique de virus détecté» ou par «génomique de virus non détecté», pour les autres types d'échantillons, les résultats sont exprimés par «génomique de virus détecté» ou par «génomique de virus non détecté» suivi de «dans x ml» ou «dans x g», où x est la quantité d'échantillon soumis à essai.

5 Réactifs

5.1 Généralités

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

En ce qui concerne les pratiques de laboratoires en vigueur, voir l'ISO 7218^[10].

5.2 Réactifs utilisés dans l'état

5.2.1 Eau de qualité biologie moléculaire.

5.2.2 Polyéthylène glycol (PEG), de masse moléculaire relative moyenne 8 000.

5.2.3 Chlorure de sodium (NaCl).

5.2.4 Chlorure de potassium (KCl).

5.2.5 Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4).

5.2.6 Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).

5.2.7 Tris base.

5.2.8 Glycine.

5.2.9 Extrait de viande de bœuf en poudre.

5.2.10 Protéinase K (30 U/mg).

5.2.11 Pectinase.

5.2.12 Chloroforme.

5.2.13 Butanol.

5.2.14 Hydroxyde de sodium (NaOH).

5.2.15 Acide chlorhydrique (HCl).

5.2.16 **Silice, tampons de lyse, de lavage et d'éluion** pour l'extraction de l'ARN viral. Les réactifs doivent permettre d'obtenir 500 µl de virus extrait, par réaction de lyse dans un tampon chaotrope contenant du thiocyanate de guanidine (Référence [1]) et en utilisant la silice comme matrice liant l'ARN. Après traitement de l'ARN lié à la silice par un ou des tampons de lavage éliminant les impuretés, l'ARN doit être élué dans 100 µl de tampon d'éluion.

La préparation d'ARN doit être d'une qualité et d'une concentration adaptée aux fins prévues. Voir l'Annexe C pour les détails d'un exemple de réactifs d'extraction d'ARN (utilisés lors de l'élaboration de la méthode décrite dans la présente partie de l'ISO/TS 15216).

5.2.17 **Réactifs pour la réaction RT-PCR en temps réel en une étape.** Les réactifs doivent permettre le traitement de 5 µl d'ARN dans un volume total de 25 µl. Ils doivent être adaptés à la réaction de RT-PCR en une étape en utilisant des sondes d'hydrolyses (l'ADN polymérase utilisée doit posséder une