
**Analyse moléculaire de
biomarqueurs — Méthodes d'analyse
pour la détection et l'identification
des espèces animales dans les
aliments et les produits alimentaires
(méthodes basées sur l'utilisation
des acides nucléiques) — Exigences
générales et définitions**

Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) — General requirements and definitions



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 20813:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32f3069b-31f2-4cf3-a9cc-d4c9131fa513/iso-20813-2019>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée 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 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +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 |
| 1 Domaine d'application | 1 |
| 2 Références normatives | 1 |
| 3 Termes et définitions | 1 |
| 4 Caractéristiques de performances des méthodes | 2 |
| 4.1 Généralités..... | 2 |
| 4.2 Domaine d'application de la méthode..... | 2 |
| 4.3 Base scientifique..... | 2 |
| 4.4 Unités de mesure..... | 2 |
| 4.5 Applicabilité..... | 3 |
| 4.6 Spécificité..... | 3 |
| 4.6.1 Généralités..... | 3 |
| 4.6.2 Exigences pour les essais d'inclusivité..... | 4 |
| 4.6.3 Exigences pour les essais d'exclusivité..... | 4 |
| 4.7 Sensibilité..... | 4 |
| 4.7.1 Généralités..... | 4 |
| 4.7.2 Limite de détection (LOD)..... | 5 |
| 4.8 Exigences spécifiques pour les méthodes quantitatives..... | 5 |
| 4.8.1 Généralités..... | 5 |
| 4.8.2 Limite de quantification (LQ)..... | 5 |
| 4.8.3 Gamme dynamique..... | 6 |
| 4.8.4 Détermination de la fidélité et de la justesse des méthodes quantitatives..... | 6 |
| 4.9 Robustesse..... | 7 |
| 4.9.1 Généralités..... | 7 |
| 4.9.2 Détermination de la robustesse par une étude interlaboratoires..... | 7 |
| 4.9.3 Détermination de la robustesse par un essai orthogonal multifactoriel..... | 7 |
| 5 Validation par un seul laboratoire | 7 |
| 6 Étude interlaboratoires | 7 |
| 6.1 Généralités..... | 7 |
| 6.2 Méthodes qualitatives..... | 8 |
| 6.3 Méthodes quantitatives..... | 8 |
| 7 Exigences générales du laboratoire et du mode opératoire | 8 |
| 7.1 Généralités..... | 8 |
| 7.2 Installations, matériaux et équipement..... | 8 |
| 7.3 Préparation de l'échantillon et extraction de l'ADN..... | 9 |
| 7.4 Utilisation de témoins..... | 10 |
| 7.5 Analyse des données..... | 10 |
| 7.5.1 Témoin..... | 10 |
| 7.5.2 PCR classique..... | 11 |
| 7.5.3 Courbes d'amplification de PCR en temps réel..... | 11 |
| 7.6 Expression des résultats..... | 11 |
| 7.6.1 Expression des résultats positifs..... | 11 |
| 7.6.2 Expression des résultats négatifs..... | 12 |
| 7.6.3 Expression des résultats quantitatifs..... | 12 |
| 8 Rapport d'essai | 12 |
| Annexe A (informative) Liste des espèces typiques utilisées pour les essais d'inclusivité et d'exclusivité | 14 |
| Annexe B (informative) Exemples de méthodes de conversion des unités des nombres de copies d'ADN en rapport de masses | 19 |
| Bibliographie | 28 |

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthodes d'analyse pour la détection et l'identification des espèces animales dans les aliments et les produits alimentaires (méthodes basées sur l'utilisation des acides nucléiques) — Exigences générales et définitions

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie les exigences minimales concernant les caractéristiques de performances pour la détection de séquences d'acide nucléique (ADN) par des méthodes moléculaires telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), incluant différentes méthodes de détection post-PCR, la PCR en temps réel, des techniques de détection basées sur une et/ou plusieurs sondes, ainsi que la combinaison de ces méthodes.

Le présent document est applicable à la détection, l'identification, la quantification de l'ADN d'espèces animales appartenant à des groupes taxonomiques supérieurs ou inférieurs dans les produits alimentaires, ainsi que la validation des méthodes applicables.

Il est applicable aux mammifères, aux oiseaux, aux reptiles, aux amphibiens, aux poissons, aux mollusques, aux crustacés et aux insectes. Pour chacun d'entre eux, des exemples typiques sont fournis dans l'[Annexe A](#).

2 Références normatives

ISO 20813:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32f3069b-31f2-4cf3-a9cc-14c91716512/iso-20813-2019>

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 16577, *Analyse moléculaire de biomarqueurs — Termes et définitions*

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions de l'ISO 16577, l'ISO 24276, ainsi que les suivants, s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

3.1 basic local alignment search tool BLAST

algorithme de comparaison de séquences à vitesse optimisée, qui est utilisé pour les recherches dans les bases de données de séquences, pour des alignements locaux optimaux en réponse à une requête

Note 1 à l'article: Cet algorithme effectue automatiquement une approximation des alignements optimisant une mesure de similarité locale, le score MST (maximal signal pair) ou le score HSP (high-scoring segment pair).

Note 2 à l'article: Voir Référence [2].

Note 3 à l'article: BLASTn est applicable à la comparaison de séquence nucléotidique.

3.2 réaction de polymérisation en chaîne classique PCR classique

méthode de PCR nécessitant une étape post-PCR telle que l'électrophorèse sur gel pour la détection ou la visualisation des produits d'amplification, afin d'obtenir un résultat qualitatif

4 Caractéristiques de performances des méthodes

4.1 Généralités

Les méthodes employées pour l'analyse des espèces animales doivent répondre aux caractéristiques de performances conformément au présent document. Les résultats de toutes les validations interlaboratoires et/ou de laboratoire unique et les caractéristiques de performances doivent être décrits.

NOTE Un certain nombre de lignes directrices sont disponibles pour la mise en œuvre des méthodes, voir Référence [10].

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32f3069b-31f2-4cf3-a9cc-d4c9131fa513/iso-20813-2019>

4.2 Domaine d'application de la méthode

Des informations concernant l'utilisation prévue et les limites des méthodes doivent être fournies. En particulier, les informations doivent indiquer que les critères définis dans le présent document ont été satisfaits.

4.3 Base scientifique

Il convient de fournir une vue d'ensemble des principes et références à des publications scientifiques pertinentes.

4.4 Unités de mesure

Les analyses qualitatives indiquent la présence ou l'absence (non-détection) d'une certaine cible.

Dans les analyses quantitatives, la valeur mesurée est calculée comme le rapport des nombres de copies d'ADN (c/c). Il convient que l'utilisation de ce rapport examine les influences possibles, y compris le nombre de copies d'ADN de la cible dans le génome. D'autres unités (par exemple, rapport de masses) peuvent être employées. Les principes de calcul du rapport doivent être indiqués.

Si une méthode quantitative est destinée à juger le rapport masse/masse d'ingrédients provenant d'espèces animales différentes dans un échantillon, il convient d'indiquer que les valeurs mesurées pour le rapport de nombre de copies d'ADN ne peuvent pas refléter dans tous les cas le rapport masse/masse des constituants animaux dans l'échantillon.

4.5 Applicabilité

Lors de l'évaluation de l'adéquation d'une méthode pour un usage donné, il convient de considérer les aspects suivants concernant la nature de la cible:

- la localisation de la cible (nucléaire ou mitochondriale);
- le nombre de copies par cellule;
- la longueur de la séquence cible.

Pour les méthodes quantitatives spécifiques d'une espèce, un gène nucléaire, en excluant l'ADN mitochondrial, doit être ciblé. La séquence cible doit être présente sous la forme d'une copie unique par génome haploïde, ou le nombre de copies doit être déterminé/connu.

Lors de l'évaluation de l'adéquation d'une méthode pour un usage donné, il convient de considérer les aspects suivants concernant la matrice:

- la nature des matrices d'échantillon potentielles;
- le degré de traitement des constituants de l'échantillon;
- les différentes espèces et les différents types de tissus animaux impliqués;
- la préparation de la matrice d'échantillon.

L'applicabilité de la méthode doit être soumise à essai en extrayant l'ADN d'échantillons pour essai reflétant les matrices et le domaine d'application de l'analyse.

Il convient d'extraire l'ADN d'un minimum de trois matrices parmi les types les plus pertinents, incluant les types reflétant le domaine d'application de la méthode, contenant une teneur masse/masse connue des matériaux de la ou des espèces cibles (uniformément répartis sur la gamme dynamique de pourcentage de la méthode) et des tissus pertinents pour l'application.

NOTE 1 Les cibles de PCR mitochondriales ne peuvent pas être utilisées pour une quantification fiable des rapports de nombre de copies de génome haploïde d'espèces différentes, car la quantité de cibles mitochondriales diffère selon le type de tissu.

NOTE 2 Différents types de tissus animaux peuvent avoir une teneur en ADN variable par équivalent massique.

NOTE 3 La limite de détection (LOD) pratique (voir l'ISO 21569) peut différer significativement pour des matrices différentes. En outre, différents grades de traitement des constituants animaux dans le même produit contribueront à la dégradation de l'ADN et à une distribution asymétrique possible de l'ADN entre les ingrédients. Par exemple, un produit peut être composé de différents types de tissus animaux, contenant différentes quantités d'ADN. Ce déséquilibre peut en outre être intensifié si certains ingrédients ont subi un prétraitement, comme une cuisson ou un traitement acide, abaissant la qualité de l'ADN, alors que d'autres ingrédients ont été ajoutés, par exemple bruts ou traités différemment.

4.6 Spécificité

4.6.1 Généralités

Il convient d'évaluer la spécificité selon un mode opératoire en deux étapes: évaluation théorique et expérimentale de l'inclusivité et de l'exclusivité.

Des essais *in silico* de la spécificité des amorces et des sondes doivent être réalisés avec les outils bioinformatiques disponibles.

NOTE 1 Des exemples sont les essais portant sur la formation de dimères d'amorces avec les recherches au moyen de primer3[1] et de BLAST[2] dans les bases de données de séquences d'acides nucléiques.

Si les données de séquences sont utilisées pour vérifier les résultats de spéciation animale, il convient d'employer des bases de données appropriées, en tenant compte de manière appropriée du moment de

soumission des entrées individuelles et de toute modification ultérieure de la classification taxonomique ou de la dénomination.

NOTE 2 En cas de résultats inattendus, des investigations supplémentaires peuvent être menées avec des techniques appropriées telles que le séquençage, l'électrophorèse sur gel ou l'hybridation, pour confirmer l'identité du matériau de référence.

4.6.2 Exigences pour les essais d'inclusivité

Il convient de fournir les résultats expérimentaux des essais de la méthode avec les espèces animales cibles. Il convient que ces essais incluent des races pertinentes des espèces animales, selon le domaine d'application de la méthode (voir [4.2](#)).

Il convient que le matériau employé pour les essais d'inclusivité contienne environ 100 copies d'ADN cible^[6]. Chaque matériau échantillon doit être soumis à essai en double au minimal. Il convient de détecter les variants de séquence des espèces animales cibles avec une efficacité d'amplification comparable, le cas échéant.

NOTE Les espèces animales cibles pour les essais d'inclusivité appartiennent normalement à plus de cinq races.

4.6.3 Exigences pour les essais d'exclusivité

Les résultats expérimentaux fournis par les essais de la méthode avec des espèces animales non cibles doivent être fournis. Il convient que ces essais incluent à la fois des espèces animales étroitement et non étroitement liées sur le plan taxonomique. Des espèces animales ou groupes taxonomiques pertinents au vu du champ d'application de la méthode doivent être soumis à essai, par exemple des espèces couramment employées dans les aliments en général et en particulier dans les matrices considérées dans le champ d'application de la méthode. Il convient que la méthode fasse clairement la distinction entre les espèces animales cibles et non cibles. [ISO 20813:2019](#)

Il convient d'utiliser une quantité suffisante d'ADN pour les essais d'exclusivité expérimentale. Un nombre de 2 500 copies cibles^[6] garantit que la réactivité croisée peut être identifiée. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/32f3069b-31f2-4cf3-a9cc-d4c9131aa513/iso-20813-2019>

Sélectionner un minimum de 10 espèces qui pourraient causer des interférences avec les espèces animales cibles présentes dans le matériau pour essai. Des exemples d'organismes adaptés sont donnés à l'[Annexe A](#).

Il convient d'inclure d'autres espèces si elles sont pertinentes, par exemple en cas d'homologies de séquences d'oligonucléotides avec les séquences d'acides nucléiques.

Il convient de caractériser la réactivité croisée de la matrice.

Il convient de confirmer l'adéquation de l'ADN employé pour l'amplification en utilisant un témoin d'amplification, par exemple un système de PCR consensus avec ADN (chromosomique) monocopie (par exemple, myostatine ou actine).

4.7 Sensibilité

4.7.1 Généralités

Les résultats expérimentaux obtenus avec la méthode à différentes concentrations pour évaluer la plage d'utilisation de la méthode doivent être disponibles. Ils doivent être décrits dans le rapport de validation.

S'il y a lieu, il convient de fournir des informations détaillées sur la manière dont une valeur seuil peut être établie et utilisée dans le laboratoire.

Il convient de détecter aux niveaux pertinents pour la partie intéressée, par exemple le consommateur, les espèces animales nécessitant un essai qualitatif.

4.7.2 Limite de détection (LOD)

4.7.2.1 LOD absolue

La LOD absolue (LOD_{abs}) doit être indiquée en nombre de copies de la séquence cible par réaction et le niveau de confiance (généralement 95 %) doit être précisé.

NOTE 1 Vingt copies ou moins peuvent être appliquées pour les gènes monocopie et un nombre approprié d'équivalents génome haploïde pour les gènes à nombre élevé de copies.

NOTE 2 Si, pour la détermination de la LOD, un ADN avec un nombre connu de copies de la séquence cible n'est pas disponible, un ADN plasmidique peut être employé.

La LOD_{abs} de la méthode est déterminée expérimentalement en préparant une série de dilutions du matériau cible avec des dilutions comprises dans la plage de limite de détection attendue/cible. Des recommandations pour l'évaluation de la LOD_{abs} sont fournies dans la Référence [6].

4.7.2.2 LOD relative

La LOD relative (LOD_{rel}) doit être déterminée dans l'ADN d'espèces animales non cibles pertinentes comme référence. Selon les exigences de l'essai, la LOD_{rel} est ajustée à cette valeur. La LOD_{rel} exprime le % c/c relatif de l'ADN de l'espèce animale cible dans l'ADN d'autres espèces animales, avec une confiance de 95 %.

Il convient de déterminer la LOD_{rel} expérimentalement en préparant un ou plusieurs échantillons de référence définis contenant un pourcentage défini de l'ADN cible dans la plage de limite de détection. Chaque échantillon de référence est analysé en au moins 10 réplicats. Le pourcentage de l'échantillon de référence pour lequel au moins 95 % des réplicats donnent des résultats positifs est considéré comme la LOD_{rel} .

ISO 20813:2019

4.7.2.3 LOD asymétrique (pour les méthodes multiplex uniquement)

d4c9131fa513/iso-20813-2019

Dans le cas des méthodes multiplex où la détection des différentes cibles est limitée par des effets compétitifs, comme dans le cas des méthodes de PCR en temps réel multiplex, la LOD des cibles uniques dans une situation d'asymétrie de cibles exprimée en rapport de cible doit être validée. Différents teneurs en séquence cible animale spécifique sont mélangées pour obtenir des rapports de copies définis (c'est-à-dire rapports de 1/1 000 et 1 000/1; 1/100 et 100/1). Le rapport dans lequel chaque animal cible est détecté avec une confiance de 95 % est déterminé expérimentalement avec un nombre approprié de réplicats pour l'échantillon de référence défini.

4.8 Exigences spécifiques pour les méthodes quantitatives

4.8.1 Généralités

La limite supérieure et inférieure de la gamme linéaire de la méthode doit être déterminée. L'évaluation de ces limites et de la gamme linéaire doit être réalisée sur des échantillons contenant de l'ADN non cible animal pertinent pour l'aliment.

4.8.2 Limite de quantification (LQ)

La LQ absolue (LOQ_{abs}) doit être indiquée sous la forme de nombres de copies de la séquence cible. Elle doit être égale à la plus faible quantité incluse dans la gamme dynamique.

La LQ relative (LOQ_{rel}) doit être déterminée dans l'ADN d'autres espèces animales pertinentes. Selon les exigences de l'essai, il convient d'ajuster la LOQ_{rel} à cette valeur. La LOQ_{rel} exprime le rapport entre le nombre de copies d'ADN de l'espèce animale cible et de copies d'ADN d'autres espèces animales ou copies d'ADN d'un gène de référence représentatif du rang taxonomique complet. Il convient que la LOQ_{rel} soit égale à la plus faible concentration incluse dans la gamme dynamique.

Si, pour la détermination de la LOQ, un ADN avec un nombre connu de copies de la séquence cible n'est pas disponible, il convient d'utiliser un ADN plasmidique. Ce plasmide peut également servir d'étalon.

Un minimum de 15 réplicats avec une concentration cible de la LOQ attendue doit être soumis à essai. Les critères de fidélité et de justesse doivent être remplis pour les résultats.

NOTE Les valeurs de LOQ fournies par l'étude interlaboratoires font généralement référence au plus faible niveau d'analyte observé ayant un écart-type de reproductibilité relatif de 25 % ou moins.

4.8.3 Gamme dynamique

Il convient que la gamme dynamique couvre les valeurs de pourcentage ainsi que les nombres de copies conformément à l'utilisation attendue et au domaine d'application de la méthode.

Afin de définir le nombre de copies minimal pertinent, la gamme dynamique désirée en termes de pourcentages de copies cibles doit être déterminée. Il convient de considérer que la taille du génome des espèces dans le matériau échantillon attendu limite le nombre maximal de copies pouvant être utilisé pour l'analyse (par exemple de 100 ng à 200 ng, selon la méthode).

NOTE 1 Par exemple, pour les bovins, une taille de génome de 4 pg peut être supposée, ce qui conduit à un nombre maximal de copies de 25 000 dans 100 ng de matériau ADN échantillon. Voir [Tableau B.2](#) [18][22].

Les nombres de copies de la gamme dynamique à la fois pour la séquence cible et de référence doivent ensuite être déterminés de la manière suivante:

- pour la séquence de référence, le nombre maximal de copies peut être calculé en tenant compte des tailles de génome et de la quantité d'ADN échantillon utilisé pour l'analyse comme décrit ci-dessus;
- pour la cible, il convient que le plus petit nombre de copies soit la LOQ absolue; à titre de prérequis, il convient de prendre en compte la plus faible valeur possible en considérant le rapport comparativement au nombre maximal de copies d'ADN total/de référence;
- il convient de fournir le nombre minimal de copies de la séquence de référence et le nombre maximal de copies de la séquence cible, par le rapport de la valeur de pourcentage minimale et maximale, respectivement.

NOTE 2 La gamme dynamique est établie sur la base d'une courbe standard, avec un minimum de quatre niveaux de concentration répartis uniformément au moins en double.

NOTE 3 Pour une limite supérieure souhaitée de la gamme dynamique de 100 %, le nombre minimal de copies de la référence peut être égal à la limite inférieure de la plage de nombre de copies de la séquence cible, et pour une LOQ souhaitée de 0,1 % à une LOQ absolue de 30 copies, la limite supérieure de la cible de référence est de 30 000 copies.

4.8.4 Détermination de la fidélité et de la justesse des méthodes quantitatives

Il convient de déterminer et d'exprimer la fidélité comme l'écart-type de répétabilité relatif (S_r).

Il convient d'analyser un nombre suffisant de réplicats (au moins 15) pour au moins 3 matériaux d'ADN avec différents pourcentages cibles, couvrant toute la gamme dynamique.

NOTE L'ADN mitochondrial ne peut pas être utilisé pour les cibles des méthodes quantitatives.

Le S_r de tous les réplicats doit être ≤ 25 % sur toute la gamme dynamique de la méthode.

La justesse doit être comprise dans les 25 % de la valeur de référence acceptée pour tous les réplicats sur toute la gamme dynamique de la méthode.

4.9 Robustesse

4.9.1 Généralités

Il convient de fournir les résultats de l'essai empirique de la méthode avec des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode (par exemple, variation de concentration des composants de la trousse, variation de l'appareillage) s'ils sont disponibles.

4.9.2 Détermination de la robustesse par une étude interlaboratoires

Une étude interlaboratoires introduit un changement délibéré dans le laboratoire réalisant la méthode et atteint les critères pour une évaluation de la robustesse. Empiriquement, une méthode robuste doit être sélectionnée en considérant que les résultats de différents laboratoires ne varient pas de façon significative.

4.9.3 Détermination de la robustesse par un essai orthogonal multifactoriel

Il convient que l'essai soit réalisé selon une approche multifactorielle, dans laquelle plusieurs altérations incluant, sans s'y limiter, la concentration du mélange maître, le volume réactionnel, la concentration de l'amorce et de la sonde, la température d'hybridation et la plateforme du thermocycleur, sont évaluées.

NOTE 1 Un mode opératoire détaillé est décrit dans la Référence [6].

Pour les méthodes qualitatives, il convient de soumettre à essai au moins trois réplicats. Il convient que le nombre de copies de l'espèce animale cible employé dans l'essai soit présent dans une concentration trois fois supérieure à la LOD_{abs} (confiance à 95 %) de la méthode.

Pour les méthodes quantitatives, il convient de soumettre à essai trois concentrations cibles définies sur toute la gamme dynamique de la méthode dans trois réplicats chacune.

NOTE 2 La méthode est considérée comme robuste si toutes les réactions donnent les résultats attendus.

5 Validation par un seul laboratoire

Il convient qu'une méthode d'analyse ait été suffisamment soumise à essai au sein d'un laboratoire pour fournir les spécifications requises avant l'étude interlaboratoires, voir l'ISO 13495.

Il convient de considérer l'emploi de matériaux de référence ou de matériaux de référence certifiés (MRC) pour la validation des méthodes de détection et de quantification des acides nucléiques.

6 Étude interlaboratoires

6.1 Généralités

Les informations concernant l'étude interlaboratoires (organisateur, protocole, nombre de laboratoires participants, etc.) et les données de performances obtenues par l'étude doivent être déclarées avec les références appropriées des documents pertinents. Les études collaboratives pour la validation des méthodes de PCR pour la détection, l'identification et la quantification de séquences d'ADN spécifiques peuvent être réalisées conformément à d'autres documents pertinents (par exemple, Codex Alimentarius CAC/GL 74-2010[Z]).

NOTE Une étude collaborative à petite échelle (étude de prévalidation impliquant, par exemple, de 2 à 4 laboratoires) peut être réalisée pour soumettre à essai la transférabilité générale de la méthode avant l'organisation d'une étude à grande échelle.

Pour une validation de la précision des méthodes de détection et d'identification, les données sont recueillies à partir de nombreux laboratoires disposant des installations et des compétences requises pour les essais de biologie moléculaire. Dans l'ISO 13495:2013, les nombres requis de laboratoires

sont de respectivement huit et quatre pour le niveau international et national de validation. Selon AOAC International (2002)^[23], le nombre requis est de huit laboratoires. Les analyses statistiques sont calculées sur la base de l'ISO 5725-1:1994, 6.3.

6.2 Méthodes qualitatives

Une étude collaborative de validation d'une méthode de PCR qualitative doit être conçue en considérant la probabilité de détection (POD) (voir l'ISO/TS 16393) au sein de la gamme de la méthode.

NOTE Les taux traditionnels non paramétriques de 5 % de faux positifs et de 5 % de faux négatifs reflètent des POD de 5 % et de 95 %.

6.3 Méthodes quantitatives

Il convient que l'écart-type de reproductibilité relatif (S_R) soit ≤ 25 % sur toute la gamme dynamique de la méthode.

NOTE Aux niveaux de 0,1 % (copie/copie), un S_R de 50 % peut être acceptable.

7 Exigences générales du laboratoire et du mode opératoire

7.1 Généralités

Le mode opératoire doit être documenté, de manière à inclure les éléments suivants:

- représentativité de l'échantillon;
- préparation de l'échantillon pour essai (facultatif: si l'échantillon pour essai n'est pas l'échantillon entier pour laboratoire, homogénéiser l'échantillon pour laboratoire et obtenir des échantillons pour essai conformément aux normes internationales pertinentes);
- broyage et homogénéisation de l'échantillon pour essai;
- préparation des prises d'essai;
- extraction de l'ADN;
- essai, interprétation et communication des résultats.

Les recommandations de sécurité des fabricants doivent être respectées.

7.2 Installations, matériaux et équipement

Il convient de concevoir la zone de travail dans le laboratoire de manière à empêcher une contamination accidentelle de l'ADN à partir, par exemple, de poussière, de matériau humain et d'aérosols; les éléments à envisager sont notamment les suivants:

- le confinement systématique des étapes méthodologiques intervenant dans la production des résultats;
- le respect du principe de marche en avant pour la manipulation des échantillons.

Pour les méthodes basées sur l'ADN, une séparation (temporelle et/ou physique) du travail est nécessaire pour éviter la contamination. La conception de zones de travail contenues/dédiées avec leur propre appareillage est recommandée, comme suit:

- a) une zone de travail pour le broyage et l'homogénéisation;
- b) une zone de travail pour l'extraction des acides nucléiques du matériau d'essai;