
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Réaction de
polymérisation en chaîne (PCR) pour
la recherche de micro-organismes —
Essais de performance thermique des
thermocycleurs**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR)
for the detection of microorganisms — Thermal performance testing
of thermal cyclers*

ISO 20836:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/101f1076-3964-4bcb-aaa7-6cfl4da1419b/iso-20836-2021>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 20836:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/101f1076-3964-4bcb-aaa7-6cfl4da1419b/iso-20836-2021>



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	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
3.1 Réaction de polymérisation en chaîne	1
3.2 Thermocycleur	2
3.3 Caractéristiques thermiques	2
3.4 Mesurage de la température	5
4 Installation des thermocycleurs	6
5 Maintenance des thermocycleurs	6
6 Essai de performance des thermocycleurs	6
6.1 Généralités	6
6.2 Programme d'essais de performance	7
6.3 Traçabilité métrologique	7
6.4 Méthode d'essai de performance thermique	8
6.4.1 Généralités	8
6.4.2 Principe	8
6.4.3 Matériel	8
6.4.4 Conditions environnementales	9
6.4.5 Mode opératoire	9
6.4.6 Résultats de l'essai de performance	11
6.4.7 Rapport d'essai de performance	11
6.4.8 Essai de conformité	12
6.5 Méthode d'essai de performance optique	12
Annexe A (informative) Emplacement des sondes	13
Annexe B (informative) Protocole de température universel	18
Annexe C (informative) Essai de conformité	19
Annexe D (informative) Exemple de profil thermique d'un thermocycleur	23
Annexe E (informative) Exemple d'essai de performance et d'essai de conformité	24
Bibliographie	28

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

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

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

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

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

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 463, *Microbiologie de la chaîne alimentaire*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette première édition de Norme internationale annule et remplace la première édition de la Spécification technique (ISO/TS 20836:2005), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications apportées par rapport à la précédente édition sont les suivantes:

- extension du Domaine d'application pour inclure les thermocycleurs classiques, ainsi que les thermocycleurs en temps réel;
- ajout de précisions concernant la méthode d'essai physique de performance et suppression de la méthode d'essai biochimique de performance;
- ajout d'informations destinées aux laboratoires concernant l'ISO/IEC 17025;
- alignement de la méthode d'essai de performance sur l'ISO/IEC 17025;
- ajout d'un essai de conformité;
- ajout de deux modes opératoires visant à définir des spécifications à partir de la méthode par PCR, donnés à l'[Annexe C](#).

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 fait partie d'une famille de Normes internationales regroupées sous le titre *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments*:

- ISO 22174, *Exigences générales et définitions*;
- ISO 20837, *Exigences relatives à la préparation des échantillons pour la détection qualitative*;
- ISO 20836, *Essais de performance thermique des thermocycleurs*;
- ISO 20838, *Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour les méthodes qualitatives*.

Le présent document décrit une méthode d'essai de performance pour les thermocycleurs classiques, ainsi que les thermocycleurs en temps réel permettant aux laboratoires de déterminer si le thermocycleur utilisé est adapté à l'usage prévu et satisfait aux spécifications définies par le laboratoire.

La méthode décrite s'appuie sur une méthode physique visant à réaliser des mesurages directement dans le bloc des thermocycleurs à bloc et dans les tubes des thermocycleurs à chambre de réaction. La méthode décrite offre une incertitude de mesure suffisamment faible pour effectuer des comparaisons pertinentes avec les spécifications.

De plus, il est à noter pour les laboratoires soumis à la norme ISO/IEC 17025 que la méthode satisfait aux critères d'une méthode d'étalonnage métrologiquement traçable.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20836:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/101f1076-3964-4bcb-aaa7-6cfl4da1419b/iso-20836-2021>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20836:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/101f1076-3964-4bcb-aaa7-6cf14da1419b/iso-20836-2021>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes — Essais de performance thermique des thermocycleurs

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie les exigences relatives à l'installation, à la maintenance, à l'étalonnage de la température et aux essais de performance thermique des thermocycleurs classiques et des thermocycleurs en temps réel. Il s'applique à la recherche de micro-organismes, ainsi qu'à toute autre application de la chaîne alimentaire utilisant des méthodes fondées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Le présent document a pour vocation de s'appliquer aux essais sur les aliments, mais est aussi applicable à d'autres domaines utilisant des thermocycleurs (par exemple, des essais relatifs à l'environnement, à la santé humaine, à la santé animale, à la médecine légale).

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 20836:2021

Guide ISO/IEC 98-3:2008, *Incertitude de mesure — Partie 3: Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM:1995)*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions 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 Réaction de polymérisation en chaîne

3.1.1

réaction de polymérisation en chaîne

PCR

méthode enzymatique permettant l'amplification in vitro de l'ADN

[SOURCE: ISO 22174:2005, 3.4.1]

3.1.2

méthode par PCR

méthode d'essai fondée sur la technique PCR (3.1.1)

Note 1 à l'article: Des exemples incluent, sans s'y limiter, la PCR, la PCR quantitative en temps réel (qPCR), la PCR à transcription inverse (RT PCR) et la PCR quantitative en temps réel à transcription inverse (RT qPCR).

3.2 Thermocycleur

3.2.1

thermocycleur

appareil automatique qui réalise les cycles de chauffage et de refroidissement nécessaires à la PCR (3.1.1) ou à la PCR en temps réel

Note 1 à l'article: Le thermocycleur peut être un thermocycleur à bloc ou à chambre de réaction (individuelle).

[SOURCE: ISO 22174:2005, 3.4.20, modifié — L'expression «ou à la PCR en temps réel» et la Note 1 à l'article ont été ajoutées.]

3.2.2

bloc de réaction

bloc en métal chauffé et refroidi dans lequel les tubes à réaction PCR, contenant le mélange réactionnel PCR, peuvent être insérés

Note 1 à l'article: Le bloc peut être chauffé et refroidi à l'aide de différentes techniques, parmi lesquelles le chauffage et refroidissement à effet Peltier est la plus couramment utilisée.

3.2.3

chambre de réaction

chambre en métal chauffée et refroidie dans laquelle les tubes à réaction PCR, contenant le mélange réactionnel PCR, peuvent être insérés directement ou dans un carrousel

Note 1 à l'article: La chambre peut être chauffée et refroidie à l'aide de différentes techniques, parmi lesquelles le chauffage et refroidissement à air est la plus couramment utilisée.

3.2.4

couvercle chauffant

couvercle chauffé d'un *thermocycleur* (3.2.1), qui est installé sur les tubes de réaction dans les thermocycleurs à bloc afin d'empêcher un dépôt par condensation du mélange réactionnel dans le bouchon du tube de réaction ou sur le joint, ainsi que l'évaporation à partir du tube de réaction, et qui applique une pression sur les tubes afin de garantir un bon contact thermique

3.2.5

protocole de température PCR

cycles de chauffage et de refroidissement requis pour la PCR (3.1.1), composés en général d'étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation qui sont, le plus souvent, répétées 30 à 45 fois

Note 1 à l'article: Certaines *méthodes par PCR* (3.1.2) utilisent un protocole de température en deux étapes dans lequel les phases d'hybridation et d'élongation sont combinées en une seule étape.

3.3 Caractéristiques thermiques

3.3.1

profil thermique du thermocycleur

graphique de l'évolution de la température à partir de mesurages effectués à des intervalles définis

Note 1 à l'article: Voir l'[Annexe D](#) pour obtenir un exemple de graphique de profil thermique de thermocycleur.

3.3.2

$T_{(i)t}$

température en °C de la sonde i au temps t en s

3.3.3

température de consigne

T_{cons}

température cible programmée en °C à atteindre

3.3.4 température moyenne

$$T_{\text{moy}}(t) = \sum_{i=1}^N \frac{T_i(t)}{N}$$

où

$T_{\text{moy}}(t)$ est la température moyenne en °C au temps t ;

i est la sonde i sur N ;

N est le nombre total de sondes;

moyenne des valeurs mesurées par toutes les sondes de température actives en °C à un temps donné en s

3.3.5 écart de température

$$T_{\text{écart}}(t) = T_{\text{moy}}(t) - T_{\text{cons}}$$

température moyenne (3.3.4) moins la température de consigne (3.3.3) en °C à un temps donné en s

3.3.6 température minimale

$$T_{\text{min}}(t) = \min(T_1(t) \dots T_N(t))$$

valeur minimale de toutes les sondes de température actives en °C à un temps donné en s

3.3.7 température maximale

$$T_{\text{max}}(t) = \max(T_1(t) \dots T_N(t))$$

valeur maximale de toutes les sondes de température actives en °C à un temps donné en s

3.3.8 uniformité de la température

$$T_{\text{uniformité}}(t) = T_{\text{max}}(t) - T_{\text{min}}(t)$$

homogénéité de la répartition de la température au sein du *bloc de réaction* (3.2.2) ou de la chambre de réaction, définie comme la température maximale (3.3.7) moins la température minimale (3.3.6) en °C à un temps donné en s

3.3.9 transition de température

$T_{\text{transition}}$
phase de passage rapide d'une température de consigne à une autre température de consigne

3.3.10 vitesse de montée/descente

vitesse de chauffe ou de refroidissement du *thermocycleur* (3.2.1) en °C/s

3.3.11 vitesse de montée moyenne

$$V_t = \sum_{i=1}^N \left(\frac{T_{i,90\%} - T_{i,10\%}}{t_{i,90\%} - t_{i,10\%}} \right)$$

où

- V_t est la vitesse de montée en °C/s;
- i est la sonde i sur N ;
- N est le nombre total de sondes;
- $T_{i,10\%}$ est T_i à 10 % de la température de la pente de la montée en °C;
- $T_{i,90\%}$ est T_i à 90 % de la température de la pente de la montée en °C;
- t est le temps en s;

vitesse de chauffe ou de refroidissement du *thermocycleur* (3.2.1) calculée entre 10 % et 90 % du temps de la pente de chauffage ou de refroidissement

Note 1 à l'article: La vitesse de chauffe correspond à une *vitesse de montée* (3.3.10) positive. La vitesse de refroidissement correspond à une vitesse de montée négative.

3.3.12 vitesse de montée maximale

$V_{t \max}$
vitesse de chauffe ou de refroidissement maximale sur la pente de chauffage ou de refroidissement en °C/s

3.3.13 pic maximal de température « overshoot »

$T_{i,ovs,max}$
 $T_{i,ovs,max} = T_{i,max}(t) \Big|_{\substack{t_{maintien=15s} \\ t_{maintien=0s}} - T_i(t_{maintien=30s})$

valeur de *température maximale* (3.3.7) en °C de toutes les sondes de température actives au cours du pic de température « overshoot » au-dessus de la *température moyenne* (3.3.4) du *bloc de réaction* (3.2.2) ou de la température de la *chambre maintenue au cours du chauffage*

Note 1 à l'article: Le pic maximal de température « overshoot » est calculé entre le début et la fin du pic et est exprimé par rapport à un *temps de maintien* (3.3.18) de la température de 30 s.

Note 2 à l'article: Le pic de température « overshoot » survient, en général, entre 0 s et 15 s du temps de maintien. Voir l'[Annexe D](#) pour obtenir un exemple de *profil thermique de thermocycleur* (3.3.1).

3.3.14 pic minimal de température « undershoot »

$T_{i,uns,min}$
 $T_{i,uns,min} = T_{i,min}(t) \Big|_{\substack{t_{maintien=15s} \\ t_{maintien=0s}} - T_i(t_{maintien=30s})$

valeur de *température minimale* (3.3.6) en °C de toutes les sondes de température actives au cours du pic de température « undershoot » en dessous de la *température moyenne* (3.3.4) du *bloc de réaction* (3.2.2) ou de la température de la chambre maintenue au cours du refroidissement

Note 1 à l'article: Le pic maximal de température « undershoot » est calculé entre le début et la fin du pic et est exprimé par rapport à un *temps de maintien* (3.3.18) de la température de 30 s. Un pic de température « undershoot » est un pic de température négatif.

Note 2 à l'article: Le pic de température « undershoot » survient, en général, entre 0 s et 15 s du temps de maintien. Voir l'[Annexe D](#) pour obtenir un exemple de *profil thermique de thermocycleur* (3.3.1).

3.3.15**pic moyen de température « overshoot »**

$$T_{\text{ovs,moy}} = \sum_{i=1}^N \left(\frac{T_{i,\text{ovs,max}}}{N} \right)$$

valeur moyenne des *pics maximaux de température « overshoot »* (3.3.13) de toutes les sondes de température actives du bloc en °C

3.3.16**pic moyen de température « undershoot »**

$$T_{\text{uns,moy}} = \sum_{i=1}^N \left(\frac{T_{i,\text{uns,min}}}{N} \right)$$

valeur moyenne des *pics minimaux de température « undershoot »* (3.3.14) de toutes les sondes de température actives du bloc en °C

3.3.17**durée du pic de température « overshoot »**

temps écoulé entre le début et la fin du pic de température « overshoot » en s

Note 1 à l'article: Le début du pic de température « overshoot » est défini comme le moment où la *température moyenne* (3.3.4) dépasse la température de maintien moyenne, calculée à 30 s de maintien, au début du pic. La fin du pic de température « overshoot » est définie comme le moment où la température moyenne atteint la température de maintien moyenne à la fin du pic.

3.3.18**temps de maintien**

temps écoulé entre le début et la fin du maintien d'une température en s

Note 1 à l'article: Voir l'Annexe D pour obtenir un exemple de détermination du début et de la fin du maintien d'une température.

3.4 Mesurage de la température**3.4.1****système de mesure de la température**

instrument de mesure de la température et d'enregistrement des données

3.4.2**fréquence d'échantillonnage**

nombre d'échantillons pris par seconde à partir d'un signal continu pour obtenir un signal discret

3.4.3**temps de réponse**

temps nécessaire au *système de mesure de la température* (3.4.1), lorsqu'il est soumis à un changement de température, pour réagir à ce changement

3.4.4**incertitude de mesure**

paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées à la grandeur destinée à être mesurée

[SOURCE: ISO/IEC Guide 98-3:2008, B.2.18, modifié — Le terme «mesurande» a été remplacé par «grandeur destinée à être mesurée» et les notes à l'article ont été supprimées.]

3.4.5**essai de performance**

mode opératoire d'essai qui détermine la performance d'un *thermocycleur* (3.2.1)

3.4.6

étalonnage

opération qui, dans des conditions spécifiées, établit en une première étape une relation entre les valeurs et les *incertitudes de mesure* (3.4.4) associées qui sont fournies par des étalons et les indications correspondantes avec les incertitudes associées, puis utilise en une seconde étape cette information pour établir une relation permettant d'obtenir un résultat de mesure à partir d'une indication

Note 1 à l'article: Il convient de ne pas confondre l'étalonnage avec l'ajustage d'un système de mesure ni avec l'autocontrôle, l'essai d'autovérification, la vérification, la normalisation, la qualification d'installation (QI), la qualification opérationnelle (QO) ou la qualification de performance (QP).

[SOURCE: ISO/IEC Guide 99:2007, 2.39, modifié — Les Notes 1, 2 et 3 à l'article d'origine ont été remplacées par la Note 1 à l'article.]

4 Installation des thermocycleurs

Les instructions du fabricant doivent être respectées.

Il convient que les points suivants soient pris en compte:

- a) il convient d'installer et d'utiliser les thermocycleurs dans des conditions environnementales adaptées qui n'invalident pas les résultats et ne nuisent pas à la qualité requise de tout essai;
- b) la température ambiante et l'humidité relative constituent les conditions environnementales qu'il convient au minimum de prendre en compte.

Se reporter au manuel du thermocycleur pour connaître les conditions ambiantes recommandées.

Les thermocycleurs doivent être installés de sorte à ne pas entraver la libre circulation de l'air à tout moment.

ISO 20836:2021

Se reporter à l'ISO 22174 pour les lignes directrices en matière de prévention de la contamination et de séparation des activités de laboratoire incompatibles.

5 Maintenance des thermocycleurs

Le laboratoire doit établir un programme de maintenance, le cas échéant, et conserver des enregistrements afin de garantir le bon fonctionnement et d'empêcher la détérioration des thermocycleurs.

6 Essai de performance des thermocycleurs

6.1 Généralités

Si la méthode d'essai de performance du présent document est utilisée comme méthode d'étalonnage de la température métrologiquement traçable, méthode d'essai de conformité ou méthode de référence, l'essai de performance doit être réalisé en utilisant un nombre minimal de sondes correspondant à au moins 12,5 % du nombre de puits pour les blocs ou chambres de réaction de moins de 96 puits ou à 12 puits pour les blocs ou chambres de réaction de plus de 96 puits (voir 6.4.5.1) et la traçabilité métrologique (voir 6.3) doit être assurée jusqu'au niveau du thermocycleur. Si la méthode d'essai de performance est utilisée à d'autres fins, en guise de contrôle qualité du fournisseur ou au titre du service après-vente du fournisseur par exemple, le nombre de sondes peut être réduit à un minimum de sondes correspondant à au moins 8 % du nombre de puits pour les blocs ou chambres de réaction de moins de 96 puits ou à 8 puits pour les blocs ou chambres de réaction de plus de 96 puits et la traçabilité métrologique doit être assurée jusqu'au niveau du système de mesure de la température.

En cas de chambres de réaction individuelles, chacune d'elles doit être soumise à essai.