NORME INTERNATIONALE

ISO 15216-2

Première édition
2019-07

Microbiologie dans la chaine 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

Numéro de référence
ISO 15216-2:2019(F)

© ISO 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**

© ISO 2019 – Tous droits réservés

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 MC_0 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**

 © ISO 2019 – Tous droits réservés

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.

© ISO 2019 – Tous droits réservés

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 capside 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 2019 – Tous droits réservés

Microbiologie dans la chaine 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*

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.

© ISO 2019 – Tous droits réservés

3.2
surface
surface des aliments, surface de préparation des aliments ou surface en contact avec les aliments

3.3
baies
petit fruit comestible sans noyau

EXEMPLE Fraises, framboises, groseilles.

3.4
légumes feuilles, tiges et bulbes
feuilles, tiges et bulbes de végétaux consommés en tant que légumes

EXEMPLE Laitue, oignons verts.

3.5
virus de l'hépatite A
VHA
membre de la famille des *Picornaviridae* responsable d'hépatite infectieuse

Note 1 à l'article: Génétiquement, le VHA peut être subdivisé en six génotypes sur la base de la région VP1/2A (des génotypes 1, 2 et 3 ont été trouvés chez les humains alors que les génotypes 4, 5 et 6 sont d'origine simienne). Il n'existe qu'un sérotype.

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

3.6
norovirus
membre de la famille des *Caliciviridae* responsable de cas sporadiques et d'épidémies de gastroentérites aiguës

Note 1 à l'article: Génétiquement, les norovirus peuvent être subdivisés en sept génogroupes distincts. Trois de ces génogroupes, GI, GII et GIV, ont été impliqués dans des troubles gastro-intestinaux chez l'homme. GI et GII sont responsables de la grande majorité des cas cliniques.

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

3.7
détection du VHA
détection de l'ARN du *VHA* (3.5) dans une masse ou un volume d'*aliments* (3.1) ou sur une superficie de *surface* (3.2) prédéterminés

3.8
détection des norovirus
détection de l'ARN du *norovirus* (3.6) dans une masse ou un volume d'*aliments* (3.1) ou sur une superficie de *surface* (3.2) prédéterminés

3.9
virus témoin de processus
virus ajouté à la prise d'échantillon, avant de commencer l'extraction du virus, afin de contrôler le rendement d'extraction

3.10
ARN du virus témoin
ARN extrait du *virus témoin de processus* (3.9) permettant d'établir une courbe étalon en vue de l'estimation du rendement d'extraction

© ISO 2019 – Tous droits réservés

3.11
témoin négatif d'extraction d'ARN
témoin sans ARN cible soumis à toutes les étapes du mode opératoire d'extraction d'ARN et de détection permettant de s'assurer de l'absence de contamination

3.12
témoin négatif de processus
échantillon de la matrice alimentaire sans agent pathogène cible, ou échantillon n'appartenant pas à la matrice sans agent pathogène cible, soumis à toutes les étapes du processus analytique

3.13
sonde d'hydrolyse
sonde fluorescente couplée à une molécule fluorescente et une molécule quencher, qui sont séparées de façon stérique par l'activité d'exonucléasique 5'-3' de l'enzyme pendant le processus d'amplification

3.14
témoin négatif de RT-PCR en temps réel
aliquot d'eau très pure utilisée dans une RT-PCR en temps réel permettant de s'assurer de la non-contamination des réactifs de RT-PCR en temps réel

3.15
ARN contrôle externe
ARN CE
ARN de référence pouvant être utilisé pour évaluer l'inhibition de l'amplification d'une réaction de RT-PCR en temps réel appropriée, qui est ajouté à un aliquot d'ARN de l'échantillon selon une quantité donnée dans une réaction distincte

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

3.16
valeur C_q
cycle de quantification, correspondant au moment réactionnel où la cible est quantifiée pour une réaction donnée de RT-PCR en temps réel

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

4 Principe

4.1 Extraction de virus

Les aliments et les surfaces couverts par le présent document sont souvent des matrices hautement complexes et les virus cibles peuvent être présents à de faibles concentrations. Il est donc nécessaire d'effectuer une extraction et/ou une concentration du virus propre à la matrice afin de produire un substrat pour les parties communes ultérieures du processus. Le choix de la méthode dépend de la matrice.

4.2 Extraction d'ARN

Il est nécessaire d'extraire l'ARN en utilisant une méthode qui permet d'obtenir des préparations d'ARN de pureté appropriée afin de réduire les effets des inhibiteurs de RT-PCR. Dans le présent document, le thiocyanate de guanidinium, réactif chaotropique, est utilisé pour la lyse de la capside virale. L'ARN est ensuite adsorbé sur de la silice afin de faciliter la purification à travers plusieurs étapes de lavage. L'ARN viral purifié est libéré de la silice dans un tampon avant la RT-PCR en temps réel.

4.3 RT-PCR en temps réel

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

© ISO 2019 – Tous droits réservés