
**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 1:
Méthode de quantification**

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

Part 1: Method for quantification



Sample Document

get full document from standards.iteh.ai



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos	v
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	4
4.1 Extraction de virus	4
4.2 Extraction d'ARN	4
4.3 RT-PCR en temps réel	4
4.4 Témoins	4
4.4.1 Virus témoin d'extraction	4
4.4.2 Contrôle ADN double brin (ADNdb)	5
4.4.3 Contrôle ARN CE	5
4.5 Résultats des essais	5
5 Réactifs	5
5.1 Généralités	5
5.2 Réactifs utilisés dans l'état	5
5.3 Réactifs préparés	6
6 Matériel et consommables	8
7 Échantillonnage	9
8 Mode opératoire	9
8.1 Exigences générales de laboratoire	9
8.2 Extraction de virus	9
8.2.1 Virus témoin d'extraction	10
8.2.2 Témoin négatif de processus	10
8.2.3 Surfaces alimentaires	10
8.2.4 Fruits tendres, légumes feuilles, tiges ou bulbes	10
8.2.5 Eau embouteillée	11
8.2.6 Mollusques bivalves	12
8.3 Extraction d'ARN	12
8.4 RT-PCR en temps réel	13
8.4.1 Exigences générales	13
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 étalons	15
9.3 Calcul de l'inhibition de la réaction RT-PCR	16
9.4 Calcul du rendement d'extraction	16
9.5 Quantification d'échantillon	17
10 Expression des résultats	18
11 Fidélité	18
11.1 Études interlaboratoires	18
11.2 Répétabilité	18
11.3 Limite de reproductibilité	19
12 Rapport d'essai	19
Annexe A (normative) Diagramme de mode opératoire	20
Annexe B (normative) Composition et préparation des réactifs et des tampons	21

Annexe C (informative) Mélanges réactionnels (MasterMix) pour la RT-PCR en temps réel et paramètres de cycles	24
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 d'extraction)	25
Annexe E (informative) Multiplication de la souche MC₀ du mengovirus utilisée comme témoin d'extraction	28
Annexe F (informative) Extraction d'ARN avec le système NucliSENS®	29
Annexe G (informative) Préparation des contrôles ADNdb	31
Annexe H (informative) Préparation des ARN CE	34
Annexe I (informative) Disposition de plaque optique type	36
Annexe J (informative) Études de validation des méthodes et caractéristiques de performance	38
Bibliographie	49

Sample Document

get full document from standards.iteh.ai

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

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

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

Le présent document a été élaboré par le comité européen de normalisation (CEN), comité technique CEN/TC 275, en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette première édition annule et remplace l'ISO/TS 15216-1:2013, qui a fait l'objet d'une révision technique avec les modifications suivantes:

- l'utilisation de molécules d'ADNdb linéaire pour la quantification prescrite;
- l'utilisation d'un tampon adéquat pour la dilution des matériaux de contrôle prescrite;
- la modification de la méthode utilisée pour générer l'ARN viral témoin pour la courbe étalon;
- l'addition de points de rupture avec des paramètres définis de température et de temps dans les méthodes d'extraction;
- la modification de la terminologie de rendement d'amplification en inhibition de la RT-PCR;
- l'addition de réactions de RT-PCR en temps réel supplémentaires pour les témoins négatifs;
- l'addition de données relatives à la fidélité et des résultats de l'étude interlaboratoires.

La liste de toutes les parties de la série de normes ISO 15216 est fournie sur le site web de l'ISO website.

Introduction

Le virus de l'hépatite A (VHA) et les norovirus sont des agents fréquemment impliqués dans des 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 une 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 prêtes à l'emploi. En ce qui concerne les surfaces alimentaires, les virus sont prélevés par écouvillonnage. L'extraction de virus dans les fruits tendres, 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 et les virus des 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 composé fluorescent est fixé à une sonde nucléotidique propre à une séquence (sonde d'hydrolyse), ce qui permet aussi une confirmation simultanée de la présence de la séquence cible. Ces modifications augmentent la sensibilité et la spécificité de la méthode 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 une quantification 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 15216-1:2013 sont considérées comme mineures (voir l'ISO 17468).

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 1: Méthode de quantification

1 Domaine d'application

Le présent document décrit une méthode de quantification des niveaux d'ARN de VHA et norovirus des génogroupes I (GI) et II (GII) présents dans des échantillons pour essai d'aliments (fruits tendres, légumes feuilles, tiges et bulbes, eau embouteillée, MBV) ou sur des surfaces alimentaires. Après libération des virus contenus dans l'échantillon pour essai, l'ARN viral est extrait par lyse à l'aide de thiocyanate de guanidine et par adsorption sur silice. Les séquences cibles de l'ARN viral sont amplifiées et détectées par la technique RT-PCR en temps réel.

Cette méthode n'est pas validée pour la détection des virus ciblés 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 alimentaires ou dans d'autres matrices.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application 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 7218, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques*

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*

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 donnés dans l'ISO 22174, l'ISO 22119 et l'ISO 20838 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:

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

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 alimentaire

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

3.3
fruit tendre

petit fruit comestible sans noyau

EXEMPLE Fraises, framboises ou groseilles

3.4
légumes feuilles, tiges ou bulbes

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

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 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 contaminés, au contact avec de l'eau ou des surfaces alimentaires contaminées, ou bien par le 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 contaminés, au contact avec de l'eau ou des surfaces alimentaires contaminées, ou bien par le contact avec des matières contaminées. Les norovirus des 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
quantification du VHA

estimation du nombre de copies de l'ARN du VHA dans un rapport masse ou volume prédéterminé d'aliments, ou sur une superficie de surface alimentaire

3.8
quantification des norovirus

estimation du nombre de copies de l'ARN du norovirus dans un rapport masse ou volume prédéterminé d'aliments, ou sur une superficie de surface alimentaire

3.9
virus témoin d'extraction

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

3.10**ARN viral témoin d'extraction**

ARN extrait du virus témoin d'extraction 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 d'aliment sans agent pathogène cible, ou échantillon n'appartenant pas à la matrice sans agent pathogène cible, qui est soumis à toutes les étapes du processus d'analyse

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'exonucléase en 5'-3' de l'enzyme pendant le processus d'amplification

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

aliquote d'eau très pure utilisée dans une réaction 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 dans la réaction RT-PCR en temps réel appropriée, qui est ajouté à une aliquote d'ARN de l'échantillon selon une quantité donnée dans une réaction distincte

EXEMPLE ARN synthétisé par une 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 PCR en temps réel

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

3.17**limite de détection****LOD**

plus petite concentration de cible dans un échantillon pouvant être détectée de façon reproductible (intervalle de confiance de 95 %) dans les conditions expérimentales spécifiées dans la méthode

Note 1 à l'article: La LOD dépend de la prise d'échantillon et de la qualité de l'ARN initial.

3.18**limite de quantification****LOQ**

plus petite concentration de cible dans un échantillon pouvant être déterminée de façon quantitative avec un niveau acceptable de fidélité et d'exactitude dans les conditions expérimentales spécifiées dans la méthode

Note 1 à l'article: La LOQ dépend de la prise d'échantillon et de la qualité de l'ARN initial.

4 Principe

4.1 Extraction de virus

Les aliments et les surfaces alimentaires 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 par une méthode permettant 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 guanidine, réactif chaotropique, est utilisé pour la lyse de la capside virale. L'ARN est ensuite adsorbé sur de la silice afin de faciliter la purification au travers de plusieurs étapes de lavage. L'ARN viral purifié est libéré de la silice par un tampon avant la réaction 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 utilisant des sondes d'hydrolyse. Dans la technique RT-PCR en temps réel en une étape, la transcription inverse et l'amplification par PCR sont effectuées consécutivement dans le même tube.

La réaction RT-PCR en temps réel utilisant des sondes d'hydrolyse comprend une sonde d'ADN courte marquée par une molécule fluorescente à une extrémité et un quencher fluorescent à l'autre extrémité opposée. La chimie de cette réaction RT-PCR garantit qu'au cours du processus d'amplification de la cible, la sonde d'ADN est hydrolysée et le signal fluorescent libéré par la sonde augmente proportionnellement. La fluorescence peut être mesurée à chaque étape tout au long du cycle. Le premier cycle d'amplification détectable dans la réaction RT-PCR en temps réel est proportionnel à la quantité d'ADN initial, et ainsi l'analyse des courbes de fluorescence permet une détermination de la concentration de séquence cible dans l'échantillon.

En raison des faibles concentrations de virus initial souvent présentes dans les aliments ou les surfaces alimentaires et de la diversité des souches dans les virus ciblés, 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 pour les virus ciblés. Pour cela, des recommandations sont données en [5.2.18](#) et [5.2.19](#). 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 d'extraction

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 d'extraction. Le niveau de récupération du virus témoin d'extraction doit être déterminé pour chaque échantillon.

Le virus sélectionné en tant que témoin d'extraction 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 d'extraction 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 surfaces alimentaires à l'état naturel ne doit normalement pas être possible.

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

4.4.2 Contrôle ADN double brin (ADNdb)

Pour la quantification du virus cible, les résultats doivent être associés à un étalon de concentration connue. Une série de dilutions d'ADN double brin linéaire comportant la séquence cible d'intérêt ([5.3.11](#)) et quantifiée par une méthode appropriée, par exemple spectrophotométrie, fluorimétrie, PCR numérique, etc., doit être utilisée pour produire une courbe étalon exprimée en copies d'ADN initial par microlitre. Se référer à la courbe étalon permet la quantification d'ARN de l'échantillon en nombres de copies de génome viral détectable par microlitre.

4.4.3 Contrôle ARN CE

Des substances inhibitrices de la réaction RT-PCR sont contenues dans de nombreuses matrices alimentaires, mais peuvent également provenir d'une contamination due à un traitement effectué en amont. Afin de vérifier l'éventuelle inhibition de la RT-PCR dans un échantillon individuel, un ARN CE (une séquence d'ARN comportant la séquence cible d'intérêt, [5.3.12](#)) est ajouté à une aliquote 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 contrôle externe amplifié en l'absence d'ARN de l'échantillon permet la détermination du niveau d'inhibition de la réaction RT-PCR pour chaque échantillon soumis à essai.

L'application d'approches différentes pour l'évaluation de l'inhibition de la réaction RT-PCR est permise, 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

Cette méthode fournit un résultat exprimé en nombres de copies de génome viral détectable par millilitre, par gramme, ou par centimètre carré. Dans les échantillons où le virus n'est pas détecté, les résultats doivent être reportés comme «non détecté, <z copies de génome viral détectable par millilitre, par gramme, ou par centimètre carré» où z est la LOD dans l'échantillon.

5 Réactifs

5.1 Généralités

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

Suivre les pratiques de laboratoires en vigueur, comme indiqué dans 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 de 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.

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).

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 guanidine^[3] et en utilisant la silice comme matrice de capture de l'ARN. Après traitement de l'ARN lié à la silice par 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 réaction 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 réaction de RT-PCR en temps réel en une étape en utilisant des sondes d'hydrolyse (l'ADN polymérase utilisée doit posséder une activité exonucléasique en 5' à 3') et ils doivent présenter une sensibilité suffisante pour la détection des ARN viraux, attendus dans les aliments et les surfaces alimentaires contaminés en 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 de VHA et de norovirus GI et GII. Les séquences d'amorce et de sonde 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 lors de l'élaboration du présent document).

5.2.20 Amorces et sondes d'hydrolyse pour la détection de virus témoin d'extraction. 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 d'extraction. Elles ne doivent démontrer aucune réactivité croisée avec le virus cible.

5.3 Réactifs préparés

En raison du nombre élevé de réactifs requérant une préparation individuelle, les détails de composition et de préparation sont donnés dans l'[Annexe B](#).

5.3.1 5 × Solution PEG/NaCl (500 g/l PEG 8 000, 1,5 mol/l NaCl); 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 EDTA (0,5 mol/l); voir [B.7](#).

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

5.3.9 Virus témoin d'extraction. La solution mère de virus témoin d'extraction doit être diluée par un facteur de 10 au minimum dans un tampon approprié, par exemple dans du PBS ([5.3.4](#)). Cette dilution doit permettre une détection sans inhibition du génome du virus témoin d'extraction lors d'une réaction RT-PCR en temps réel mais doit être suffisamment concentrée pour déterminer, de façon reproductible, la dilution la moins concentrée, utilisée pour la courbe étalon de l'ARN viral témoin d'extraction ([8.4.2.2](#)). Diviser la solution de virus témoin d'extraction diluée en aliquotes 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 d'extraction (utilisée lors de l'élaboration du présent document).

5.3.10 Mélanges réactionnels pour la réaction RT-PCR en temps réel pour les virus cibles et témoin d'extraction. 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 Contrôle ADNdb. Des molécules d'ADN linéaire purifiées portant la séquence cible de chaque virus cible doivent être utilisées. La séquence des molécules d'ADN doit être vérifiée avant la première utilisation. Les préparations doivent être exemptes d'inhibiteur de la RT-PCR. Les concentrations de chaque préparation mère d'ADNdb en nombre de copies d'ADN initial par microlitre doivent être déterminées, puis la préparation doit être diluée dans un tampon approprié, par exemple le Tris EDTA ([5.3.8](#)), jusqu'à une concentration de 1×10^4 à 1×10^5 copies par microlitre. L'EDTA pouvant être inhibiteur de la réaction de RT-PCR, les tampons utilisés pour diluer l'ADNdb ne doivent pas contenir de concentrations d'EDTA supérieures à 1 mmol/l. Diviser la préparation d'ADNdb diluée (contrôle ADNdb) en aliquotes à usage unique et les conserver à $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h, à une température inférieure ou égale à -15°C pendant six 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'ADNdb (utilisée lors de l'élaboration du présent document).

5.3.12 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 ou égales à 0,1 % et ne doivent pas causer d'inhibition de la réaction RT-PCR. Les concentrations de chaque préparation mère d'ARN CE en nombre de copies par microlitre doivent être déterminées, puis la préparation doit être diluée dans un tampon approprié, par exemple le Tris EDTA ([5.3.8](#)), jusqu'à une concentration de 1×10^2 à 1×10^5 copies par microlitre. La concentration utilisée doit être adaptée aux types d'échantillons soumis à essai et 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 réaction de RT-PCR, les tampons utilisés pour diluer l'ARN CE ne doivent pas contenir

des concentrations d'EDTA supérieures à 1 mmol/l. Diviser la préparation d'ARN CE diluée (contrôle ARN CE) en aliquotes à usage unique et les conserver à $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ pendant 24 h, à une température inférieure ou égale à $-15 ^\circ\text{C}$ pendant six mois, ou à une température inférieure ou égale à $-70 ^\circ\text{C}$ pour une conservation plus longue. Voir l'[Annexe H](#) pour les détails d'un exemple de préparation d'ARN CE (utilisée lors de l'élaboration du présent document).

6 Matériel et consommables

Un équipement courant de laboratoire en microbiologie (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 . Il convient d'utiliser des pointes résistant aux aérosols sauf si des pointes sans filtre sont exigées, par exemple pour l'aspiration (comme en [6.7](#) 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 Agitateur capable de fonctionner à une vitesse d'environ 50 oscillations min^{-1} .

6.5 Incubateur agitateur fonctionnant à $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ à une vitesse d'environ 320 oscillations min^{-1} ou équivalent.

6.6 Plateforme(s) rotative(s) ou équivalent pour une utilisation à température ambiante et à $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ à une vitesse d'environ 60 oscillations min^{-1} .

6.7 Système d'aspiration ou système équivalent pour l'élimination du surnageant.

6.8 Bain-marie capable de fonctionner à $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ou équivalent.

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

- a) 10 000g à $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ et acceptant des tubes d'un volume d'au moins 35 ml;
- b) 10 000g à $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ et acceptant des tubes résistants au chloroforme d'un volume de 2 ml;
- c) 4 000g à température ambiante, fonctionnant avec des filtres centrifuges concentrateurs ([6.16](#)).

6.10 Microcentrifugeuse.

6.11 Tubes et flacons pour centrifugeuses et microcentrifugeuses 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 démarcations de 0,5 unité 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 pore de 0,45 μm (47 mm de diamètre).

6.16 Filtres centrifuges concentrateurs d'une capacité de 15 ml et 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 Couteaux à huître stériles ou outils équivalents pour l'ouverture des MBV.

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

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

6.21 Boîtes de Petri stériles.

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

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 d'ARN (utilisé lors de l'élaboration du présent document).

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

7 Échantillonnage

S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées parviennent à un accord sur le sujet.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou de l'entreposage; par exemple, les échantillons ayant été congelés lors du prélèvement ne doivent pas être dégelés avant réception par le laboratoire, les échantillons non congelés lors du prélèvement ne doivent pas être congelés avant réception par le laboratoire.

8 Mode opératoire

8.1 Exigences générales de laboratoire

L'extraction de l'échantillon et la réaction RT-PCR en temps réel doivent être effectuées dans des zones ou des pièces séparées, telles que spécifiées dans l'ISO 22174.

8.2 Extraction de virus

Le choix de la méthode dépend de la matrice alimentaire soumise à essai.