

NORME
INTERNATIONALE

ISO
22942-1

Première édition
2022-03

**Analyse de biomarqueurs
moléculaires — Méthodes de
réaction de polymérisation en chaîne
isotherme (isoPCR) —**

**Partie 1:
Exigences générales**

*Molecular biomarker analysis — Isothermal polymerase chain
reaction (isoPCR) methods —*

Part 1: General requirements

ISO 22942-1:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9039b6df-f6c2-4bd5-8991-8acca0504e69/iso-22942-1-2022>



Numéro de référence
ISO 22942-1:2022(F)

© ISO 2022

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 22942-1:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9039b6df-f6c2-4bd5-8991-8acca0504e69/iso-22942-1-2022>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2022

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 Principe	3
5 Mise au point d'une méthode isoPCR	3
5.1 Généralités	3
5.2 Finalité prévue	4
5.3 Fondement scientifique	4
5.4 Unités de mesure	7
5.5 Validation de la méthode	7
5.6 Critères de performance	7
5.6.1 Généralités	7
5.6.2 Sensibilité	8
5.6.3 Qualité de l'extrait d'acide nucléique	8
5.6.4 Applicabilité	8
5.6.5 Spécificité vis-à-vis de la séquence d'acide nucléique	8
5.6.6 Fidélité	8
5.6.7 Exactitude	9
5.6.8 Sélectivité	9
5.6.9 Linéarité	9
5.6.10 Limite de détection (LOD)	9
5.6.11 Limite de quantification (LOQ)	10
5.6.12 Gamme	11
5.6.13 Robustesse	12
6 Exigences générales du laboratoire et du mode opératoire	12
6.1 Compétence	12
6.2 Préparation des échantillons	13
6.2.1 Généralités	13
6.2.2 Obtention d'un échantillon représentatif	13
6.2.3 Préparation de la prise d'essai	13
6.2.4 Extraction de l'acide nucléique	13
6.3 Utilisation de témoins	14
6.3.1 Généralités	14
6.3.2 Témoins environnementaux	14
6.3.3 Témoins positifs	14
6.3.4 Témoins négatifs	14
6.3.5 Témoins d'extraction	14
6.4 Organisation de l'espace de travail	15
6.4.1 Généralités	15
6.4.2 Conception de l'espace de travail — Conception du laboratoire	15
6.4.3 Conception des espaces de travail hors du laboratoire	15
6.4.4 Personnel	15
6.4.5 Appareillage et équipement	16
7 Matériaux et réactifs	16
8 Interprétation des résultats	16
8.1 Généralités	16
8.2 Interprétation des témoins	16
8.3 Expression des résultats	17
8.3.1 Généralités	17

8.3.2	Expression d'un résultat négatif.....	17
8.3.3	Expression d'un résultat positif.....	18
8.3.4	Expression des résultats quantitatifs.....	18
8.3.5	Expression des résultats ambigus.....	19
9	Rapport d'essai	19
Annexe A	(informative) Informations minimales à fournir pour une expérience isoPCR (MIIPCRE)	20
Annexe B	(normative) Utilisation de témoins	23
Annexe C	(informative) Exemples de résultats d'amplification isotherme isoPCR d'acide nucléique	24
Annexe D	(informative) LAMP (loop mediated isothermal amplification)	25
Annexe E	(informative) RCA (rolling circle amplification)	28
Annexe F	(informative) HDA (helicase dependent amplification)	29
Annexe G	(informative) RPA (recombinase polymerase amplification)	32
Annexe H	(informative) SDA (strand displacement amplification)	34
Annexe I	(informative) NASBA (nucleic acid sequence based amplification)	36
Annexe J	(informative) Amplification Cas9nAR	40
Bibliographie	42

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 22942-1:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9039b6df-f6c2-4bd5-8991-8acca0504e69/iso-22942-1-2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9039b6df-f6c2-4bd5-8991-8acca0504e69/iso-22942-1-2022>

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*.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 22942 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

L'amplification isotherme d'acide nucléique désigne des méthodes qui utilisent des réactions catalysées par polymérase à température constante pour amplifier une séquence cible d'acide nucléique^{[1][2][3][4][5][6]}. Contrairement aux réactions de polymérisation en chaîne reposant sur l'emploi d'un thermocycleur, l'amplification isotherme d'acide nucléique ne nécessite pas de cycle de variation de la température pour la dénaturation, l'hybridation et la polymérisation même si, dans certains cas, la liaison de l'amorce nécessite une dénaturation à une seule température élevée et une étape d'hybridation. Les méthodes d'amplification isotherme peuvent être désignées par le terme «PCR isotherme (isoPCR)».

Les organismes vivants répliquent naturellement l'ADN lors de la division cellulaire et transcrivent l'ARN pour produire des éléments structurels et régulateurs de manière isotherme. L'isoPCR s'appuie sur des processus enzymatiques isothermes aussi bien naturels que synthétiques. L'ADN polymérase, l'ARN polymérase, l'hélicase, la recombinaise, l'exonucléase et la nickase comptent parmi les enzymes mises en jeu. L'isoPCR ne nécessitant pas de cycle de variation de la température pour la dénaturation, la polymérisation et l'hybridation, elle ne nécessite pas de thermocycleur de précision. Les réactions sont menées à une seule température, sauf lorsqu'une nickase ou une enzyme de déplacement n'est pas présente dans la réaction et qu'une dénaturation initiale est requise. De plus, diverses protéines de liaison d'acide nucléique non enzymatiques peuvent être nécessaires. L'amplification isoPCR peut dans bon nombre d'applications être réalisée sur des lysats cellulaires sans extraction de l'acide nucléique. La LAMP (de l'anglais, «loop-mediated isothermal amplification»)^[7], la RCA («rolling circle amplification»)^[8], la HDA («helicase dependent amplification»)^[9], la RPA («recombinase polymerase amplification»)^[10], la SDA («strand displacement amplification»)^[11], la NASBA («nucleic acid sequence-based amplification»)^[12] et la Cas9nAR («Cas9 nickase-based amplification reaction»)^[13] sont quelques exemples de stratégies d'amplification. Les stratégies LAMP, RCA, HDA, RPA, SDA et NASBA peuvent intégrer aussi bien de l'acide désoxyribonucléique (ADN) que de l'acide ribonucléique (ARN) dans les acides nucléiques amplifiés. La Cas9nAR n'utilise que de l'ADN comme matrice de départ pour l'amplification.

Les méthodes isoPCR peuvent être utilisées pour l'amplification, la détection, l'identification, la quantification et l'analyse d'acides nucléiques spécifiques en faible concentration dans les aliments et les produits alimentaires. Ces méthodes peuvent, dans la plupart des cas, amplifier des acides nucléiques d'extraits nucléotidiques non purifiés. La détection de la séquence cible est réalisée au moyen de techniques en temps réel ou au point final utilisant l'une des différentes stratégies d'amplification et différentes chimies de détection. Les chimies de détection incluent la turbidimétrie, la chromatographie, l'électrophorèse sur gel et la fluorescence, et peuvent, dans certaines applications, être réalisées dans un système de dispositif à débit latéral fermé.

Les caractéristiques clés des méthodes isoPCR sont l'amplification d'acide nucléique à température constante, l'utilisation d'extraits bruts, des méthodes de détection simples, et des temps de réaction courts sans nécessiter de thermocycleur de précision.

Les méthodes isoPCR gagnant en popularité et ayant une applicabilité de plus en plus diversifiée, il est important de normaliser les critères d'acceptation de ces méthodes pour les produits alimentaires.

Analyse de biomarqueurs moléculaires — Méthodes de réaction de polymérisation en chaîne isotherme (isoPCR) —

Partie 1: Exigences générales

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie des critères généraux pour la mise au point, la validation et l'utilisation de méthodes d'analyse d'acide nucléique fondées sur la réaction de polymérisation en chaîne isotherme (isoPCR). Il délivre des informations supplémentaires et des recommandations pour des technologies isoPCR particulières.

Le présent document est applicable aux aliments, aux aliments pour animaux, aux matrices végétales et à leurs propagules, aux agents phytopathogènes, et aux animaux pour lesquels une amplification d'une séquence biomoléculaire cible spécifique est requise.

2 Références normatives

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/TS 16393, *Analyse de biomarqueurs moléculaires — Détermination des caractéristiques de performance des méthodes de mesure qualitatives et validation des méthodes*

ISO 16577, *Analyse de biomarqueurs moléculaires — Vocabulaire pour les méthodes d'analyse de biomarqueurs moléculaires dans l'agriculture et la production agroalimentaire*

3 Termes et définitions

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

3.1

témoin négatif d'extraction

témoin négatif obtenu après avoir effectué toutes les étapes requises d'un mode opératoire d'extraction ne comprenant toutefois pas l'ajout de la prise d'essai

EXEMPLE En remplaçant la prise d'essai par de l'eau.

Note 1 à l'article: Ce témoin permet de démontrer l'absence de contamination durant l'extraction.

3.2

témoin d'extraction

témoin positif obtenu après avoir effectué toutes les étapes requises d'un mode opératoire d'extraction sur une prise d'essai toutefois connue dont la quantité d'acide nucléique ou de tissu cible est connue

Note 1 à l'article: Ce témoin permet de démontrer la performance du processus d'extraction.

3.3

réaction de polymérisation en chaîne isotherme

isoPCR

amplification isotherme d'acide nucléique

technologie d'amplification isotherme d'acide nucléique

amplification isotherme

réaction de polymérisation en chaîne qui polymérise des acides nucléiques sans *cycle thermique* (3.10), par exemple à température constante

Note 1 à l'article: Dans certaines applications isoPCR, les acides nucléiques sont dénaturés à une température plus élevée avant de commencer la réaction d'amplification.

Note 2 à l'article: Sept stratégies isoPCR sont décrites dans le présent document. Ces stratégies peuvent être appliquées à un certain nombre de méthodes différentes intégrant une extraction d'ADN, une amplification et des chimies de détection.

3.4

méthode isoPCR

méthode d'analyse qui applique une stratégie *isoPCR* (3.3)

3.5

conditions de terrain hors du laboratoire

espace de travail ne bénéficiant ni de conditions maîtrisées concernant la contamination par un aérosol environnemental, ni d'un appareillage sophistiqué de purification de l'acide nucléique

3.6

spécificité vis-à-vis d'une séquence nucléotidique

aptitude à ne reconnaître exclusivement qu'une séquence cible d'acide nucléique à amplifier, en la différenciant des autres acides nucléiques et contaminants

3.7

gamme dynamique de pourcentage

gamme d'applicabilité de pourcentage

domaine de quantification de pourcentage

rapport exprimé sous la forme d'un pourcentage des limites supérieure et inférieure de quantification présentées par un groupe de matériaux (ou dilutions) de référence avec un niveau approprié de fidélité et d'exactitude

3.8

échantillon représentatif

unités d'échantillonnage (échantillons ou groupes) qui ont été extraites du lot au moyen d'un processus garantissant que toutes les unités d'échantillonnage ont les mêmes chances d'être sélectionnées et n'ont pas été modifiées au point de fausser le résultat d'analyse

Note 1 à l'article: Le processus d'extraction peut être un processus à multiples étapes.

[SOURCE: ISO 22753:2021, 3.15]

3.9 sélectivité

limite jusqu'à laquelle une méthode peut déterminer la présence d'un ou plusieurs analytes particuliers en mélange ou dans une ou plusieurs matrices sans interférences d'autres composants de comportement similaire

Note 1 à l'article: La sélectivité d'une *méthode isoPCR* (3.4) destinée à l'ARN ou à l'ADN ou aux deux peut être déterminée par rapport à des inhibiteurs tels que les polyamines, les polysaccharides et les polyphénols, car ceux-ci interfèrent sur l'aptitude de la réaction à amplifier et déceler une séquence cible spécifique.

Note 2 à l'article: Il est nécessaire de bien faire la distinction entre sélectivité et *spécificité vis-à-vis d'une séquence nucléotidique* (3.6), la spécificité caractérisant le degré de reconnaissance de la séquence cible par l'analyse aux niveaux moléculaires ou taxonomiques.

3.10 cycle thermique

thermocycle

processus incluant de nombreuses étapes de chauffage et de refroidissement d'un programme de température prédéterminé utilisé pour dénaturer, hybrider et allonger des acides nucléiques dans une réaction de polymérisation en chaîne

4 Principe

La détection de la séquence cible est réalisée au moyen de techniques en temps réel ou au point final qui appliquent une stratégie d'amplification donnée et s'appuient sur différentes chimies de détection. Les chimies de détection incluent la turbidimétrie, la chromatographie, l'électrophorèse sur gel et la fluorescence. Dans certaines applications isoPCR, un produit peut être détecté dans un système de dispositif à débit latéral fermé ou dans un instrument de détection de fluorescence.

Une vue d'ensemble de sept exemples de stratégies d'amplification isoPCR est donnée dans le [Tableau 1](#). Les [Annexes D à J](#) fournissent une description et précisent les domaines d'application, les avantages et les inconvénients de chaque stratégie isoPCR.

/9039b6df-f6c2-4bd5-8991-8acca0504e69/iso-22942-1-2022

5 Mise au point d'une méthode isoPCR

5.1 Généralités

Une méthode isoPCR sur ADN ou ARN peut être utilisée pour détecter, identifier et, si besoin, quantifier un ou plusieurs acides nucléiques cibles spécifiques voulus. Une méthode comprend:

- une extraction propre à la matrice (si besoin);
- une ou plusieurs éventuelles étapes de purification complémentaire;
- les constituants enzymatiques et réactifs;
- une description des amorces et sondes oligonucléotidiques (marquées et non marquées) qui seront utilisées (notamment la façon dont les séquences oligonucléotidiques et cibles ont été choisies);
- une description de la méthode de détection des produits amplifiés;
- un protocole décrivant les conditions selon lesquelles la méthode isoPCR est utilisée notamment l'utilisation de témoins et des exemples de calcul.

Un cadre directeur pour les informations minimales à fournir en vue d'une publication d'expériences isoPCR (MIIPCRE, de l'anglais «minimum information for publication of isoPCR experiments») est donné à l'[Annexe A](#). Le MIIPCRE constitue un cadre directeur pour les informations minimales nécessaires à l'évaluation des expériences isoPCR. L'[Annexe A](#) est une liste de points de contrôle destinée aux laboratoires.

5.2 Finalité prévue

Des informations concernant la finalité prévue et les limites d'une méthode doivent être fournies. L'adéquation de la méthode quant à la finalité doit notamment être évaluée sur la base des critères et exigences spécifiés dans le présent document.

5.3 Fondement scientifique

Une vue d'ensemble des principes et de l'application de la méthode doit être fournie. Il convient d'inclure des références appropriées à des publications scientifiques pertinentes.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 22942-1:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9039b6df-f6c2-4bd5-8991-8acca0504e69/iso-22942-1-2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9039b6df-f6c2-4bd5-8991-8acca0504e69/iso-22942-1-2022>

Tableau 1 — Vue d'ensemble générale des sept stratégies d'amplification isoPCR

Stratégie isoPCR	Acide nucléique cible	Enzymes impliquées	Chauffage initial	Durée (h)	Amplification Type	Température (°C)	Méthode(s) de mesure	LOD (copies)	Analyte	Méthode(s) de détection	Matériel nécessaire
LAMP	ADN, ARN	Polymérase	Oui	< 1	Exponentielle	60 à 65	Qualitative, quantitative	~5	ADN, ARN, petites molécules	Turbidimétrie de pyrophosphate, marqueur fluorescent, électrochimie, hybridation de marqueur nucléotidique simple brin	Détection visuelle, turbidimètre (en temps réel); fluorimètre isotherme; puce microfluidique LAMP électrochimique, dispositifs de détection à débit latéral ou membrane à réseau de bandes pré-imprimé
RCA	ADN, ARN	Polymérase	Oui	1 à 4	Linéaire	30 à 65	Qualitative, quantitative	10	ADN, ARN, protéine, ADN méthylé, petites molécules, cellules	Marqueurs fluorescents, fluorimétrie	Spectrophotomètre, fluorimètre isotherme
HDA	ADN, ARN	Hélicase, polymérase	Non	0,5 à 2	Exponentielle	64	Qualitative, quantitative	1	ADN, protéine	Électrophorèse sur gel; immunohistochimie, marqueurs fluorescents	Cuve d'électrophorèse, transilluminateur UV; système de dispositif à débit latéral fermé, fluorimètre isotherme
RPA	ADN, ARN	Recombinaison, polymérase	Non	< 1	Exponentielle	37 à 42	Qualitative, quantitative	1	ADN, ARN, protéine	Électrophorèse sur gel; immunohistochimie, fluorimétrie	Cuve d'électrophorèse, transilluminateur UV; système de dispositif à débit latéral fermé, fluorimètre isotherme
SDA	ADN, ARN	Polymérase, enzyme de restriction	Oui	1 à 2	Exponentielle	30 à 55	Qualitative	10	ADN, ARN, petites molécules	Électrophorèse sur gel; marqueurs indicateurs de pH; fluorescence	Cuve d'électrophorèse, transilluminateur UV; détection visuelle; spectrophotomètre ou fluorimètre isotherme
NASBA	ARN, ADN	Transcriptase inverse, ARN polymérase, RNase H	Non	1 à 3	Exponentielle	41	Qualitative, quantitative	1	ADN, ARN, micro-ARN, protéine	Électrophorèse sur gel; sondes fluorescentes; ELISA, fluorimétrie	Cuve d'électrophorèse, transilluminateur UV; lecteur de microplaque, fluorimètre isotherme

NOTE Adapté de la Référence [19].

Tableau 1 (suite)

Stratégie isoPCR	Acide nucléique cible	Enzymes impliquées	Chauffage initial	Durée (h)	Amplification		Méthode(s) de mesure	LOD (copies)	Analyte	Méthode(s) de détection	Matériel nécessaire
					Type	Température (°C)					
Cas9nAR	ADN	Cas9 polymérase	Non		Exponentielle	37	Qualitative		ADN	Électrophorèse sur gel; marqueurs fluorescents	Cuve d'électrophorèse, transilluminateur UV; fluorimètre isotherme ou détection visuelle

NOTE Adapté de la Référence [19].

iteh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 22942-1:2022](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9039b6df-f6c2-4bd5-8991-8acca0504e69/iso-22942-1-2022>

5.4 Unités de mesure

Le mesurage qualitatif (binaire) avec des méthodes isoPCR fournit un résultat binaire fondé sur une probabilité de détection (POD) prédéterminée. Les mesurages qualitatifs sont utilisés pour déterminer la présence ou l'absence de biomarqueurs moléculaires dans les aliments ou les produits alimentaires (y compris dans les graines et les propagules de cultures vivrières). La caractérisation de la performance d'une méthode qualitative doit être réalisée conformément à l'ISO/TS 16393.

Les méthodes quantitatives déterminent la quantité de l'analyte cible présente dans un échantillon. Les unités de mesure quantitatives (par exemple, nombre de copies cibles), les critères de performance et les critères concernant le compte-rendu des données doivent être spécifiés. Les résultats quantitatifs peuvent être exprimés dans le compte-rendu:

- en nombre de copies d'acide nucléique (c);
- sous la forme d'un rapport de nombres de copies (c/c_r , où c_r est un nombre de copies de référence connu);
- sous la forme du pourcentage de l'analyte;
- selon d'autres critères décrits par la méthode.

Les principes de calcul de tout rapport utilisé doivent être indiqués. Pour les méthodes de quantification, la stratégie de quantification dépendra de l'application. L'application d'une évaluation d'une méthode de détermination du nombre de copies ou d'une droite d'étalonnage peut être effectuée conformément à l'ISO 20395^[15].

5.5 Validation de la méthode

La méthode isoPCR doit être mise au point en prenant en compte son adéquation à la finalité. La validation et la vérification doivent inclure suffisamment d'essais pour qu'il puisse être statué avec suffisamment de certitude que le mode opératoire est sélectif et répétable et qu'il peut détecter la cible dans une gamme d'applicabilité connue. Même si les études interlaboratoires sont préférables, les validations menées par un seul laboratoire peuvent être acceptables. La publication de Thompson et al.^[16] fournit des critères relatifs à la validation d'une méthode par un seul laboratoire et l'ISO/TS 16393 donne des recommandations complémentaires pour la validation interlaboratoires de méthodes qualitatives.

L'ISO 20395 donne des exigences générales applicables à l'évaluation de la performance et visant à garantir la qualité des méthodes utilisées pour la quantification de séquences d'acides nucléiques spécifiques (cibles) couvrant la validation de la méthode (fidélité, linéarité, limite de quantification, limite de détection, justesse et robustesse).

Il convient de mener les essais interlaboratoires de méthodes isoPCR lors de l'étape de validation. Pour les méthodes quantitatives, le protocole harmonisé ISO/AOAC/IUPAC^[17] décrit un processus pour la validation d'une méthode par des essais interlaboratoires. Il convient d'analyser les résultats de l'ensemble des essais interlaboratoires et/ou des essais intralaboratoires, ainsi que les caractéristiques de performance obtenues, de les décrire et de les joindre à la méthode publiée^[16].

Le Rapport technique du JRC intitulé «Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods» (disponible en anglais seulement) donne des recommandations relatives à la manière de mener la vérification de méthode dans le cas de méthodes validées par des essais interlaboratoires pour la détection qualitative et quantitative d'OGM^[18].

5.6 Critères de performance

5.6.1 Généralités

Les critères de performance doivent être déterminés et définis pour la validation de la méthode. Les critères de performance incluent la sensibilité, la qualité de l'extrait d'acide nucléique, l'applicabilité, la spécificité vis-à-vis de la séquence d'acide nucléique, la fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire,

reproductibilité), l'exactitude, la sélectivité, la linéarité, la limite de détection, la limite de quantification, la gamme, l'incertitude de mesure et la robustesse.

5.6.2 Sensibilité

La sensibilité d'une méthode d'amplification isoPCR pour l'analyse de biomarqueurs doit être établie en déterminant la pente d'une droite d'étalonnage. La droite d'étalonnage peut être construite en analysant une série d'échantillons préparés à différentes dilutions au dixième de sorte à abaisser la concentration en ADN cible. Un minimum de cinq concentrations d'échantillon, chacune analysée en triple, est requis.

5.6.3 Qualité de l'extrait d'acide nucléique

Il convient d'extraire les acides nucléiques de matrices des types les plus pertinents, incluant les types reflétant le domaine d'application de la méthode, contenant une teneur massique connue de la ou des cibles par rapport à l'acide nucléique génomique des espèces (uniformément répartis sur la gamme dynamique de pourcentage de la méthode) et des tissus pertinents pour l'application.

Le mode opératoire d'extraction des acides nucléiques utilisé pour la validation et la vérification de la méthode isoPCR d'une cible spécifique dans une matrice spécifique doit être identifié. La méthode d'extraction doit produire des acides nucléiques de longueur, de pureté chimique et d'intégrité structurelle suffisantes pour l'amplification et l'analyse ultérieures. Dans le cas d'une amplification directement à partir d'extraits cellulaires, la détermination de la qualité de l'extrait d'acide nucléique dépend de la matrice donnée. Il convient de déterminer la performance sur la base des résultats de chaque matrice cellulaire soumise à essai. La qualité de l'extrait d'acide nucléique est influencée par la concentration en acide nucléique, l'intégrité structurelle, la pureté, la présence d'inhibiteurs, etc.

5.6.4 Applicabilité

L'applicabilité, ou adéquation à la finalité, des méthodes isoPCR doit couvrir la finalité prévue, un protocole, la cible, la position cellulaire de la cible (noyau ou mitochondrie), et la gamme de nombres de copies ou la gamme de concentration dans laquelle la cible est détectable. Il convient de tenir compte également de la nature de la matrice (par exemple, organisme, tissus, aliment transformé).

5.6.5 Spécificité vis-à-vis de la séquence d'acide nucléique

Les spécificités théoriques vis-à-vis de la séquence d'acide nucléique des amorces et des sondes doivent être évaluées par une recherche dans des bases de données pertinentes.

Les amorces d'amplification doivent être conçues pour reconnaître et s'hybrider sur leurs séquences complémentaires et permettre une amplification de cible spécifique. Il convient de réaliser cette détermination *in silico* éventuellement à l'aide d'une application de conception d'amorce avant de soumettre à essai les amorces. La spécificité vis-à-vis de la séquence d'acide nucléique de méthodes de détection pour une cible donnée dépend des propriétés spécifiques de la séquence d'ADN ciblée et peut fortement fluctuer d'une application isoPCR à l'autre. Il est donc primordial de veiller à ce que la ou les méthodes choisies fournissent les niveaux voulus de spécificité vis-à-vis de la séquence d'acide nucléique et de sélectivité vis-à-vis de l'acide nucléique (ADN ou ARN). Dans le cas où l'ARN est la cible, il est parfois nécessaire de tenir compte d'autres aspects.

5.6.6 Fidélité

5.6.6.1 Généralités

La fidélité de la méthode d'amplification isoPCR doit être déterminée. Il convient que la validation par un seul laboratoire et les essais interlaboratoires couvrent l'ensemble de la gamme de matrices et d'espèces cibles.

5.6.6.2 Matériau de référence et matériau de référence certifié

Il convient d'analyser plusieurs fois un matériau de référence certifié dans le cadre de la validation par un seul laboratoire d'une méthode isoPCR pour évaluer le biais attribuable au laboratoire et à la méthode. D'autres matériaux de référence, c'est-à-dire les matériaux destinés aux essais d'aptitude qui n'ont pas été utilisés, peuvent également être utilisés à cette fin si l'incertitude associée est connue. Les informations relatives à un dopage et au taux de récupération peuvent également être utilisées même si l'incertitude de mesure n'est pas toujours connue.

5.6.6.3 Écart-type de répétabilité (s_r)

L'écart-type de répétabilité doit être déterminé pour une gamme de concentrations d'analyte pour la vérification par le laboratoire et la validation par un seul laboratoire.

5.6.6.4 Écart-type de reproductibilité (s_R)

L'écart-type de reproductibilité doit être déterminé pour une gamme de concentrations d'analyte pour la validation et les essais interlaboratoires.

5.6.7 Exactitude

Il convient de déterminer l'exactitude d'une méthode isoPCR par comparaison aux résultats obtenus avec une autre méthode pour la même cible ou à des résultats d'un calibrateur. L'exactitude est parfois fondée sur la récupération d'extraction, mais il convient toutefois d'inclure également dans cette estimation le biais dû à l'amplification.

5.6.8 Sélectivité

Il convient d'évaluer la sélectivité de la méthode par rapport aux molécules les plus susceptibles d'induire des interférences sur les analytes cibles, par exemple ARNr, ADN similaire, polyglycosides, protéine. Il convient qu'une méthode isoPCR soit suffisamment sélective pour ignorer toute molécule interférente.

5.6.9 Linéarité

Il convient que la fonction d'étalonnage soit linéarisable, passe par l'origine et ne soit pas influencée par la matrice cellulaire du matériau soumis à essai. La composante linéarisable de la réponse d'une détermination de gamme dynamique doit permettre de déterminer la concentration de l'analyte dans les échantillons pour essai lorsqu'une quantification est réalisée. Il convient d'utiliser au moins six solutions d'étalonnage pour déterminer la linéarité. Il convient de connaître la probabilité de détection (POD) pour une détermination qualitative.

5.6.10 Limite de détection (LOD)

La LOD d'une méthode est déterminée tant pour l'analyse qualitative que pour l'analyse quantitative. La LOD est la quantité ou concentration nette vraie de l'analyte dans le matériau à analyser qui conduira, avec une probabilité $(1-\beta)$, à la conclusion selon laquelle la concentration ou quantité d'analyte dans le matériau analysé est supérieure à celle présente dans le matériau à blanc. Elle est définie conformément à la [Formule \(1\)](#):

$$P_r(\hat{L} \leq L_c | L = L_D) = \beta \quad (1)$$

où

L_D est la LOD;