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

Partie 2:
Méthode de détection

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

Part 2: Method for detection

ISO 15216-2:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/bf60ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019>



iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 15216-2:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/bf60ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/bf60ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019>



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	v
Introduction	vi
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 RT-PCR en temps réel.....	3
4.4 Témoins.....	4
4.4.1 Virus témoin de processus.....	4
4.4.2 Témoin ARN CE.....	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 nécessitant une préparation.....	6
6 Équipement et consommables	7
7 Échantillonnage	9
8 Mode opératoire	9
8.1 Exigences générales de laboratoire.....	9
8.2 Extraction de virus.....	9
8.2.1 Généralités.....	9
8.2.2 Virus témoin de processus.....	9
8.2.3 Témoin négatif de processus.....	9
8.2.4 Surfaces.....	9
8.2.5 Baies et légumes feuilles, tiges et bulbes.....	10
8.2.6 Eau embouteillée.....	11
8.2.7 Mollusques bivalves (MBV).....	11
8.3 Extraction d'ARN.....	12
8.4 RT-PCR en temps réel.....	12
8.4.1 Exigences générales.....	12
8.4.2 Analyse de RT-PCR en temps réel.....	13
9 Interprétation des résultats	15
9.1 Généralités.....	15
9.2 Élaboration des courbes étalon d'ARN du virus témoin de processus.....	15
9.3 Contrôle de l'inhibition de la RT-PCR.....	15
9.4 Calcul du rendement d'extraction.....	16
10 Expression des résultats	16
11 Caractéristiques de performance de la méthode	17
11.1 Étude de validation.....	17
11.2 Sensibilité.....	17
11.3 Spécificité.....	17
11.4 LDD ₅₀	17
12 Rapport d'essai	17
Annexe A (normative) Diagramme de mode opératoire	19
Annexe B (normative) Composition et préparation des réactifs et des tampons	20
Annexe C (informative) Mélanges réactionnels de RT-PCR en temps réel et paramètres de cycles	23

Annexe D (informative) Amorces et sondes d'hydrolyse de la RT-PCR en temps réel pour la détection du VHA, du norovirus GI et GII et du mengovirus (témoin de processus)	24
Annexe E (informative) Multiplication de la souche du mengovirus MC₀ utilisé comme témoin de processus	27
Annexe F (informative) Extraction d'ARN avec le système NucliSens® de chez BioMérieux	28
Annexe G (informative) Solutions mères d'ARN contrôle externe (ARN CE)	30
Annexe H (informative) Disposition de plaque optique type	33
Annexe I (informative) Études de validation de la méthode et caractéristiques de performances	35
Bibliographie	47

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 15216-2:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/bf60ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/bf60ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019>

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 du Comité européen de normalisation (CEN) CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'accord de coopération technique établi entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette première édition annule et remplace ISO/TS 15216-2:2013, qui a fait l'objet d'une révision technique avec les changements suivants:

- une exigence concernant l'utilisation d'un tampon adapté pour la dilution des témoins a été ajoutée;
- la méthode de préparation de l'ARN du virus témoin de processus pour la courbe étalon a été modifiée;
- des points d'arrêt avec des paramètres définis de température et de temps dans les méthodes d'extraction ont été ajoutés;
- le terme «efficacité d'amplification» a été remplacé par «inhibition de la RT-PCR»;
- des réactions supplémentaires de RT-PCR en temps réel pour l'ARN de l'échantillon et les témoins négatifs ont été ajoutées;
- les caractéristiques de la méthode et les résultats des études de validation de la méthode ont été ajoutés.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 15216 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 virus de l'hépatite A (VHA) et les norovirus sont des agents importants de maladies virales d'origine alimentaire, chez l'humain. Aucune méthode de routine n'existe pour la culture des norovirus, et les méthodes de culture du VHA ne sont pas adaptées à l'application en routine aux 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 adaptées à l'usage. En ce qui concerne les surfaces, les virus sont prélevés par écouvillonnage. L'extraction de virus dans les baies et les légumes feuilles, tiges et bulbes 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, suivies d'une étape de concentration par ultrafiltration sont utilisées. Les virus contaminant les mollusques bivalves (MBV) sont extraits des tissus digestifs par traitement avec une solution de protéinase K. Pour toutes les matrices qui ne sont pas couvertes par le présent document, il est nécessaire de valider cette méthode. La méthode d'extraction d'ARN, commune à toutes les matrices, est basée sur la lyse 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 RT-PCR en temps réel en mesurant l'excitation de molécules marquées par fluorescence. Lors d'une RT-PCR en temps réel utilisant une sonde d'hydrolyse, le marqueur fluorescent est fixé à une sonde nucléotidique spécifique d'une séquence, ce qui permet une confirmation simultanée de la présence de la séquence cible. Ces modifications augmentent la sensibilité et la spécificité de la méthode de RT-PCR en temps réel, et rendent alors inutiles les étapes de confirmation post RT-PCR du produit amplifié. En raison de la complexité de la méthode, il est nécessaire d'inclure une série exhaustive de témoins. La méthode décrite dans le présent document permet la détection des ARN viraux dans l'échantillon pour essai. L'Annexe A présente un diagramme de mode opératoire.

Les principales modifications énumérées dans l'Avant-propos, introduites dans le présent document par rapport à l'ISO/TS 15216-2:2013, sont considérées comme mineures (voir l'ISO 17468).

[ISO 15216-2:2019](https://standards.iteh.ai/standards/iso/bf60ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/bf60ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019>

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

Partie 2: Méthode de détection

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détection du virus de l'hépatite A (VHA) et des norovirus des génogroupes I (GI) et II (GII) dans des échantillons pour essai d'aliments (baies, légumes feuilles, tiges et bulbes, eau embouteillée, mollusques bivalves) ou sur des surfaces par RT-PCR en temps réel.

Cette méthode n'est pas validée pour la détection des virus cibles dans d'autres aliments (y compris les aliments à plusieurs composants) ou d'autres matrices, ni pour la détection d'autres virus dans les aliments, sur les surfaces ou dans d'autres matrices.

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 20838, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour les méthodes qualitatives* <https://standards.iso/b160ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019>

ISO 22119, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions*

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 de l'ISO 20838, l'ISO 22119, l'ISO 22174 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

aliment

substance utilisée ou préparée pour être utilisée comme aliment

Note 1 à l'article: Pour les besoins du présent document, cette définition inclut l'eau embouteillée.

3.2

surface

surface des aliments, surface de préparation des aliments ou surface en contact avec les aliments

3.3

baies

petit fruit comestible sans noyau

EXEMPLE Fraises, framboises, groseilles.

3.4

légumes feuilles, tiges et bulbes

feuilles, tiges et bulbes de végétaux consommés en tant que légumes

EXEMPLE Laitue, oignons verts.

3.5

virus de l'hépatite A

VHA

membre de la famille des *Picornaviridae* responsable d'hépatite infectieuse

Note 1 à l'article: Génétiquement, le VHA peut être subdivisé en six génotypes sur la base de la 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). Il n'existe qu'un sérotype.

Note 2 à l'article: La transmission se fait par voie féco-orale de personne à personne, par la consommation d'aliments (3.1) contaminés, par contact avec de l'eau ou des surfaces (3.2) contaminées, ou par contact avec des matières contaminées. Le VHA est classé comme étant un agent biologique de groupe 2 par l'Union européenne et un agent pathogène du groupe de risque 2 selon les United States National Institutes of Health.

3.6

norovirus

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

Note 1 à l'article: Génétiquement, les norovirus peuvent être subdivisés en sept génogroupes distincts. 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.

Note 2 à l'article: La transmission se fait par voie féco-orale de personne à personne, par la consommation d'aliments (3.1) contaminés, par contact avec de l'eau ou des surfaces (3.2) contaminées, ou par contact avec des matières contaminées. Les norovirus GI et GII sont classés comme étant des agents biologiques de groupe 2 par l'Union européenne et des agents pathogènes du groupe de risque 2 selon les United States National Institutes of Health.

3.7

détection du VHA

détection de l'ARN du VHA (3.5) dans une masse ou un volume d'aliments (3.1) ou sur une superficie de surface (3.2) prédéterminés

3.8

détection des norovirus

détection de l'ARN du norovirus (3.6) dans une masse ou un volume d'aliments (3.1) ou sur une superficie de surface (3.2) prédéterminés

3.9

virus témoin de processus

virus ajouté à la prise d'échantillon, avant de commencer l'extraction du virus, afin de contrôler le rendement d'extraction

3.10

ARN du virus témoin

ARN extrait du virus témoin de processus (3.9) permettant d'établir une courbe étalon en vue de l'estimation du rendement d'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

3.12**témoin négatif de processus**

échantillon de la matrice alimentaire sans agent pathogène cible, ou échantillon n'appartenant pas à la matrice sans agent pathogène cible, soumis à toutes les étapes du processus analytique

3.13**sonde d'hydrolyse**

sonde fluorescente couplée à une molécule fluorescente et une molécule quencher, qui sont séparées de façon stérique par l'activité d'exonucléasique 5'-3' de l'enzyme pendant le processus d'amplification

3.14**témoin négatif de RT-PCR en temps réel**

aliquot d'eau très pure utilisée dans une RT-PCR en temps réel permettant de s'assurer de la non-contamination des réactifs de RT-PCR en temps réel

3.15**ARN contrôle externe****ARN CE**

ARN de référence pouvant être utilisé pour évaluer l'inhibition de l'amplification d'une réaction de RT-PCR en temps réel appropriée, qui est ajouté à un aliquot d'ARN de l'échantillon selon une quantité donnée dans une réaction distincte

EXEMPLE ARN synthétisé par transcription *in vitro* à partir d'un plasmide portant une copie du gène cible.

3.16**valeur C_q**

cycle de quantification, correspondant au moment réactionnel où la cible est quantifiée pour une réaction donnée de RT-PCR en temps réel

Note 1 à l'article: Cela correspond au cycle auquel la réaction de fluorescence dépasse un niveau seuil.

4 Principe**4.1 Extraction de virus**

Les aliments et les surfaces couverts par le présent document sont souvent des matrices hautement complexes et les virus cibles peuvent être présents à de faibles 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 permet d'obtenir des préparations d'ARN de pureté appropriée afin de réduire les effets des inhibiteurs de RT-PCR. Dans le présent document, le thiocyanate de guanidinium, réactif chaotropique, est utilisé pour la lyse de la capsid virale. L'ARN est ensuite adsorbé sur de la 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 RT-PCR en temps réel.

4.3 RT-PCR en temps réel

Le présent document utilise la RT-PCR en temps réel en une étape avec des sondes d'hydrolyse. Dans la technique de RT-PCR en temps réel en une étape, la transcription inverse et l'amplification par PCR sont effectuées consécutivement dans le même tube.

La RT-PCR en temps réel utilisant des sondes d'hydrolyse comprend une sonde d'ADN courte marquée par une molécule fluorescente et un quencher fluorescent respectivement aux extrémités 5' et 3'. La chimie de cette réaction garantit qu'au cours du processus d'amplification de la cible, la sonde est hydrolysée et le signal fluorescent libéré par la sonde augmente proportionnellement.

En raison des faibles concentrations de virus cible dans les aliments ou sur les surfaces et de la diversité des souches dans les virus cibles, 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 adaptés aux virus cibles. Pour cela, des lignes directrices sont données en [5.2.19](#) et [5.2.20](#). Des exemples détaillés de réactifs, d'amorces et de sondes (utilisés lors de l'élaboration du présent document) sont fournis dans les [Annexes C](#) et [D](#).

4.4 Témoins

4.4.1 Virus témoin de processus

Des pertes de virus cible 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 dès que cela est possible avant de commencer l'extraction du virus 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, non enveloppé, 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 RT-PCR en temps réel croisées entre virus cibles et virus témoins, et sa présence dans les aliments ou sur les surfaces à l'état naturel ne doit normalement pas être possible.

Un exemple de préparation du virus témoin de processus (utilisé lors de l'élaboration du présent document) est fourni à l'[Annexe E](#).

4.4.2 Témoin ARN CE

Des substances inhibitrices de la RT-PCR sont contenues dans de nombreuses matrices alimentaires, mais peuvent également provenir d'une contamination due à un traitement effectué en amont. Afin d'évaluer l'éventuelle inhibition de la RT-PCR dans un échantillon individuel, un ARN CE (une séquence d'ARN comportant la séquence cible d'intérêt, [5.3.11](#)) est ajouté à un aliquot d'ARN de l'échantillon et soumis à essai en utilisant la méthode RT-PCR en temps réel. Une comparaison des résultats de cet essai avec les résultats d'un ARN CE amplifié en l'absence d'ARN de l'échantillon permet la détermination du niveau d'inhibition de la RT-PCR pour chaque échantillon soumis à essai. De plus, dans cette méthode, le témoin ARN CE agit comme un témoin positif de la RT-PCR en temps réel pour les virus cibles.

Il est permis d'appliquer des approches différentes pour l'évaluation de l'inhibition de la RT-PCR à condition qu'il soit possible de démontrer que les performances sont équivalentes à celles de la méthode utilisant l'ARN CE.

4.5 Résultats des essais

En ce qui concerne les surfaces, cette méthode fournit un résultat exprimé par «génomètre de virus détecté» ou par «génomètre de virus non détecté», suivi de «dans $x \text{ cm}^2$ » où x est la surface approximative de la zone prélevée. Lorsqu'il n'est pas possible d'enregistrer la surface de prélèvement, les résultats sont exprimés par «génomètre de virus détecté» ou «génomètre de virus non détecté». Pour les autres types d'échantillons, les résultats sont exprimés par «génomètre de virus détecté» ou par «génomètre de virus non détecté» suivi de «dans $x \text{ ml}$ » ou «dans $x \text{ g}$ », 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.

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 disodique (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 bœuf en poudre.

5.2.10 Protéinase K.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/bf60ea21-6472-43a0-a2c3-d44d7293ba9d/iso-15216-2-2019>

5.2.11 Pectinase d'*Aspergillus niger* ou *A. aculeatus*.

5.2.12 Chloroforme.

5.2.13 n-Butanol.

5.2.14 Hydroxyde de sodium (NaOH) (≥ 10 mol/l).

5.2.15 Acide chlorhydrique (HCl) (≥ 5 mol/l).

5.2.16 Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), sel disodique dihydraté.

5.2.17 Silice, tampons de lyse, de lavage et d'élution pour l'extraction de l'ARN viral. Les réactifs doivent permettre de traiter 500 μl d'extrait d'échantillon, par réaction de lyse dans un tampon chaotrope contenant du thiocyanate de guanidinium^[4] et en utilisant la silice comme matrice de capture de 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'élution.

La préparation d'ARN doit être d'une qualité et d'une concentration adaptées aux fins prévues. Voir l'[Annexe F](#) pour les détails d'un exemple de réactifs d'extraction d'ARN (utilisés lors de l'élaboration de la méthode décrite dans le présent document).

5.2.18 Réactifs pour la 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 RT-PCR en temps réel en une étape en utilisant des sondes d'hydrolyse (l'ADN polymérase utilisée doit posséder une activité exonucléasique 5'-3') et ils doivent présenter une sensibilité suffisante pour la détection de concentrations des ARN viraux attendus dans les aliments et les surfaces contaminés par des virus. Voir l'[Annexe C](#) pour les détails d'un exemple de réactifs utilisés pour la RT-PCR en temps réel en une étape (utilisés lors de l'élaboration du présent document).

5.2.19 Amorces et sondes d'hydrolyse pour la détection du VHA et des norovirus GI et GII. Les séquences d'amorces et de sondes d'hydrolyse doivent être publiées dans une revue révisée par des pairs et doivent être vérifiées par utilisation sur un large éventail de souches du virus cible. Les amorces de détection du VHA doivent cibler la région 5' non codante du génome. Les amorces de détection du norovirus GI et GII doivent cibler la jonction ORF1/ORF2 du génome. Voir l'[Annexe D](#) pour les détails d'un exemple d'amorces et de sondes d'hydrolyse utilisées pour la détection du VHA et des norovirus GI et GII (utilisés lors de l'élaboration du présent document).

5.2.20 Amorces et sondes d'hydrolyse pour la détection de virus témoin de processus. Les séquences d'amorce et de sonde d'hydrolyse doivent être publiées dans une revue révisée par des pairs et doivent être comparées aux séquences de la souche de virus témoin de processus. Elles ne doivent démontrer aucune réactivité croisée avec les virus cibles. Voir l'[Annexe D](#) pour les détails d'un exemple d'amorces et de sondes d'hydrolyse utilisées pour la détection du virus témoin de processus (utilisés lors de l'élaboration du présent document).

5.3 Réactifs nécessitant une préparation

En raison du nombre élevé de réactifs requérant une préparation individuelle, les détails de composition et de préparation sont donnés dans l'[Annexe B](#). Les instructions données dans l'[Annexe B](#) doivent être suivies lors de la préparation des réactifs indiqués en [5.3.1](#) à [5.3.8](#).

5.3.1 Solution de 5 × PEG/NaCl (PEG 8 000 500 g/l, NaCl 1,5 mol/l). Voir [B.1](#).

5.3.2 Mélange chloroforme/butanol (1:1 v/v). Voir [B.2](#).

5.3.3 Solution de protéinase K (3 000 U/l). Voir [B.3](#).

5.3.4 Tampon phosphate salin (PBS). Voir [B.4](#).

5.3.5 Tampon Tris/glycine/extrait de bœuf (TGBE). Voir [B.5](#).

5.3.6 Solution Tris (1 mol/l). Voir [B.6](#).

5.3.7 Solution d'EDTA (0,5 mol/l). Voir [B.7](#).

5.3.8 Tampon Tris EDTA (TE) (Tris 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l). Voir [B.8](#).

5.3.9 Virus témoin de processus. La solution mère de virus témoin de processus doit être diluée par un facteur de 10 au minimum dans un tampon approprié, par exemple le PBS ([5.3.4](#)). Cette dilution doit permettre une détection sans inhibition du génome du virus témoin de processus lors d'une RT-PCR en temps réel, mais doit être suffisamment concentrée pour déterminer, de façon reproductible, la plus faible dilution utilisée pour la courbe étalon de l'ARN du virus témoin de processus (voir [8.4.2.2](#)). Diviser la solution de virus témoin de processus en aliquots à usage unique et les conserver à une température inférieure ou égale à -15 °C. Voir l'[Annexe E](#) pour les détails d'un exemple de préparation de virus témoin de processus (utilisé lors de l'élaboration de la méthode décrite dans le présent document).

5.3.10 Mélanges réactionnels pour la RT-PCR en temps réel pour les virus cibles et témoin de processus. Les réactifs doivent être ajoutés dans des quantités telles que spécifiées par les fabricants (5.2.18) afin d'obtenir un mélange réactionnel de 20 µl par réaction dans un volume total de 25 µl. Des concentrations optimales d'amorces et de sondes doivent être utilisées, après leur détermination, en suivant les recommandations des fabricants de réactif. Voir l'Annexe C pour les détails d'un exemple de mélanges réactionnels pour la RT-PCR en temps réel (utilisés lors de l'élaboration du présent document).

5.3.11 ARN contrôle externe (CE). Des ARNs purifiés portant chacun la séquence cible de chaque virus cible doivent être utilisés. Ils doivent contenir des concentrations d'ADN cible contaminant inférieures à 0,1 % et ne doivent pas induire d'inhibition de la RT-PCR. Les concentrations de chaque solution mère d'ARN CE en nombre de copies par microlitre doivent être déterminées puis la solution mère doit être diluée dans un tampon approprié, par exemple le tampon TE (5.3.8), jusqu'à une concentration de 1×10^2 à 1×10^5 copies d'ADN par microlitre. La concentration utilisée doit être adaptée aux types d'échantillons soumis à essai et doit garantir que les calculs d'inhibition de la RT-PCR ne sont pas affectés par la présence d'ARN cible endogène dans les échantillons. L'EDTA pouvant jouer un rôle d'inhibiteur de la RT-PCR, les tampons utilisés pour diluer l'ARN CE ne doivent pas contenir d'EDTA à des concentrations supérieures à 1 mmol/l. Diviser la préparation d'ARN CE diluée (témoin ARN CE) en aliquots à usage unique et les conserver à 5 °C (6.4) jusqu'à 24 h, à une température inférieure ou égale à -15 °C jusqu'à 6 mois, ou à une température inférieure ou égale à -70 °C pour une conservation plus longue. Voir l'Annexe G pour les détails d'un exemple de préparation d'ARN CE (utilisée lors de l'élaboration du présent document).

Il est permis d'appliquer des approches différentes pour l'évaluation de l'inhibition de la RT-PCR à condition qu'il soit possible de démontrer que les performances sont équivalentes à celles de la méthode utilisant l'ARN CE.

6 Équipement et consommables

Un équipement courant de laboratoire de microbiologie (voir ISO 7218) doit être utilisé, notamment ce qui suit.

6.1 Micropipettes et pointes de différentes capacités, par exemple 1 000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl. Des pointes résistant aux aérosols doivent être utilisées, sauf si des pointes sans filtre sont exigées, par exemple pour l'aspiration (comme en 6.8 et E.3).

6.2 Poire à pipeter et pipettes de différentes capacités, par exemple 25 ml, 10 ml, 5 ml.

6.3 Agitateur vortex.

6.4 Réfrigérateur, capable de fonctionner à (5 ± 3) °C.

6.5 Agitateur, capable de fonctionner à une vitesse d'environ 50 oscillations min⁻¹.

6.6 Incubateur agitateur, fonctionnant à (37 ± 2) °C à une vitesse d'environ 320 oscillations min⁻¹ ou équivalent.

6.7 Plateforme(s) rotative(s) ou équivalent pour une utilisation à température ambiante et à (5 ± 3) °C à une vitesse d'environ 60 oscillations min⁻¹.

6.8 Système d'aspiration ou appareillage équivalent pour l'élimination du surnageant.

6.9 Bain-marie, capable de fonctionner à (60 ± 2) °C ou l'équivalent.

6.10 Centrifugeuse(s) et rotor(s) ayant les fonctionnalités suivantes en termes de capacités du rotor, de vitesses et de températures:

- a) 10 000 $\times g$ à (5 ± 3) °C et acceptant des tubes d'un volume d'au moins 35 ml;
- b) 10 000 $\times g$ à (5 ± 3) °C et acceptant des tubes résistants au chloroforme d'un volume de 2 ml;
- c) 4 000 $\times g$ à température ambiante, fonctionnant avec des filtres centrifuges concentrateurs (6.16).

6.11 Tubes et flacons pour centrifugeuses de différentes capacités, 1,5 ml, 5 ml, 15 ml, 50 ml, etc. Des tubes résistants au chloroforme ayant une capacité de 2 ml sont nécessaires.

6.12 pH-mètre (ou bandelettes indicatrices de pH avec des graduations de 0,5 unité de pH ou moins).

6.13 Écouvillons stériles en coton.

6.14 Sacs avec filtres (400 ml).

6.15 Membranes filtrantes chargées positivement, avec une taille de pores de 0,45 μm (47 mm de diamètre).

6.16 Filtres centrifuges concentrateurs, d'une capacité de 15 ml et avec un seuil de coupure de masse moléculaire relative de 100 kDa.

6.17 Source de vide ou appareil à pression positive équivalent pour la filtration et tour de filtration ayant une ouverture pour une membrane de 47 mm de diamètre.

6.18 Couteau à huître stérile ou outils équivalents pour l'ouverture des mollusques bivalves.

6.19 Bloc de caoutchouc ou appareil équivalent pour le maintien des mollusques bivalves pendant l'ouverture.

6.20 Ciseaux et pinces ou outils équivalents pour la dissection des mollusques bivalves.

6.21 Boîtes de Petri stériles.

6.22 Lames de rasoir ou outils équivalents pour hacher les tissus digestifs des mollusques bivalves.

6.23 Gants de sécurité résistants.

6.24 Appareil d'extraction de l'ARN, approprié pour les méthodes utilisant la silice et les réactifs associés (5.2.17). Voir l'Annexe F pour les détails d'un exemple d'appareil d'extraction de l'ARN (utilisés lors de l'élaboration du présent document).

6.25 Machine(s) PCR en temps réel, c'est-à-dire thermocycleur(s) équipé(s) d'une source appropriée pour l'excitation des molécules fluorescentes et d'un système de détection optique pour la détection en temps réel des signaux de fluorescence générés pendant la RT-PCR en temps réel avec la chimie des sondes d'hydrolyse.

6.26 Consommables associés à la technique RT-PCR en temps réel, par exemple des plaques optiques et des bouchons, appropriés à l'utilisation avec la machine de RT-PCR en temps réel sélectionnée.