



**Norme
internationale**

ISO 11781

**Analyse de biomarqueurs
moléculaires — Exigences
et recommandations pour la
validation intralaboratoire des
méthodes de PCR qualitative en
temps réel**

*Molecular biomarker analysis — Requirements and guidance for
single-laboratory validation of qualitative real-time polymerase
chain reaction (PCR) methods*

[ISO 11781:2025](https://standards.iteh.ai/standards/iso-11781-2025)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/f97b70d4-89b1-48d2-8186-6541f56f38f0/iso-11781-2025>

**Première édition
2025-04**

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

[ISO 11781:2025](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/f97b70d4-89b1-48d2-8186-6541f56f38f0/iso-11781-2025)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/f97b70d4-89b1-48d2-8186-6541f56f38f0/iso-11781-2025>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2025

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
4 Principe	2
5 Validation intralaboratoire des caractéristiques de performance	3
5.1 Généralités	3
5.2 Limite de détection	3
5.3 Détermination du nombre de copies de séquences cibles d'ADN dans les matériaux d'essai d'ADN	3
5.4 Évaluation des données relatives à la limite de détection	3
5.5 Efficacité de la PCR et variabilité du nombre mesuré de copies autour de la limite de détection	4
5.6 Spécificité	4
5.6.1 Généralités	4
5.6.2 Essai bioinformatique (in silico) de spécificité	4
5.6.3 Essai pratique de spécificité	5
5.6.4 Robustesse	5
6 Rapport de validation	6
Annexe A (informative) Estimation du nombre de copies de la séquence cible d'ADN	8
Annexe B (informative) Détermination de la limite de détection, de la fidélité et de l'efficacité de la PCR	10
Annexe C (informative) Modèle mixte linéaire généralisé avec lien log-log	14
Annexe D (informative) Essai de robustesse	20
Bibliographie	22

ISO 11781:2025

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/197b70d4-89b1-48d2-8186-6541f56f3810/iso-11781-2025>

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'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de brevet revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de propriété.

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 de biomarqueurs moléculaires*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires - Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

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

Les méthodes de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qualitative en temps réel sont aujourd'hui largement utilisées pour la détection de séquences d'ADN spécifiques dans les aliments (par exemple pour la détection et l'identification d'organismes génétiquement modifiés et de leurs produits dérivés, pour l'authentification et la spéciation des aliments et pour d'autres fins). Il est important qu'une méthode d'analyse des aliments récemment mise au point soit adaptée à l'usage prévu et réponde à certaines caractéristiques de performance et certains critères de qualité définis par un ensemble particulier d'expériences de validation.

Les données déterminées par la validation intralaboratoire servent à décider de l'application d'une méthode en interne. De plus, elles permettent de déterminer s'il convient que la méthode en question soit intégralement validée dans le cadre d'une étude interlaboratoires. Le modèle statistique décrit a été appliqué dans la pratique, par exemple dans certaines parties de la série ISO/TS 21569^[1]^[2] et de la série ISO/TS 20224^[3]. D'autres modèles sont applicables, voir l'ISO/TS 16393^[4].

Le présent document vise à fournir un protocole de validation intralaboratoire des méthodes de PCR qualitative en temps réel qui sont appliquées dans le domaine de l'analyse des aliments. Les procédures d'extraction d'ADN de la matrice alimentaire ne figurent pas dans le présent document. Le mode opératoire décrit est une recommandation étayée par l'expérience pratique dans plusieurs laboratoires. D'autres approches peuvent être appliquées s'il peut être démontré qu'elles satisfont aux critères de performance définis dans le présent document.

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

[ISO 11781:2025](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/f97b70d4-89b1-48d2-8186-6541f56f38f0/iso-11781-2025>

Analyse de biomarqueurs moléculaires — Exigences et recommandations pour la validation intralaboratoire des méthodes de PCR qualitative en temps réel

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie les exigences minimales et les critères de performance minimaux pour la réalisation d'une étude de validation intralaboratoire relative aux méthodes de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qualitative (binaire) en temps réel appliquées à la détection de séquences d'ADN spécifiques présentes dans les aliments.

Le document est applicable à toute validation intralaboratoire de méthode de PCR qualitative en temps réel utilisée pour la détection de séquences d'ADN spécifiques dans les aliments et les produits alimentaires (par exemple pour la détection de produits alimentaires génétiquement modifiés et la détermination d'espèces, y compris les espèces connues pour produire des protéines allergènes).

Le document ne s'applique pas à la validation intralaboratoire de méthodes de PCR qualitative en temps réel utilisées en microbiologie.

Le document ne s'applique pas à l'évaluation de l'applicabilité et de la faisabilité en ce qui concerne le domaine d'application spécifique de la méthode de PCR.

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

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 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 probabilité de détection POD

probabilité d'obtenir un résultat d'analyse positif à partir d'une méthode qualitative pour une matrice donnée à une concentration donnée dans un seul laboratoire

Note 1 à l'article: Pour une méthode de PCR qualitative en temps réel, elle décrit la probabilité que pour un nombre donné de copies d'ADN de la séquence cible, l'amplification par PCR ait lieu.

[SOURCE: ISO 16577:2022, 3.9.12, modifié — La Note 1 à l'article remplace les Notes 1 et 2 à l'article.]

3.2 efficacité de la réaction de polymérisation en chaîne efficacité de la PCR

taux d'amplification mesuré pour une copie d'ADN de la séquence cible par cycle PCR par rapport à la valeur théorique de 1

Note 1 à l'article: L'efficacité de la PCR est calculée d'après la pente d'une courbe d'étalonnage résultant du graphique semi-logarithmique décimal des valeurs du cycle de quantification (Cq) au-dessus de la concentration d'ADN. La pente de la droite de régression calculée peut être utilisée. L'efficacité de la PCR peut être exprimée en valeur absolue ou en pourcentage.

3.3 limite de détection

LOD_{95 %}

nombre moyen de copies d'ADN de la séquence cible produisant une *probabilité de détection* (3.1) de 0,95

3.4 spécificité

propriété d'une méthode à répondre exclusivement à la caractéristique ou à l'analyte soumis à essai

[SOURCE: ISO 24276:2006, 3.1.4]

4 Principe

Les amorces spécifiques et les sondes, selon le système de détection appliqué, sont conçues pour l'amplification et la détection spécifiques d'une séquence cible d'ADN par une méthode de PCR qualitative en temps réel. À l'étape suivante de la validation intralaboratoire, les caractéristiques de performance de la méthode doivent être évaluées pour montrer que la méthode est conforme aux critères de qualité stipulés dans les documents pertinents^{[5][6]}.

Pour une méthode de PCR qualitative en temps réel, la validation doit porter essentiellement sur la limite de détection (LOD_{95 %}) (à laquelle la probabilité de détection (POD) est $\geq 95 \%$), la spécificité pour la séquence d'ADN cible et la robustesse par rapport à des variations faibles mais délibérées appliquées aux paramètres de la méthode.

Les données de validation intralaboratoire permettent de vérifier si les critères de performance minimaux requis d'une méthode de PCR qualitative en temps réel sont remplis; il convient que l'applicabilité de la méthode par un laboratoire individuel soit fondée sur le résultat de cette vérification. Il est possible de décider ultérieurement d'effectuer une validation de la méthode dans le cadre d'une étude interlaboratoires.

La reproductibilité (transférabilité interlaboratoires) et la performance de méthode dans différents laboratoires, en particulier le taux de faux positifs/faux négatifs obtenus avec des échantillons pour essai négatifs/positifs et la POD au sein des laboratoires, peuvent être évaluées par une étude interlaboratoires, si la conception est appropriée^[6].

5 Validation intralaboratoire des caractéristiques de performance

5.1 Généralités

Les recommandations pour la compilation des informations requises pour la description complète et détaillée de tous les éléments qu'il convient de fournir avec le protocole des méthodes de PCR qualitative (comme les séquences oligonucléotidiques, la longueur de l'amplicon, les spécifications instrumentales ou chimiques, les conditions de PCR, les contrôles analytiques) sont données dans d'autres documents pertinents, voir les Références [5] et [6] et l'ISO 21569[8].

L'extraction de l'ADN doit être effectuée conformément aux exigences spécifiées dans l'ISO 21571.

5.2 Limite de détection

La $LOD_{95\%}$ est exprimée comme le nombre de copies de la séquence cible et doit être déterminée par une série de dilution de l'ADN cible: outre l'ADN cible, chaque dilution contient une concentration uniforme d'ADN non cible (ADN d'arrière-plan).

Six niveaux de concentration d'ADN cible au minimum sont requis, avec 12 réplicats par niveau.

Le plus petit niveau de dilution (c'est-à-dire le plus petit nombre de copies) pour lequel la totalité des 12 réplicats sont positifs est considéré comme étant une valeur approximative de la $LOD_{95\%}$ (voir l'Article B.2).

Il convient que la $LOD_{95\%}$ des méthodes de PCR qualitative en temps réel ne dépasse pas 20 copies de la séquence cible.

NOTE 1 Le présent document est applicable à la validation de nouvelles méthodes. Cependant, pour la vérification des méthodes, 10 réplicats peuvent suffire.

NOTE 2 Si la $LOD_{95\%}$ est égale à 20 copies de la séquence cible, la probabilité d'amplification (λ) de toute la PCR est environ de 15 % d'après le paramètre de la distribution de Poisson ($\lambda \cdot LOD_{95\%} = 2,996$)^[7].

L'Annexe A fournit des informations détaillées supplémentaires concernant l'estimation du nombre de copies d'ADN cible.

Des recommandations d'ordre pratique pour la détermination de la $LOD_{95\%}$, expérimentale, figurent à l'Annexe B.

L'Annexe C donne les principes fondamentaux du modèle statistique spécifique adapté aux méthodes de PCR.

5.3 Détermination du nombre de copies de séquences cibles d'ADN dans les matériaux d'essai d'ADN

La validation nécessite la détermination du nombre de copies de séquences cibles d'ADN.

Le nombre de copies de la séquence cible pour une masse spécifiée d'acide nucléique (ADN) peut être calculé à partir des équivalents génome haploïde utilisant la concentration d'ADN mesurée (voir l'ISO 21571:2005, Annexe B) et la masse du génome^{[9][10][11]}. L'utilisation d'un équipement de PCR digitale (comme la PCR digitale en gouttelettes) est une autre approche qui permet de déterminer avec précision le nombre de copies d'une séquence cible d'ADN ou la concentration d'une solution d'ADN^[12].

La qualité et la concentration (très élevées ou très faibles) de l'ADN d'arrière-plan utilisé pour la dilution peuvent influencer l'expérience de validation. Il est donc vivement recommandé d'utiliser de l'ADN permettant d'évaluer l'absence d'inhibiteurs de PCR (par exemple des préparations d'ADN de qualité biologie moléculaire du commerce) et une concentration adaptée à l'ADN extrait des échantillons^[13].

5.4 Évaluation des données relatives à la limite de détection

Il convient de déterminer la $LOD_{95\%}$, la courbe de POD moyenne et l'intervalle de confiance à 95 % à l'aide d'un modèle statistique.

Le travail expérimental qui comprend également une composante de Poisson est fondé sur le modèle mixte linéaire généralisé (MMLG) avec fonction de lien log-log complémentaire. Ce modèle s'est révélé être le plus efficace lorsque le nombre de copies d'ADN est faible et suit une distribution de Poisson.

L'[Annexe C](#) donne des informations sur le MMLG avec fonction de lien log-log complémentaire. Pour ce calcul, le nombre de copies nominales ajoutées à la réaction PCR, le nombre de réplicats réalisés et le nombre de résultats positifs obtenus sont requis.

À partir des résultats de la série de dilution, la $LOD_{95\%}$, l'intervalle de confiance à 95 % et la courbe de POD moyenne avec l'intervalle de confiance à 95 % correspondant peuvent être calculés à l'aide d'un service web^[14] ou du package R POD (voir [l'Article C.5](#)^[15]).

Vérifier que la $LOD_{95\%}$ est plausible. Une valeur inférieure à 2,996 indique que le nombre de copies de la séquence cible qui ont été réellement ajoutées à la réaction PCR ne correspondait pas au nombre (nominal) estimé de copies pour les solutions d'ADN^[7].

Si plus de deux résultats sont positifs au niveau correspondant à 0,1 copie de la séquence cible par PCR, les dilutions d'ADN ne peuvent pas être considérées comme étant vérifiées et le nombre de copies doit être réexaminé.

NOTE 1 Le calcul de la $LOD_{95\%}$ n'est valide que si les faux positifs sont négligeables, c'est-à-dire si l'essai de spécificité a réussi et si la contamination de PCR précédentes peut être exclue.

NOTE 2 Le niveau qui est le résultat d'une dilution décimale d'une copie nominale est appelé «niveau correspondant à 0,1 copie par PCR» pour faciliter la lecture du présent document.

5.5 Efficacité de la PCR et variabilité du nombre mesuré de copies autour de la limite de détection

Pour la détermination facultative de la variabilité du nombre de copies autour de la $LOD_{95\%}$, assigner le nombre de copies aux valeurs C_q respectives sur la base d'une série d'étalonnage supplémentaire de l'ADN cible (pour la préparation d'une série d'étalonnage, voir [l'Article B.2](#)).

Il convient d'évaluer la variabilité du nombre mesuré de copies autour de la $LOD_{95\%}$ en comparant les écarts-types de répétabilité avec les valeurs théoriques du modèle de Poisson. Un écart-type ajusté supérieur à 30 % indique que la $LOD_{95\%}$ qui peut être obtenue lors d'une analyse de routine peut faire l'objet d'une variabilité élevée (voir [l'Article B.5](#)).

Les données expérimentales recueillies permettent également de déterminer l'efficacité de la PCR (voir [l'Article B.6](#)), la pente de la courbe d'amplification et le coefficient de détermination (R^2). Une PCR exempte d'influences inhibitrices amplifie en doublant de manière exponentielle avec une pente (C_q /nombre de copies initiales) de $-3,3219$. Il convient qu'une efficacité acceptable de la PCR ne s'écarte pas de plus de $\pm 10\%$ de la valeur théorique de 100 % (ce qui correspond à une pente dans l'intervalle de $-3,1$ à $-3,6$). Lorsque l'efficacité de la PCR se révèle être supérieure au maximum théorique, il convient d'envisager la présence d'erreurs dues à la configuration de la réaction et à l'inhibition de la PCR. Il convient que le coefficient de détermination soit au moins de 0,98 (ou 98 %).

5.6 Spécificité

5.6.1 Généralités

Les résultats de l'analyse *in silico* et les résultats expérimentaux des essais réalisés sur la méthode avec les bases de données de séquences génomiques et le matériau contenant la séquence cible doivent être fournis. S'ils sont disponibles, il convient de réaliser des essais d'inclusivité et d'exclusivité en utilisant des données et matériaux pertinents et représentatifs en fonction du domaine d'application de la méthode.

5.6.2 Essai bioinformatique (*in silico*) de spécificité

Des essais bioinformatiques de spécificité doivent être effectués en examinant les séquences d'oligonucléotides et d'amplicons à l'aide d'outils bioinformatiques disponibles (par exemple la formation d'amorces-dimères

avec l'outil Primer 3^[16]. L'homologie à d'autres séquences doit être examinée par des recherches dans des bases de données de séquences d'acides nucléiques (comme BLAST dans GenBank[®]¹⁾^[17]).

Il convient que l'analyse in silico ne révèle aucune similitude entre la séquence cible et les séquences pouvant être présentes dans l'échantillon, ce qui pourrait influencer sur le résultat analytique. Il convient d'adapter la ou les séquences d'oligonucléotides en conséquence, le cas échéant. Des recommandations complémentaires relatives à l'analyse in silico se trouvent dans la Référence [18].

5.6.3 Essai pratique de spécificité

Effectuer des essais de réactions croisées inattendues avec l'ADN non cible. Contrôler la réactivité croisée du système de détection PCR avec l'ADN d'organismes ayant des éléments génétiques, des gènes ou des constructions génétiques similaires (homologues). Contrôler également les espèces qui sont souvent présentes dans les aliments sous forme d'ingrédients (par exemple le maïs, le soja, le colza, le riz, la pomme de terre, le blé, le bœuf, le poulet, le porc, le mouton, la dinde, le cheval).

Si l'ADN non cible est soumis à essai et qu'un résultat négatif est attendu, il convient d'ajouter au moins 2 500 copies à la réaction PCR. Si aucun matériau de référence présentant des concentrations suffisamment élevées d'ADN non cible n'est disponible, des concentrations plus faibles peuvent être utilisées et il convient d'indiquer le nombre de copies ajoutées. Vérifier l'aptitude à l'amplification de l'ADN non cible à l'aide d'un essai indépendant.

Effectuer les essais avec l'ADN cible. Ajouter l'ADN cible pour lequel un résultat positif est attendu en nombre de copies dans la plage de la limite de quantification (LOQ) (de manière empirique, le nombre de copies pour la LOD_{95 %} peut être multiplié par un facteur de 3, c'est-à-dire en général 20 à 60 copies par PCR). Ajouter l'ADN non cible à une concentration de 100 ng/25 µl à 200 ng/25 µl de mélange pour PCR à l'ADN cible, afin de reproduire les conditions qui sont pertinentes dans la pratique et susceptibles d'influer sur le résultat.

Il suffit d'effectuer en double chacun des essais PCR d'inclusivité (en utilisant l'ADN cible) et d'exclusivité (en utilisant l'ADN non cible).

Il convient que les résultats de la PCR pour les analyses in silico et les analyses expérimentales satisfassent aux exigences et critères de la méthode ou les dépassent.

S'il existe une réactivité croisée qui est considérée comme étant acceptable, il faut l'indiquer et en tenir compte dans le domaine d'application de la méthode.

5.6.4 Robustesse

La robustesse d'une méthode de PCR qualitative en temps réel doit être évaluée. L'évaluation de la robustesse doit inclure des variations faibles mais délibérées, appliquées par exemple aux paramètres suivants de la méthode:

- différents types d'équipement de PCR en temps réel, le cas échéant;
- kits de réactifs PCR;
- température d'hybridation appliquée au programme de cycles thermiques;
- volume de mélange maître;
- concentrations d'amorces et de sondes.

Un exemple réalisable de facteurs et de modifications appliqués aux conditions opératoires qui couvre tous les aspects pertinents de la PCR qualitative en temps réel est donné dans le [Tableau 1](#). D'autres facteurs ou modifications peuvent être appliqués si leur ajout permet un gain d'une valeur informative suffisante.

1) BLAST dans GenBank[®] est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné.