
**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.itech.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>



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>

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/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/bf60ea21-6472-43a0-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.