

PROJET
FINAL

NORME
INTERNATIONALE

ISO/FDIS
22949-1

ISO/TC 34/SC 16

Secrétariat: ANSI

Début de vote:
2021-08-07

Vote clos le:
2021-10-02

**Analyse moléculaire de
biomarqueurs — Méthodes d'analyse
pour la détection et l'identification
d'espèces animales dans les
aliments et les produits alimentaires
(méthodes basées sur le séquençage
des nucléotides) —**

Partie 1:

Exigences générales

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2ac00d5a-52a5-483e-8792-1897fd1c22949>

Molecular biomarker analysis — Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleotide sequencing-based methods) —

Part 1: General requirements

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.



Numéro de référence
ISO/FDIS 22949-1:2021(F)

© ISO 2021

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/FDIS 22949-1
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2ac00d5a-52a5-483e-8792-3f2aaf0579dd/iso-fdis-22949-1>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2021

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
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	v
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Caractéristiques de performance des méthodes	2
4.1 Généralités.....	2
4.2 Adéquation à un but de la méthode.....	2
4.3 Base scientifique.....	2
4.3.1 Généralités.....	2
4.3.2 Séquençage Sanger.....	2
4.3.3 Séquençage de nouvelle génération.....	3
4.4 Unités de mesure.....	3
4.5 Applicabilité.....	3
4.5.1 Considérations relatives au produit carné ou au produit alimentaire.....	3
4.5.2 Plan d'échantillonnage.....	3
4.5.3 Considérations génomiques.....	4
4.5.4 Évaluation de la méthode.....	4
4.6 Sélection et évaluation des amorces.....	4
4.7 Construction et évaluation de la base de données.....	4
4.8 Sélectivité et spécificité de la séquence nucléotidique.....	5
4.8.1 Généralités.....	5
4.8.2 Exigences relatives aux essais d'inclusivité.....	5
4.8.3 Évaluation des interférences de l'ADN non-cible.....	6
4.9 Sensibilité.....	6
4.9.1 Généralités.....	6
4.9.2 Limite de détection.....	6
4.10 Robustesse.....	7
4.10.1 Généralités.....	7
4.10.2 Détermination de la robustesse par une étude interlaboratoires.....	7
4.10.3 Détermination de la robustesse par un essai orthogonal multifactoriel.....	7
5 Validation intralaboratoire	7
6 Étude comparative interlaboratoires	7
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.....	9
7.3.1 Généralités.....	9
7.3.2 Catégorie A: échantillon mono-espèce constitué d'un seul morceau.....	9
7.3.3 Catégorie B: produit mono-espèce constitué de plusieurs morceaux ou unités du même type de tissu.....	9
7.3.4 Catégorie C: produit traité contenant plusieurs espèces mélangées, notamment produit d'origine non carnée, ou différents types de tissus comme ingrédients.....	10
7.4 Extraction de l'ADN.....	10
7.5 Processus de séquençage de l'ADN.....	10
7.5.1 Généralités.....	10
7.5.2 Méthode de séquençage Sanger.....	11
7.5.3 Méthode de séquence de nouvelle génération.....	12
7.6 Analyse et interprétation des données de séquences d'ADN.....	15
7.7 Expression des résultats.....	15

8	Validation du pipeline bio-informatique du NGS	15
8.1	Généralités.....	15
8.2	Mesures de qualité.....	15
9	Rapport d'essai	16
Annexe A (informative) Logigramme général du mode opératoire analytique du laboratoire		17
Annexe B (informative) Comparaison entre le séquençage Sanger et le séquençage de nouvelle génération		18
Annexe C (informative) Processus in silico pour la sélection d'une combinaison d'amorces		19
Bibliographie		20

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/FDIS 22949-1](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2ac00d5a-52a5-483e-8792-3f2aaf0579dd/iso-fdis-22949-1)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2ac00d5a-52a5-483e-8792-3f2aaf0579dd/iso-fdis-22949-1>

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 le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/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*.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 22949 se trouve sur le site web de l'ISO.

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.

Introduction

Le présent document fournit des recommandations générales relatives au séquençage de l'acide désoxyribonucléique (ADN) pour la détection ou l'identification d'espèces animales dans les aliments et les produits alimentaires. Le séquençage de l'ADN est le processus consistant à déterminer l'ordre des quatre bases nucléotidiques (adénine, guanine, cytosine et thymine) dans un polymère d'acides nucléiques. Les polymères d'acides nucléiques peuvent avoir une longueur variable, allant de quelques nucléotides à plusieurs centaines de millions de bases.

Les techniques de séquençage rapide de l'ADN ont été validées et vérifiées avec succès pour détecter et identifier les espèces animales dans les produits alimentaires.^[1] Dans l'industrie agroalimentaire, l'accès rapide, économique et à haut débit aux séquences du génome entier dans les aliments a permis d'améliorer le contrôle de la qualité et de la sécurité des aliments.^[2] Deux types de techniques de séquençage de l'ADN sont couramment utilisées pour les produits alimentaires: le séquençage par terminaison de chaîne et le séquençage à haut débit^{[3][4][5][6][7][8]}.

La terminaison de chaîne, mise au point par Frederick Sanger en 1977, porte encore son nom. Les réactions de séquençage Sanger peuvent être préparées manuellement et les électrophorogrammes peuvent être directement lus par l'utilisateur. Les systèmes d'électrophorèse capillaire avec détection automatique de bases ont surtout remplacé les gels à lecture manuelle et des applications Sanger rapides sont en cours de développement.

Le séquençage à haut débit ou de nouvelle génération (NGS), y compris les méthodes de nouvelle génération à lecture courte et de troisième génération à lecture longue, ont permis de réduire le coût de séquençage de l'ADN, d'améliorer la lisibilité des séquences et d'automatiser la plupart des étapes, de la préparation à la bio-informatique. Le séquençage automatique à haut débit de l'ADN applique la fluorescence spécifique à la base/longueur d'onde ou la détection ionique pour déterminer l'addition enzymatique en temps réel de nucléotides à une matrice d'ADN.

Le séquençage Sanger (terminaison de chaîne didésoxy) génère des données de haute qualité pour déterminer une seule séquence d'ADN d'une cible individuelle. En revanche, le NGS peut être utilisé pour évaluer simultanément des millions de fragments d'ADN individuels de marqueurs et cibles mélangés.

Le séquençage Sanger et le NGS peuvent tous deux être utilisés pour vérifier la composition de l'espèce animale dans un échantillon d'aliment et/ou pour comparer les résultats de séquençage de l'ADN avec les bases de données précédemment définies afin d'identifier son origine animale^[9].

Analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthodes d'analyse pour la détection et l'identification d'espèces animales dans les aliments et les produits alimentaires (méthodes basées sur le séquençage des nucléotides) —

Partie 1: Exigences générales

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie les exigences générales relatives à la performance de la méthode de séquençage de l'ADN pour la détection et l'identification d'espèces animales dans les aliments et les produits alimentaires. Les exigences de performance se limitent au séquençage Sanger et au séquençage de nouvelle génération (NGS), y compris les séquençages de deuxième et troisième générations, pour l'analyse de produits mono-espèces et de produits multi-espèces.

Le présent document est applicable aux séquences d'ADN de mammifères, oiseaux, poissons, mollusques, crustacés, amphibiens, reptiles et insectes, ainsi qu'à la validation des méthodes correspondantes.

Les méthodes de quantification de l'espèce d'ADN ne font pas partie du domaine d'application du présent document.

2 Références normatives

[ISO/FDIS 22949-1](https://www.iso.org/standards/catalog/standards/sist/2ac00d5a-52a5-483e-8792-3f2aaf0579dd/iso-fdis-22949-1)

<https://www.iso.org/standards/catalog/standards/sist/2ac00d5a-52a5-483e-8792-3f2aaf0579dd/iso-fdis-22949-1>

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 20813, *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*

ISO 21571, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Extraction des acides nucléiques*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions de l'ISO 16577 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 <https://www.electropedia.org/>.

4 Caractéristiques de performance des méthodes

4.1 Généralités

L'identité d'un organisme au niveau de l'espèce est établie par séquençage de l'ADN en comparant les séquences d'ADN obtenues à partir d'échantillons ayant des séquences de référence connues. Des résultats peuvent également être obtenus à plusieurs niveaux taxonomiques (par exemple l'ordre, l'espèce, le genre, la famille), en fonction du type de base de données et de l'analyse de données ADN effectuée.

Les méthodes utilisées pour identifier l'espèce animale par séquençage de l'ADN doivent être conformes aux recommandations de performance fournies dans le présent document. Le processus de validation de la méthode décrit dans le présent document, les études interlaboratoires et/ou intralaboratoires doivent être utilisés pour déterminer et expliciter les caractéristiques de performance de la méthode de séquençage.

Les produits mono-espèce qui ont été obtenus à partir d'un seul morceau de viande (par exemple le filet de poisson, le filet de bœuf) sont analysés de façon optimale par séquençage Sanger, tandis que le NGS est la méthode appropriée pour l'identification multi-espèces simultanée.

4.2 Adéquation à un but de la méthode

La méthode doit être adéquate pour l'identification d'organismes et de leur lien taxonomique avec d'autres organismes. L'identification à des niveaux subsécifiques (par exemple la race) est possible à condition que les bases de données et les analyses bio-informatiques soient disponibles. Les informations concernant l'applicabilité et les limites de la méthode doivent être suffisamment étayées pour répondre aux critères décrits dans le présent document. Il convient de déterminer et d'identifier la/les plateforme(s) commerciale(s) de séquençage d'ADN convenant à tous les modes opératoires de la méthode. L'ADN cible peut être localisé sur le génome nucléaire, mais également sur les génomes mitochondriaux. Une technique de codage ou de métacodage à barres de l'ADN peut être utilisée en fonction de la ou des région(s) allélique(s) à séquençer^{[10][11]}.

4.3 Base scientifique

4.3.1 Généralités

Un logigramme général du mode opératoire analytique de laboratoire est fourni à l'[Annexe A](#).

4.3.2 Séquençage Sanger

Le séquençage Sanger repose sur une méthode par terminaison de chaîne pour déterminer la séquence nucléotidique de l'ADN. L'allongement du brin répliqué d'ADN par l'ADN polymérase est interrompu par l'incorporation de nucléotides non étirables qui mettent fin à la réplication successivement à chaque position du fragment séquencé. Le marquage des quatre nucléotides non étirables (didésoxy-A, G, C et T) permet de déterminer la taille moléculaire du fragment répliqué par électrophorèse.

NOTE 1 Le séquençage Sanger ne peut être utilisé que lorsqu'un échantillon contient du tissu d'une seule espèce (par exemple un filet de poisson, un steak, une crevette), car plusieurs séquences cibles d'ADN dans un même échantillon provenant de plusieurs espèces peuvent produire plusieurs produits de terminaison de chaîne marqués à une extrémité de même longueur de chaîne. Plusieurs fragments de terminaison de chaîne de même longueur de chaîne peuvent présenter deux bases terminées ou plus à chaque position et apparaissent par électrophorèse sous forme de séquences convoluées ou chevauchantes. L'électrophérogramme de la réaction sera probablement illisible et l'identification sera compromise.

Les plateformes de séquençage automatique Sanger sont disponibles depuis de nombreuses années et sont utilisées pour le codage à barres de l'ADN afin d'identifier une seule espèce, par exemple pour identifier une espèce de poisson^{[12][13][14]}.

NOTE 2 Par exemple, voir la CEN/TS 17303:2019^[15].

4.3.3 Séquençage de nouvelle génération

Le NGS, associé au métacodage à barres de l'ADN, permet une identification robuste et fiable des espèces présentes dans les produits alimentaires complexes (contenant plusieurs espèces). Le NGS est un terme commercial utilisé pour faire référence à des méthodes de séquençage de l'ADN à haut débit (voir [Annexe B](#)).^[16] Il est aussi appelé «séquençage massivement parallèle». Les résultats prennent généralement la forme d'un fichier texte contenant des millions de lectures de séquences individuelles. Les plateformes disponibles dans le commerce prennent en charge les méthodes de séquençage NGS de deuxième et troisième générations.

Le séquençage de deuxième génération repose sur l'analyse de fragments d'ADN courts générés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ou par un processus de fragmentation pour produire des fragments pouvant atteindre une taille de 600 pb. Le séquençage de troisième génération est capable d'analyser des fragments d'ADN bien plus longs, par exemple des génomes bactériens. Il est donc parfois appelé «séquençage d'ADN à lecture longue».

4.4 Unités de mesure

Les lectures de séquences générées par séquençage Sanger ou par NGS sont comparées de manière bio-informatique avec des séquences de référence préalablement déterminées et identifiées dans des bases de données d'ADN. Le pourcentage de similarité entre la séquence de l'échantillon et la séquence de référence est calculé. Deux séquences sont homologues si elles partagent une similarité supérieure à celle qui pourrait être attribuée au simple hasard ($p \leq 0,01$).

NOTE Un pourcentage de similarité supérieur à 98 % est généralement suffisant pour identifier des séquences comme appartenant à la même espèce.

Les données d'identification doivent être fournies en tant que résultat qualitatif, sous la forme d'une liste de taxons appropriés, avec les pourcentages de similarité correspondants et, suivant le cas, la valeur attendue.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2ac00d5a-52a5-483e-8792-3f2aaf0579dd/iso-fdis-22949-1>

4.5 Applicabilité

4.5.1 Considérations relatives au produit carné ou au produit alimentaire

Il convient que la méthode contienne une définition de l'aliment ou du/des produit(s) alimentaire(s) qui seront séquencés et, le cas échéant, des matières premières dont ils sont originaires, ainsi que toute référence nécessaire aux processus de fabrication. Il sera également indiqué si l'échantillon ou les échantillon(s) sera/seront composé(s) d'une seule espèce et/ou d'espèces mélangées.

4.5.2 Plan d'échantillonnage

Il convient que des échantillons représentatifs prélevés lors d'un plan d'échantillonnage approprié soient fournis au laboratoire de séquençage. Il convient que des méthodes appropriées de sous-échantillonnage d'échantillons pour laboratoire assurent la représentativité du résultat de séquençage. Le cas échéant, il convient que les critères statistiques d'acceptation ou de rejet du résultat analytique incluent le plan d'échantillonnage et le sous-échantillonnage. Il convient que les exigences et les limitations relatives à la taille de l'échantillon pour laboratoire et au nombre d'éléments individuels composant l'échantillon, ainsi qu'à la manipulation et au stockage de l'échantillon, soient évaluées et décrites en fonction:

- du degré de traitement des constituants de l'échantillon;
- des différentes espèces et des différents types de tissus animaux impliqués;
- de la nature des matrices d'échantillon;
- de la préparation de la matrice d'échantillon destinée à l'analyse.

4.5.3 Considérations génomiques

Lors de l'évaluation de l'adéquation d'une méthode, il convient de tenir compte des aspects suivants concernant la nature de la région génomique à séquencer:

- la disposition cellulaire et génomique de la séquence, à savoir cellulaire (nucléaire ou mitochondriale) ou génomique (allélique ou spécifique du gène);
- la longueur de la séquence qui sera déterminée;
- les types et la conception des séquences d'amorces utilisées pour la préparation et le séquençage de l'échantillon et de la banque.

4.5.4 Évaluation de la méthode

L'applicabilité doit être soumise à essai en extrayant l'ADN des échantillons pour essai de matrices représentatifs du domaine analytique de la méthode.

Les produits alimentaires hautement transformés peuvent contenir de l'ADN fragmenté et/ou présenter une faible teneur en ADN, ce qui rend leur séquençage difficile. Pour compenser cela, des stratégies peuvent être utilisées, par exemple le traitement d'une plus grande quantité d'échantillons, la concentration d'extraits d'ADN, le travail avec de plus petites régions génomiques ciblées.

4.6 Sélection et évaluation des amorces

La sélection et l'évaluation des amorces sont les premières et principales étapes du processus analytique de séquençage nucléotidique lorsqu'une technique de séquençage d'ADN par PCR est utilisée. La conception de nouvelles amorces est une tâche bio-informatique effectuée à l'aide d'un logiciel dédié. Il existe de nombreux outils de sélection des amorces dans le commerce et disponibles gratuitement, par exemple Primer-BLAST et Primer 3. Les facteurs de conception d'amorces suivants influencent la performance des amorces: structures secondaires, appariements partiels de séquences, épingles à cheveux, pourcentage de GC, etc.

NOTE 1 La conception et la sélection des amorces ne sont pas considérées comme faisant partie du processus de sélection des régions génomiques à séquencer dans la technique NGS de troisième génération et dans la stratégie de fragmentation de l'ADN, par exemple le NGS de deuxième génération et le séquençage shotgun.

Des amorces universelles (consensus) peuvent être définies pour n'importe quel niveau taxonomique (espèce, genre, famille, ordre, classe, domaine, etc.). La conception de ces amorces repose sur les alignements de séquences d'ADN et sur l'identification de régions consensus qui sont pratiquement identiques parmi les taxons à identifier. Des amorces dégénérées peuvent être conçues pour augmenter l'universalité des amorces. Il est nécessaire d'évaluer toute hybridation non spécifique pour déterminer le nombre de dégénérescences incluses dans une seule amorce pour éviter toute liaison non spécifique.

Il convient d'évaluer les amorces *in silico*, quelle que soit leur utilisation dans le processus de laboratoire. Il doit être estimé, à l'aide d'outils bio-informatiques appropriés, si elles correspondent à l'espèce (au taxon) à détecter/identifier.

NOTE 2 Un exemple de processus *in silico* pour la sélection d'une combinaison d'amorces est indiqué à l'[Annexe C](#).

Il convient que l'évaluation finale de la performance de chaque combinaison d'amorces soit effectuée en appliquant le processus de laboratoire utilisant l'ADN de référence ou le matériel tissulaire (chaque fois que cela est possible) représentatif du groupe identifiable d'espèces (de taxons).

4.7 Construction et évaluation de la base de données

La base de données d'ADN utilisée pour la détection et/ou l'identification des espèces déterminera le nombre d'espèces différentes identifiables par le processus de laboratoire. La construction et l'évaluation de la base de données est une tâche bio-informatique et divers outils peuvent être utilisés, y

compris un logiciel développé en interne. Les bases de données accessibles au public peuvent également être utilisées, par exemple GenBank. Il convient que les bases de données contiennent les informations suivantes:

- la liste des espèces;
- le nombre d'entrées différentes pour chaque espèce;
- la/les région(s) de l'ADN, le(s) gène(s) et la longueur des séquences d'ADN;
- une mesure de la qualité de validation de l'/des entrée(s) des séquences.

L'évaluation finale de la performance d'une recherche bio-informatique dans une base de données doit être effectuée en appliquant le processus de laboratoire utilisant le matériau de référence (chaque fois que cela est possible) représentatif de l'espèce incluse dans la base de données (classée). L'utilisation de niveaux taxonomiques supérieurs est appropriée lorsque l'identification au niveau de l'espèce n'est pas concluante, c'est-à-dire lorsque l'échantillon n'est pas différentiable par une recherche plus ciblée. Dans GenBank, la dénomination «*Bos sp.*» peut être utilisée comme terme de recherche pour toutes les espèces du genre *Bos*.

4.8 Sélectivité et spécificité de la séquence nucléotidique

4.8.1 Généralités

L'amplification excessive de l'ADN d'espèces non-cibles peut interférer avec la détection de l'ADN d'espèces cibles, par exemple, une limite de détection (LOD) et/ou une valeur critique plus élevée. Il convient que les méthodes de séquençage Sanger et NGS (par PCR) ciblé fournissent des preuves expérimentales de la spécificité nucléotidique avec des espèces non-cibles (voir l'ISO 20813). Il convient de déterminer le degré d'interférence (sélectivité) de l'ADN non cible. Il convient d'évaluer la spécificité de la séquence nucléotidique selon un mode opératoire en deux étapes: évaluation théorique et évaluation expérimentale de l'inclusivité et de l'exclusivité. L'évaluation expérimentale est effectuée par PCR avec les amorces sélectionnées. Pour le NGS, il convient d'évaluer également les performances de chaque combinaison d'amorces avec des adaptateurs ou des codes-barres, ou les deux. La concentration minimale en ADN requise pour analyser l'identité des séquences spécifiques peut être déterminée en tant que probabilité de détection (POD) (voir l'ISO/TS 16393).^[17] Étant donné que les données de séquences sont utilisées pour vérifier les résultats de la spéciation animale, il convient que ces données reposent sur des bases de données évaluées, 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 (c'est-à-dire, provenance). En cas de résultats inattendus, il convient d'approfondir les recherches pour confirmer l'identité du matériau de référence. L'amplification de l'ADN n'est pas requise en cas d'analyse de séquençage non-PCR, par exemple le séquençage shotgun.

4.8.2 Exigences relatives aux essais d'inclusivité

Il convient de fournir les résultats expérimentaux fournis par les essais d'une méthode avec un taxon animal cible. Il convient que ces essais incluent les espèces pertinentes pour le domaine d'application de la méthode et le niveau taxonomique couvert par les amorces à utiliser. Il convient d'utiliser un nombre approprié d'espèces différentes (voir l'ISO 20813). Pour les amorces ayant moins de 100 % d'homologie de séquence avec l'espèce d'ADN cible (d'après une évaluation *in silico*), il convient de soumettre à essai l'amplificabilité de ces espèces en laboratoire afin de définir les limites des mésappariements acceptables. L'utilisateur doit définir une liste théorique d'espèces identifiables et la liste d'espèces soumises à essai en laboratoire. On sait que, selon la région d'ADN ciblée par les amorces, les niveaux de conservation peuvent être très différents. Différents gènes ont divers taux de variabilité intraspécifique des séquences d'ADN. Il convient donc de soumettre à essai un nombre approprié d'individus de chaque espèce.

Il convient que le matériau nécessaire aux essais d'inclusivité expérimentaux contienne une concentration en ADN suffisante pour la PCR et le séquençage de l'ADN, comme décrit dans l'ISO 20813. Les réplicats de chaque matériau d'échantillon doivent être soumis à essai avec des témoins adaptés aux