

**DIRECTIVES RELATIVES AUX CRITÈRES DE PERFORMANCE ET À LA VALIDATION DES
MÉTHODES DE DÉTECTION, D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION DE
SÉQUENCES D'ADN SPÉCIFIQUES ET DE PROTÉINES SPÉCIFIQUES CONTENUES DANS
LES ALIMENTS***
CAC/GL 74-2010

SECTION 1 – INTRODUCTION

1. Les méthodes d'analyse moléculaire et immunologique sont actuellement les outils reconnus pour la détermination de l'ADN et des analytes protéiques dans les aliments. Cependant, pour que les résultats obtenus à l'aide de ces méthodes dans des laboratoires différents soient largement acceptés et jugés fiables, les méthodes d'analyse doivent remplir certains critères de qualité.
2. Les présentes lignes directrices fournissent des critères appropriés permettant de valider la performance des méthodes élaborées pour détecter des séquences d'ADN spécifiques ou des protéines spécifiques dans les aliments.
3. On trouvera dans la première partie de ces lignes directrices des considérations d'ordre général pour la validation des méthodes utilisées pour l'analyse de séquences d'ADN spécifiques et de protéines spécifiques. Des annexes fournissent des renseignements sur la validation des méthodes de réaction en chaîne de la polymérase (PCR) quantitative, la validation des méthodes de PCR qualitative, et la validation des méthodes fondées sur les protéines.

SECTION 1.1 – BUT ET OBJECTIFS

4. Le présent document a pour objet d'appuyer l'élaboration de méthodes moléculaires et immunologiques pour la détection, l'identification et la quantification de séquences d'ADN spécifiques et de protéines spécifiques dans les aliments qui produisent des résultats avec une reproductibilité comparable lorsqu'elles sont appliquées dans des laboratoires différents
5. Les lignes directrices donnent des indications sur la manière d'élaborer des méthodes permettant de détecter et d'identifier des séquences d'ADN et des protéines spécifiques dans les aliments, en définissant des critères de validation appropriés, et en établissant si une méthode est conforme ou non à ces critères sur la base des caractéristiques de performance d'une méthode.

Les lignes directrices spécifient les critères pertinents et donnent des explications sur la manière de considérer ces critères, c'est-à-dire:

- en indiquant le bien-fondé des critères les plus importants; et
- en montrant comment établir si une méthode est conforme ou non aux critères établis.

SECTION 1.2 CHAMP D'APPLICATION

6. Les présentes lignes directrices contiennent des informations sur les critères de validation des méthodes d'analyse des aliments comportant la détection, l'identification et la quantification de séquences d'ADN spécifiques et de protéines spécifiques pouvant être présentes dans les aliments, y compris les aliments contenant du matériau dérivé des biotechnologies modernes. Ces méthodes moléculaires et immunologiques peuvent s'appliquer à des fins multiples comme la détermination des biomarqueurs dans les aliments, y compris ceux dérivés des biotechnologies et l'authentification des aliments, et peuvent être utilisées par les laboratoires chargés de l'analyse des aliments.

* pour les applications comme les aliments dérivés des biotechnologies, l'authentification des aliments, la spéciation des aliments entre autres.

SECTION 2 – VALIDATION DES MÉTHODES

7. La Commission du Codex Alimentarius accorde une place importante à l'acceptation des méthodes d'analyses qui ont été validées dans le cadre d'essais collaboratifs réalisés selon un protocole accepté au plan international conformément à la norme ISO 5725:1994 ou au Protocole harmonisé AOAC/UIPAC. Dans ce domaine, il faut peut-être adopter à titre provisoire une validation officielle par un laboratoire unique en l'absence de données d'essais collaboratifs. Cependant, les méthodes utilisées pour l'analyse des séquences d'ADN et des protéines doivent pouvoir être appliquées par de nombreux laboratoires.

Section 2.1 – Démarche critère

8. Les présentes directives appliquent la "démarche critère".

Section 2.2 – Critères généraux des méthodes

9. Les critères généraux adoptés pour la sélection des méthodes d'analyse sont énoncés dans le Manuel de procédure du Codex. Ces critères sont appliqués dans les présentes directives. D'autres critères sont décrits dans les annexes appropriés.

Section 2.3 – Processus de validation

10. La validation des méthodes est un processus qui permet d'établir les caractéristiques et les limites de performance d'une méthode d'analyse. Les résultats d'un processus de validation décrivent les analytes qui peuvent être déterminés dans quels types de matrice en présence de quelle interférence. Le processus de validation détermine des valeurs de la précision et de la justesse d'une certaine méthode d'analyse dans les conditions examinées.

11. La validation formelle d'une méthode est la conclusion d'un long processus, qui comprend les principales étapes suivantes:

- **Prévalidation de la méthode.** La prévalidation devrait être réalisée au cas par cas selon les besoins. Elle devrait assurer qu'une méthode fonctionne d'une telle manière qu'elle permet une conclusion satisfaisante de l'étude de validation, c'est-à-dire elle doit démontrer que la méthode répond à l'objectif visé. La prévalidation devrait de préférence être effectuée par deux à quatre laboratoires. Les analyses statistiques (par exemple, de « répétabilité » et de « reproductibilité ») devraient être réalisées conformément à la procédure de validation qui sera utilisée par la suite.
- **Validation de la méthode.** La validation dans le cadre d'essais collaboratifs est coûteuse et n'est effectuée en général que si la performance de la méthode s'est avérée acceptable à la fois dans une étude de laboratoire unique et dans une étude de prévalidation.

SECTION 3 – CONSIDÉRATIONS SPÉCIFIQUES POUR LA VALIDATION DES MÉTHODES DE DÉTECTION, D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION DE SÉQUENCES D'ADN ET DE PROTÉINES

Section 3.1 – Élaboration des méthodes aux fins d'une validation officielle

12. Les méthodologies courantes d'analyse fondée sur l'ADN sont les méthodes à base de PCR utilisées pour déceler une séquence spécifique d'ADN (cible). Les approches courantes pour les protéines utilisent les épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) et les dispositifs de flux latéral. Pour l'analyse reposant sur l'ADN, l'approche PCR est actuellement très largement appliquée, bien que d'autres méthodes fondées sur l'ADN permettant d'obtenir le même objectif puissent être employées si elles ont été validées correctement. Les approches fondées sur l'ADN et sur les protéines sont examinées ici.

Section 3.1.1 – Critères d'acceptation de la méthode (Conditions requises pour la validation)

13. Afin d'évaluer une méthode avant sa validation, des renseignements concernant la méthode et l'essai de la méthode sont demandés, dont on trouvera le détail à l'Annexe I.

14. L'évaluation de la méthode devrait permettre de vérifier que les conditions de principe préalables pour l'utilisation de la méthode aux fins du Codex sont remplies. La présente section décrit les critères d'acceptation de la méthode qui doivent être remplis avant de mener une prévalidation et des essais collaboratifs complets.

Section 3.1.2 – Applicabilité de la méthode

15. L'applicabilité des méthodes peut être établie en confirmant si les méthodes peuvent ou non être utilisées dans les aliments prévus avec la performance requise et ce point devrait être clairement indiqué. En particulier, dans l'analyse des séquences d'ADN et des protéines, certaines méthodes qui peuvent être appliquées à une matrice simple crue ne s'appliquent pas nécessairement aux matrices complexes et/ou aux aliments transformés, étant donné que l'ADN et les protéines peuvent être modifiés.

16. En principe, la méthode devrait être applicable à la matrice concernée. Dans le cas des méthodes « à usage général » visant à identifier et à quantifier les séquences d'ADN et les protéines dans une série de matrices alimentaires, au moins une méthode d'extraction applicable à une matrice alimentaire générale devrait être disponible.

Section 3.1.3 – Condition de principe

17. Les méthodes fondées sur l'ADN devraient détecter, identifier et peuvent quantifier les niveaux des séquences d'ADN spécifique. Les méthodes fondées sur les protéines devraient détecter et peuvent quantifier le niveau d'une protéine spécifique dans le produit.

18. Actuellement, la méthode de détection fondée sur l'ADN est en général une méthodologie PCR et inclut:

- un protocole décrivant une méthode d'extraction qui est applicable à la matrice pertinente;
- un protocole décrivant les conditions, y compris l'appareil utilisé, dans lesquelles la PCR peut être utilisée pour déceler la séquence de l'ADN cible;
- une description des séquences d'amorces oligonucléotidiques qui amplifient uniquement la séquence de l'ADN cible;
- le cas échéant, une description de la séquence de sonde oligonucléotidique fluorescente qui identifie uniquement la séquence de l'ADN cible;
- une description des séquences d'amorces oligonucléotidiques qui amplifient une séquence de l'ADN spécifique du taxon qui devrait être présent dans la matrice de l'aliment conventionnel indépendamment de la présence de l'analyte spécifique, afin de pouvoir différencier un résultat négatif d'un processus d'extraction et/ou d'amplification n'ayant pas abouti, et de quantifier la quantité d'ADN cible par rapport à l'ADN spécifique du taxon.
- le cas échéant, une description de la séquence de sonde oligonucléotidique fluorescente qui identifie uniquement la séquence de l'ADN spécifique du taxon.
- une description de la méthode de détection de l'ADN.
- des échantillons témoins et des standards appropriés.
- la description des calculs utilisés pour obtenir le résultat.

19. Les méthodes fondées sur les protéines sont en général de type quantitatif ou qualitatif. Il s'agit en général de systèmes d'immuno-analyses, et comportent les éléments suivants:

- un protocole décrivant une méthode d'extraction qui est applicable à la matrice pertinente;
- un protocole décrivant les conditions, y compris l'appareil utilisé, dans lesquelles l'immuno-analyse peut être utilisée pour déceler la séquence de la protéine cible;
- une plaque de microtitrage enduite d'anticorps,

- un anticorps secondaire conjugué enzyme,
- un substrat enzymatique pour le développement chromogène, et
- un tampon de lavage et un tampon d'extraction d'échantillon.
- une description de la méthode de détection de la protéine
- des échantillons témoins et des standards appropriés.
- la description des calculs utilisés pour obtenir le résultat.

20. La méthode devrait remplir les conditions ci-après:

- les méthodes fondées sur les protéines devraient permettre la détection, l'identification et/ou la quantification sans équivoque d'un antigène ou d'épitope spécifique.
- les méthodes de sélection fondées sur l'ADN sont utilisées pour déceler la présence d'un ADN cible dans une multiplicité d'organismes. Par exemple, les méthodes de sélection qui sont utilisées pour détecter des événements de transformation multiples devraient permettre la détection d'une séquence d'ADN cible qui est commune à plusieurs événements de transformation.
- les méthodes spécifiques fondées sur l'ADN qui sont utilisées pour la détection, l'identification et/ou la quantification sans équivoque d'un organisme spécifique qui pourrait être mêlé à des organismes analogues devraient permettre la détection, l'identification et/ou la quantification sans équivoque d'une séquence d'ADN cible qui est unique ou spécifique de cet organisme. Par exemple, les méthodes spécifiques de la cible qui sont utilisées pour la détection d'un événement de transformation unique devraient permettre la détection, l'identification et/ou la quantification sans équivoque d'une séquence d'ADN qui est unique ou spécifique de cet événement de transformation. Pour l'authentification des aliments, la séquence spécifique de la cible devrait définir uniquement le taxon demandé.
- les méthodes spécifiques du taxon fondées sur l'ADN utilisées pour la détection ou la quantification relative de l'ADN cible devraient permettre la détection, l'identification et la quantification sans équivoque d'une séquence d'ADN qui est unique ou spécifique de ce taxon.
- pour les méthodes spécifiques du taxon et de la cible utilisées dans la quantification relative, l'identification du fragment amplifié, par exemple par hybridation de sonde ou tout procédé équivalent approprié, est recommandée.

Section 3.1.4 – Unités de mesure et présentation des résultats

21. Des unités de mesure appropriées (par exemple, nombre de copies cibles ou équivalents molaires), des critères de performance et de présentation des données devraient être définis pour ces méthodes avant de les utiliser. Pour l'analyse quantitative, les résultats peuvent être exprimés comme présent ou non détecté ce qui explique qu'il n'y a pas d'unité de mesure.

22. Les mesures peuvent être exprimées de manière explicite en tant que poids/poids ou en pourcentage relatif. Cependant, aucune des méthodes de détection actuelles (qu'elles soient fondées sur l'ADN ou sur les protéines) ne sont à même de mesurer cela directement.

Section 3.1.5 – Incertitude de mesure

23. Comme le mentionne les Directives du Codex sur l'incertitude des mesures (CAC/GL 54-2004), les laboratoires doivent estimer l'incertitude de leurs mesures quantitatives. La préparation de l'échantillon et les méthodes d'analyse sont deux sources importantes d'erreur qui devraient être prises en compte lors de l'évaluation d'une mesure d'analyse. Les analystes utilisant des méthodes qui ont été validées conformément aux présentes lignes directrices devraient disposer d'informations suffisantes pour leur permettre d'estimer l'incertitude des résultats.

24. Pour de plus amples détails, consulter les Directives du Codex sur l'incertitude des mesures (CAC/GL 54-2004), le Manuel de procédure du Codex, section intitulée "*Utilisation des résultats*

analytiques: plans d'échantillonnage, rapports entre les résultats analytiques, l'incertitude de mesure, les facteurs de récupération et les dispositions dans les normes Codex”.

Section 3.1.6 – Approche modulaire de la validation de la méthode

25. La « méthode » s'entend de toutes les procédures expérimentales requises pour estimer le mesurande dans une matrice particulière. Il peut s'agir pour un matériau particulier des méthodes d'extraction de l'ADN ou de la protéine et de la quantification finale dans un système PCR ou de dosage immunologique, ou d'une détermination de la présence ou de l'absence de l'analyte par une méthode qualitative. Dans un tel cas, toute la chaîne qui va de l'extraction à l'étape d'analyse constitue une méthode. Il est cependant possible d'utiliser la même méthode de préparation des échantillons (par exemple, broyage) en association avec le processus d'isolement du même ADN ou de la même protéine pour plusieurs analyses ultérieures différentes pour des raisons d'efficacité économique à condition que les processus de la méthode validée restent les mêmes.

26. Il serait inapproprié de substituer des processus, comme un processus d'isolement de protéine ou d'ADN différent, dans une méthode validée sans mener des études supplémentaires pour montrer que la substitution n'a pas d'incidence sur la performance de la méthode.

Section 3.2 – Exigences concernant les essais collaboratifs

Section 3.2.1 – Informations générales

27. Un essai collaboratif a pour but de valider les données obtenues lors d'essais précédents réalisés dans le cadre d'activités de prévalidation ou de laboratoire unique et de déterminer la fidélité de la méthode sur le plan de la répétabilité et de la reproductibilité.

28. Les valeurs de tous les paramètres de performance obtenues dans des études de validation devraient être interprétées et comparées avec soin. Les valeurs exactes et leur interprétation peuvent dépendre – outre de la performance de la méthode – de l'étendue de la méthode.

29. Lorsqu'un essai collaboratif a été réalisé conformément à la norme ISO 5725:1994 ou au Protocole harmonisé AOAC/UIPAC, les données ainsi obtenues peuvent être utilisées pour apprécier l'acceptabilité de la méthode.

Section 3.2.2 – Exigences de performance minimale

30. Dans un essai collaboratif, la performance de la méthode devrait être conforme aux éléments pertinents des critères d'acceptation de la méthode et aux exigences de performance de la méthode ci-après établies spécifiquement pour l'essai collaboratif. Il faudrait évaluer en particulier la conformité aux critères en matière de sensibilité, d'écarts-types de répétabilité/reproductibilité et de justesse.

31. Outre les critères d'acceptation de la méthode, il faudrait au moins évaluer les exigences de performance des méthodes énumérées à l'Annexe I en fonction des données expérimentales obtenues dans un essai collaboratif.

32. Les méthodes et les données de validation qui y sont associées seront l'objet d'un examen périodique, car les connaissances scientifiques et l'expérience acquise dans les essais collaboratifs et la validation sont amenées à évoluer. Les présentes lignes directrices sont aussi complétées par des informations pratiques sur les étapes opérationnelles du processus de validation.

Section 3.2.3 – Matériaux d'essai à utiliser dans un essai collaboratif

33. En principe, la méthode devrait être applicable à la matrice concernée (c'est-à-dire pour laquelle une spécification a été formulée) et testée sur elle.

34. Les effets des matériaux ou matrices sur l'étape d'extraction dans un protocole sont importants pour toutes les analyses. Lorsque les résultats d'une étude de validation sont communiqués, il importe d'inclure dans le rapport les détails concernant la matrice analysée, et de signaler aussi si une protéine ou un ADN purifié ont été utilisés comme cible de l'analyse.

Section 3.2.4 – Renseignements spécifiques sur la validation des méthodes

35. Des renseignements spécifiques sur la validation des méthodes PCR quantitative et qualitative figurent aux Annexes II et III respectivement.

36. On trouvera à l'Annexe IV des renseignements sur la validation des méthodes quantitatives et qualitatives fondées sur les protéines.

SECTION 4 – EXIGENCES DU CONTRÔLE DE QUALITÉ

Section 4.1 – Qualité des laboratoires

37. La norme CAC/GL 27 donne des orientations aux laboratoires auxquels il est fait appel dans le cadre de l'importation et de l'exportation de denrées alimentaires. Ces orientations reposent sur la conformité à la norme ISO/IEC 17025, les essais d'aptitude et le contrôle interne de la qualité ainsi que l'utilisation de méthodes d'analyse validées conformément aux exigences du Codex .

Section 4.2 – Matériau de référence

38. Un matériau de référence approprié est en général exigé pour la validation d'une méthode. Plusieurs matrices peuvent être utilisées pour élaborer des matériaux de référence ou des normes de travail pour les méthodes de détection des séquences d'ADN et des protéines. Chacune a ses propres avantages et inconvénients selon l'utilisation prévue. La présentation physique du matériau de référence détermine son utilisation pour une méthode donnée. En ce qui concerne les matériaux broyés, les différences dans la répartition granulométrique entre les matériaux de référence et les échantillons de routine peuvent avoir une incidence sur l'efficacité de l'extraction de la protéine ou de l'ADN cible et sur la reproductibilité de la méthode du fait d'erreurs d'échantillonnage.

39. Le matériau de référence pour les méthodes fondées sur l'ADN peut être une matrice contenant l'analyte, de l'ADN extrait d'une matrice contenant l'analyte, un plasmide contenant l'ADN spécifique, ou lorsque des matériaux de référence certifiés ne sont pas disponibles, des matériaux de l'échantillon de contrôle, par exemple provenant de programmes d'essais d'aptitude. En cas d'utilisation d'ADN plasmidique ou amplifié, l'ADN spécifique de la cible et/ou du taxon à incorporer dans le plasmide ou dans l'amplicon doit être choisi après un examen attentif afin d'assurer que l'ADN plasmidique ou amplifié est apte au but poursuivi.

40. Les matériaux de référence pour les méthodes de détection des protéines peuvent être la protéine elle-même purifiée de microbes recombinant (comme *E. coli*), une matrice de plante broyée (en général feuille ou grain), ou une fraction de l'aliment transformé.

SECTION 5 – INFORMATIONS TECHNIQUES ET MÉTHODOLOGIQUES

Les aspects techniques et méthodologiques des méthodes fondées sur l'ADN et sur les protéines sont énumérés ci-après à titre de références:

Allmann M, Candrian U, Hoefelein C and Luethy J (1993). Polymerase Chain Reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Lebensm. Unters. Forsch* 196:248-251.

Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H and Van den Eede G (2002). Analytical methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms (GMO's) in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products. *European Food Research and Technology* 214:3-26.

Asensio L (2007). Examen PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18(11): 558-566.

Asensio L, Gonzalez I, Garcia T and Martin R (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19:1-8.

Carnegie, PR (1994). Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas. Biotechnol.* 4(3):146-9.

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P and Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control*. 18(10):1211-1215

Manuel de procédure de la Commission du Codex Alimentarius. Utilisation des résultats analytiques: plans d'échantillonnage, rapports entre les résultats analytiques, l'incertitude de mesure, les facteurs de récupération et les dispositions dans les normes Codex.

CAC/GL 54-2004. Directives du Codex sur l'incertitude des mesures.

Colgan S, O'Brien LO, Maher M, Shilton N, McDonnell K and Ward S (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International* 34(5):409-414.

Dahinden I, von Büren M and Lüthy J (2001). A Quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology* 212(2):228-233.

Dieffenbach CW and Dveksler GS (1993). Setting up a PCR laboratory. *PCR Methods Appl.* 3(2):S2-7.

Norme ISO 5725-1996: Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes. Genève: Organisation internationale de normalisation.

Norme ISO 21569:2005 Produits alimentaires - Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés - Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques. Genève: Organisation internationale de normalisation.

Norme ISO 21570:2005 Produits alimentaires - Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés - Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques. Genève: Organisation internationale de normalisation.

Norme ISO/DIS 24276:2006. Produits alimentaires - Méthodes d'analyse basées sur l'utilisation des acides nucléiques pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés - Exigences générales et définitions. Genève: Organisation internationale de normalisation.

Norme ISO/IEC 17025:2005. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essai. Genève: Organisation internationale de normalisation.

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins R, Lipp M, Shan G, Stave J., and V. Pantella (2007). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*. 85: 3, pp 780-786.

Holst-Jensen A. and Berdal KG (2004). The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *Journal of AOAC International* 87(4):927-36.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Kwok S and Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339(6221):237-238.

Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D and Song P (2005) Polymerase Chain Reaction Technology as an analytical tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International* 88 (1):36-155.

Meyer R, Candrian U (1996). PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 29(1-2):1-9.

Mifflin TE (2007) Setting Up a PCR Laboratory. *Cold Spring Harbor Protocols* 14 (doi:10.1101/pdb.top14)

Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJP, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JPPF and Zagon J (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42:1157-1180.

- Newton CR, Herbitter A and Gubler U (1995). PCR: Essential Data. Hoboken (NJ): J. Wiley & Sons.
- Olexova L, Dovičovičová L, Švec M, Siekel P, Kuchta T. (2006). Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control* 17(3):234-237.
- Poms, RE; Klein CL, Anklam E (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21(1):1-31.
- Trapmann S, Burns M, Broll H, Macarthur R, Wood RKS, Žel Jana (2009). Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. *EUR - Scientific and technical research series*. Luxembourg: Office for official publications of the European communities.
- Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli, M and Marmiroli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control*. 21(2):143-149.
- Williams R. (2005). Gene tests served up to tell fine foods from fakes. *Nature* 434:262.
- Woolfe M and Primrose S (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22(5):222-6.

ANNEXE I: INFORMATIONS EXIGÉES LORSQUE DES MÉTHODES DOIVENT ÊTRE EXAMINÉES EN VUE DE LEUR VALIDATION

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1. Une description complète et détaillée de toutes les composantes de la méthode devra être fournie. L'utilisation de plaques multiples pour les méthodes fondées sur la PCR ou sur les protéines, par exemple, devra être traitée de manière explicite. La description inclura aussi des informations sur le champ d'application de la méthode et l'unité de mesure sera clairement indiquée, ainsi que ce qui suit:

Objectif et pertinence de la méthode

2. L'objectif de la méthode devra être indiqué. La méthode devra être apte à l'usage prévu.

Fondement scientifique

3. Les grandes lignes des principes scientifiques sur lesquels la méthode est fondée (par ex., la biologie moléculaire sur laquelle repose l'utilisation d'une méthode PCR en temps réel) devront être présentées.

Spécification du modèle prédictif ou du modèle mathématique requis pour la méthode

4. Les techniques fondées sur l'ADN ou sur les protéines utilisées pour détecter et quantifier les séquences d'ADN et les protéines reposent sur des principes différents. Dans les méthodes PCR, l'ADN cible est amplifié de manière exponentielle. De plus, l'analyse quantitative par PCR en temps réel repose souvent sur deux épreuves PCR indépendantes: une pour l'ADN cible et une autre pour la séquence spécifique du taxon. Contrairement à la PCR, les épreuves immunologiques impliquent la liaison d'une ou plusieurs couches d'anticorps à chaque molécule cible initiale, et l'amplification du signal est proportionnelle au nombre de molécules rapporteur et, le cas échéant, au temps de réaction enzymatique.

5. Si le calcul des résultats s'appuie sur une relation mathématique, cette dernière doit être décrite et indiquée (par ex., méthode $\Delta\Delta Ct$, ou une droite de régression ou une courbe de calibrage obtenue par d'autres moyens). Des instructions permettant une application correcte du modèle devront être fournies. Il pourra s'agir, selon la méthode, d'un nombre et d'une fourchette recommandés des niveaux à analyser, du nombre minimal de répliques et/ou de dilutions à inclure pour les analyses de routine ou les moyennes et intervalles de confiance pour évaluer la qualité de l'ajustement.

INFORMATIONS SPÉCIFIQUES REQUISES POUR LES MÉTHODES FONDÉES SUR L'ADN

6. Les autres informations énumérées ci-après devront être fournies pour les procédures fondées sur l'ADN, en particulier:

Paires d'amorces

7. Les méthodes générales doivent fournir les paires d'amorces définies et la séquence qu'elles ciblent. Les recommandations relatives à l'efficacité et/ou l'utilisation des amorces doivent être clairement énoncées, y compris si les amorces sont aptes à la sélection et/ou la quantification.

- ***Longueur de l'amplicon***

8. La transformation des aliments entraîne en général une dégradation de l'ADN cible. La longueur du produit amplifié peut avoir une incidence sur la performance de la PCR. La sélection d'amplicons de plus petite taille (dans des limites raisonnables) augmentera la possibilité d'obtenir un signal positif dans l'analyse des produits alimentaires ayant subi une forte transformation. En général, la longueur du fragment amplifié pour la séquence d'ADN spécifique du taxon et la séquence cible devrait se situer dans la même fourchette.

- ***si la méthode est spécifique d'un instrument ou d'une substance chimique***

9. Plusieurs instruments ou substances chimiques en temps réel sont à l'heure actuelle disponibles. Ces instruments et substances chimiques peuvent avoir des performances différentes comme la stabilité des

réactifs, les caractéristiques de chauffage et de refroidissement, qui ont une incidence sur la vitesse de montée et sur le temps requis pour une épreuve PCR complète.

10. Outre les différences dans le système de chauffage et de refroidissement, il existe des différences dans la technique et le logiciel utilisés pour induire et ensuite enregistrer la fluorescence. La détection et la quantification de la fluorescence pourraient aussi varier selon les instruments d'enregistrement et le logiciel utilisés. Les méthodes qualitatives tendent en général à être moins spécifiques à un instrument que les méthodes quantitatives.

11. Les méthodes dépendent en général des instruments et des chimies et ne peuvent pas être transférées à d'autres matériels et substances chimiques sans évaluation et/ou modification.

- *si des amplifications PCR de type uniplexe ou multiplexe sont effectuées*

12. On entend par PCR multiplexe l'utilisation de plusieurs séries d'amorces dans une réaction unique.

13. Les informations fournies devront montrer la robustesse de la méthode aux fins de la transférabilité interlaboratoires. Cela signifie que la méthode aura été testée par au moins un autre laboratoire outre celui qui en est l'auteur. Il s'agit d'une condition préalable pour que la validation de la méthode soit menée à bonne fin.

INFORMATIONS SPÉCIFIQUES EXIGÉES POUR LES MÉTHODES FONDÉES SUR LES PROTÉINES

14. Les informations supplémentaires énumérées ci-après devront être fournies pour les procédures fondées sur les protéines, en particulier:

Applicabilité de l'essai

15. La transformation des aliments entraîne en général une dégradation ou une dénaturation de la protéine cible, ce qui peut se traduire par une modification importante de l'immuno-réactivité. L'applicabilité des immuno-essais aux produits transformés cibles devra être évaluée. Les résultats empiriques obtenus lors des essais menés pour vérifier l'applicabilité de la méthode aux aliments transformés cibles devront être présentés.

Effet crochet

16. Dans un essai sur plaque avec dispositif de flux latéral fondé sur un anticorps, un effet crochet (saturation) pourrait donner un résultat faux négatif. Il faudra démontrer de façon détaillée que la plage de mesure de concentration couvre largement les besoins pratiques des échantillons analytiques cibles. Les résultats empiriques obtenus par l'essai effectué pour déceler un éventuel effet crochet dans les matrices cibles devront donc être présentés.

Méthode de confirmation

17. Pour les immuno-essais, il peut y avoir réaction croisée entre les anticorps et d'autres protéines présentes dans la matrice; il est donc nécessaire de démontrer la sélectivité des essais. On peut utiliser une autre méthode de confirmation. Les résultats empiriques obtenus par les deux méthodes avec des aliquotes des mêmes échantillons d'analyse de concentration connue peuvent être présentés.

INFORMATION SUR LA PERFORMANCE DE LA MÉTHODE.

Essai de sélectivité

18. La méthode doit préciser clairement l'utilisation de témoins négatifs appropriés, comme le matériau dérivé de plante ou d'animal, les différentes souche ou la séquence de l'ADN cible qui devront être utilisées à cette fin, si elles ont été définies.

19. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode avec l'ADN d'espèces ou de variétés non cibles et l'ADN du matériau de l'espèce ou de la variété de référence devront être présentés. Cet essai devra comprendre des matériaux étroitement apparentés et des cas où les limites de sensibilité sont réellement testées. De plus, il peut être approprié, notamment pour la séquence de l'ADN spécifique du taxon, de tester d'autres sources d'aliments semblables afin de réduire la possibilité d'obtenir un faux positif.

20. De même, pour les méthodes fondées sur les protéines, les résultats obtenus par l'essai de la méthode avec des protéines d'espèces/variétés/caractères non cibles et étroitement pertinents et la protéine cible purifiée et/ou des matériaux témoins positifs de référence devront être présentés.

Essai de stabilité

21. Les résultats empiriques obtenus par l'essai des méthodes (pour détecter les séquences d'ADN de référence et d'ADN cible, ou les protéines) avec des espèces, des sous-espèces, des variétés, des cultivars, des lignées animales ou des souches microbiennes différents, selon qu'il convient, peuvent être fournis afin de montrer, par exemple, la stabilité du nombre de copies et de la conservation de la séquence de l'ADN du gène spécifique du taxon de référence, ou la stabilité de l'expression de la protéine.

22. Pour les méthodes fondées sur les protéines, les résultats obtenus par l'essai des méthodes avec le matériau cible et ses produits dérivés et/ou transformés, selon qu'il convient, devront être présentés afin de démontrer la stabilité de la forme immunoréactive de la protéine.

Essai de sensibilité

23. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode à différentes concentrations afin de tester sa sensibilité devront être fournis. Les limites de détection doivent être définies à l'aide d'échantillons comprenant seulement des ingrédients uniques. Pour les produits alimentaires comprenant des ingrédients multiples, la sensibilité réelle sera réduite, car la totalité de l'ADN extrait sera calculée à partir de plusieurs ingrédients ce qui fait que la quantité initiale du mesurand réel sera diminuée.

24. La limite de détection devra être déterminée pour chaque méthode et chaque matrice, si nécessaire.

Essai de robustesse

25. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode en fonction de variations faibles mais délibérées de paramètres de la méthode devront être fournis.

Efficacité de l'extraction

26. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode pour l'efficacité de son extraction dans chaque matrice devront être présentés pour démontrer que l'extraction est suffisante et reproductible. Pour la détection quantitative, il peut être nécessaire de fournir la méthode de calibrage pour l'extraction incomplète.

APPLICATION PRATIQUE DE LA MÉTHODE

Applicabilité

27. La matrice (par ex., aliment transformé, matières brutes, etc.), le type d'échantillons et la fourchette dans laquelle la méthode peut s'appliquer devront être indiquées. Les limites pertinentes de la méthode devront aussi être traitées (par ex., inférence par d'autres analytes ou inapplicabilité à certaines situations). Les limites peuvent aussi inclure, autant que possible, les éventuelles restrictions dues aux coûts, au matériel ou aux risques spécifiques ou non spécifiques pour l'opérateur et/ou pour l'environnement.

Caractéristiques opérationnelles et possibilité d'application pratique de la méthode

28. Le matériel nécessaire pour l'application de la méthode devra être énoncé clairement, en ce qui concerne l'analyse elle-même et la préparation des échantillons. Des renseignements sur les coûts, les difficultés d'ordre pratique et tout autre facteur qui pourrait être important pour les opérateurs devront aussi être présentés.

Concept expérimental

29. Le concept expérimental, avec des détails sur le nombre d'essais, d'échantillons, de répétitions, de dilutions etc. devra être décrit.

Compétences requises de la part de l'opérateur

30. Une description des compétences pratiques nécessaires pour appliquer comme il convient la méthode proposée devra être fournie.

CONTRÔLES ANALYTIQUES

31. L'utilisation correcte des contrôles durant l'application de la méthode devra, le cas échéant, être indiquée. Les contrôles devront être clairement spécifiés et leur interprétation consignée. Ils peuvent inclure des contrôles positifs ou négatifs, leur contenu détaillé, dans quelle mesure ils doivent être utilisés et l'interprétation des valeurs obtenues.

32. Il faudra indiquer notamment ce qui suit:

- Types de contrôles analytiques utilisés:
 - i. Contrôles positifs et négatifs
 - ii. Contrôle interne le cas échéant (compétitif ou non compétitif)
 - iii. Autres types de contrôle comme contrôle de la matrice (pour confirmer que l'échantillon a été ajouté à la PCR) ou opérations d'extraction.
- Échantillons témoins.
- Matériaux de référence utilisés.

PERFORMANCE DE LA MÉTHODE

33. Les données relatives aux critères mentionnés à la Section 2.2 " Critères généraux des méthodes " devront être fournies, ainsi qu'une évaluation générale indiquant que la méthode est apte au but poursuivi.

ANNEXE II: VALIDATION D'UNE MÉTHODE PCR QUANTITATIVE

INTRODUCTION

1. L'analyse fondée sur l'ADN est en général effectuée par PCR. Cette technique amplifie un segment spécifique d'ADN jusqu'au point où sa quantité peut être mesurée par un instrument (par exemple, par des moyens fluorométriques). Les opérations de transformation des aliments (par exemple, par la chaleur, les enzymes ou le cisaillement mécanique) peuvent entraîner une dégradation ou une réduction de la quantité totale d'ADN. Il sera préférable de concevoir des méthodes permettant d'amplifier des séquences d'ADN spécifiques de la cible ou du taxon relativement courtes.

2. Les déterminations quantitatives sont souvent exprimées en pourcentage d'une séquence d'ADN spécifique de la cible par rapport à une séquence d'ADN spécifique du taxon. Dans un essai quantitatif, cette mesure implique en réalité deux déterminations fondées sur la PCR – celle de la séquence d'ADN spécifique de la cible et celle de la séquence endogène ou spécifique du taxon). Chacune de ces déterminations a ses propres incertitudes, et vraisemblablement des caractéristiques de mesure différentes. Dans la plupart des applications, la séquence d'ADN cible sera présente à de faibles concentrations, et la séquence d'ADN spécifique du taxon sera présente à des concentrations 10 à 1000 fois supérieures. Il est donc important que les deux mesures soient correctement validées. Dans les cas où la mesure est exprimée directement en pourcentage, ces facteurs doivent être pris en compte dans la validation de la méthode. Les résultats peuvent être indiqués dans d'autres unités de mesure comme les nombres de copies.

3. En conséquence, l'analyse de l'ADN, en particulier dans les aliments transformés, cherche à détecter une très petite quantité d'ADN spécifique de la cible, souvent de l'ordre du nanogramme/gramme ou moins. Le résultat d'une analyse PCR quantitative est souvent exprimé en pourcentage comme la quantité relative de l'ADN cible par rapport à la quantité totale d'ADN du taxon de référence/de l'espèce dans une matrice alimentaire spécifique. La matrice alimentaire peut aussi contenir des quantités importantes d'ADN provenant d'un grand nombre d'autres espèces/taxons.

4. La validation des méthodes comporte deux phases. La première est une validation interne de tous les paramètres énoncés ci-dessus à l'exception de la reproductibilité. La seconde est un essai collaboratif, dont le principal produit est une mesure de la répétabilité et de la reproductibilité en même temps que des renseignements détaillés sur la transférabilité des méthodes entre les laboratoires. Il est fortement recommandé d'effectuer un essai collaboratif à petite échelle afin de vérifier la robustesse générale d'une méthode particulière avant de faire la dépense d'un essai à grande échelle. Lorsqu'il s'avère nécessaire d'améliorer une méthode ou sa description, l'essai préalable n'entraîne que des dépenses limitées alors que l'échec d'une validation complète interlaboratoires, dû à une description ambiguë, est très coûteux. Par ailleurs, il convient d'indiquer que l'application d'une méthode déjà validée dans un laboratoire doit inclure les expériences nécessaires pour confirmer que la méthode en question donne les mêmes résultats dans les conditions locales que lors de la validation interlaboratoires. Il importe de noter qu'une méthode devrait être validée en utilisant les conditions dans lesquelles elle sera appliquée.

VALIDATION

5. Un essai de PCR quantitative devrait être validé pour l'utilisation ou l'application prévue. La norme ISO 5725:1996 ou le Protocole harmonisé AOAC/UIPAC ont été élaborés pour les méthodes d'analyse chimique. Ils définissent les procédures requises pour valider une méthode. Il importe de souligner que tous les principes et règles du protocole harmonisé s'appliquent aux méthodes de PCR quantitative

6. Plusieurs paramètres concernant la validation de la performance d'un essai de PCR quantitative seront examinés en détail. Il s'agit du champ d'application, des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), de la justesse, de la fidélité, de la sensibilité et de la robustesse. Les autres facteurs importants sont les critères d'acceptation et l'interprétation des résultats, ainsi que les unités dans lesquelles sont exprimés les résultats.

7. L'interprétation des valeurs en pourcentage fait l'objet d'une discussion scientifique générale. Il est jusqu'ici admis qu'il n'existe pas de relation fiable entre le poids et le nombre de copies en raison de l'incertitude de la corrélation entre le poids des ingrédients et le nombre de molécules d'ADN. Les calculs poids/poids et nombre de copies/nombre de copies sont tous deux acceptables à condition de les mentionner clairement au moment de donner les résultats.

8. Tous les paramètres énumérés ci-après, notamment la sélectivité et la sensibilité, doivent être évalués individuellement pour chacun des essais concernés, y compris les essais PCR spécifiques de la référence et de la cible. L'ordre dans lequel ils sont énumérés ne reflète pas nécessairement leur ordre d'importance.

Applicabilité

9. Les analytes, matrices et concentrations pour lesquels une méthode d'analyse peut être utilisée devraient être indiqués.

10. Il est demandé qu'une méthode d'extraction, indépendamment de la matrice à laquelle elle doit être appliquée, produise de l'ADN dont la quantité, l'intégrité structurale et la pureté sont suffisantes pour permettre une évaluation appropriée de la performance des étapes ultérieures de la méthode à effectuer (par exemple, amplification adéquate de l'ADN durant l'étape PCR).

11. Dans l'analyse PCR en temps réel, les valeurs Ct peuvent être utilisées pour estimer l'efficacité de la PCR. Pour s'en assurer, on peut par exemple établir des séries de dilution de l'ADN matrice et déterminer pour chaque dilution la valeur Ct (Le nombre limite de cycles auquel le signal de fluorescence mesuré traverse une valeur limite définie par l'utilisateur entre les dilutions). Dans l'idéal, lorsque l'efficacité de l'amplification est de 100 pour cent, une double réduction de la quantité d'ADN cible ajoutée à la PCR entraînera une augmentation de la valeur Ct de un. Il s'ensuit que si l'ADN est dilué 10 fois, la différence théorique des Ct entre l'ADN dilué et non dilué devrait être approximativement de 3,32. Ces chiffres sont théoriques et peuvent ne pas être obtenus dans des situations réelles. Des écarts significatifs par rapport à cette relation peuvent indiquer que l'ADN extrait contient des inhibiteurs de PCR, que la solution d'ADN n'est pas homogène ou que la quantité d'ADN est si faible que la variation stochastique de la quantité d'ADN dans les réactions produit des estimations quantitatives non fiables. Cela est aussi le cas pour les réactions PCR en point final effectuées en utilisant des sondes fluorescentes.

Fourchette dynamique – Fourchette de quantification

12. Le champ d'application des méthodes définit la fourchette de concentration dans laquelle l'analyte sera déterminé de façon fiable. La quantité relative d'ADN spécifique du taxon par rapport à l'ADN total dans un extrait d'ADN variera, selon que l'ADN provient d'un ingrédient unique ou d'une matrice alimentaire complexe. Cette fourchette de concentration souhaitée définit les courbes d'étalonnage et un nombre suffisant d'étalons doit être utilisé, le cas échéant par exemple avec des courbes de calibrage, afin de définir de façon adéquate la relation entre la concentration et la réponse. Cette relation devrait être démontrée comme étant continue, reproductible et devrait être linéaire après transformation appropriée.

13. La fourchette d'une méthode quantitative spécifique de la cible est en principe conçue pour se situer entre près de zéro et 100 pour cent concernant l'ADN spécifique du taxon (poids/poids). Il est toutefois courant de valider une méthode pour une fourchette de concentrations correspondant à la portée de l'application. Si une méthode est validée pour une fourchette de valeurs donnée, la fourchette ne peut pas être étendue sans une nouvelle validation. Pour certaines applications (par exemple, l'analyse de grains ou d'aliments), on peut envisager d'utiliser l'ADN génomique pour la préparation de la courbe d'étalonnage (voir plus loin l'examen de l'utilisation de l'ADN plasmidique). S'il est facile d'établir un étalon 100 pour cent nominal, il est difficile de produire de manière fiable des solutions-étalons en dessous de 0,1 pour cent. De plus, le nombre de sites cibles (séquences d'ADN à amplifier) devient si petit que les erreurs stochastiques commenceront à dominer et l'analyse risque d'être moins fiable.

14. L'ADN choisi comme calibrateur doit être retracé (au sens métrologique) jusqu'à une référence d'un ordre métrologique plus élevé, par exemple un matériau de référence certifié. La fourchette sera établie en confirmant que la procédure PCR fournit un degré acceptable de linéarité et de justesse lorsqu'elle est appliquée à des échantillons contenant des quantités d'analyte se situant dans ou aux extrémités de la fourchette spécifiée de la procédure.

15. Les caractéristiques uniques de la PCR quantitative imposent des restrictions particulières sur l'extrémité basse de la fourchette dynamique d'une PCR quantitative. Il est en effet difficile de déterminer les valeurs de la LOD et de la LOQ du fait de la distribution non normale des variances dans les valeurs de cette fourchette.

Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

16. Lorsque la validation d'un essai PCR quantitatif montre que l'essai peut mesurer l'ADN à (par exemple) 0,1 pour cent avec une justesse et une fidélité acceptables, il est souvent inutile de déterminer la LOD et la LOQ, car la méthode n'est appliquée qu'au-dessus de la fourchette où elles sont pertinentes. Toutefois, si la méthode est utilisée à des concentrations proches de la LOD et de la LOQ (en général, entre 0,01 et 0,05 pour cent) l'évaluation de ces limites (LOD et LOQ) doit faire partie de la procédure de validation.

17. Dans la PCR quantitative, la distribution des valeurs de mesure pour les blancs n'est pas gaussienne et suit en général une distribution de Poisson. Si la LOD est nécessaire, elle doit être déterminée expérimentalement. Pour les méthodes quantitatives, la LOD est la quantité d'analyte à laquelle la méthode d'analyse détecte la présence de l'analyte dans au moins 95 pour cent des cas (≤ 5 pour cent de résultats faux négatifs).

18. Pour une méthode quantitative, il importe de savoir si la LOQ pour une matrice particulière est proche des valeurs à mesurer. La LOQ doit être déterminée expérimentalement étant donné que la mesure de la distribution pour la PCR quantitative n'est pas normalement distribuée.

19. Dans la pratique, deux procédures ont été utilisées pour déterminer la LOQ. La première consiste à doser un certain nombre d'échantillons conventionnels auxquels on a ajouté des quantités connues d'analyte. La LOQ est alors la teneur à laquelle la variabilité du résultat est conforme à certains critères préétablis (comme ± 2 écarts-type à partir du point de données d'étalonnage le plus bas, etc.). L'extraction de l'ADN peut toutefois s'avérer difficile pour certaines matrices, par exemple, les amidons ou le ketchup, et il faudra dans certains cas accepter des efficacités d'extraction inférieures. Lorsque ces dernières sont basses, il faudra l'indiquer dans les données de validation et dans le rapport d'analyse. Une procédure plus complète consiste à tester la méthode en utilisant des échantillons qui contiennent des quantités connues d'analyte. Cette procédure est plus compliquée car elle nécessite d'avoir accès à des quantités importantes de matériaux de référence contenant une fourchette connue de concentrations de séquences de l'ADN concerné.

Praticabilité

20. La praticabilité de la méthode doit être évaluée en fonction de paramètres comme: la quantité d'échantillons qui peuvent être traités pendant un temps donné, les coûts fixes estimés pour appliquer la méthode et le coût approximatif par échantillon, les difficultés pratiques rencontrées dans l'utilisation quotidienne ou dans des conditions particulières, ainsi que d'autres facteurs qui peuvent être importants pour les opérateurs.

Écart-type de répétabilité (RSD_r)

21. L'écart-type de répétabilité relatif pour l'étape de la PCR devrait être ≤ 25 pour cent dans toute la fourchette dynamique de la méthode.

Écart-type de reproductibilité (RSD_R)

22. L'écart-type de reproductibilité relatif pour l'étape de la PCR devrait être inférieur à 35 pour cent dans la majorité de la fourchette dynamique, sauf à la limite de quantification où RSD_R pourrait être supérieur.

Robustesse

23. On entend par robustesse la mesure de la capacité d'une méthode analytique de ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées dans les paramètres de la méthode; elle donne une indication de sa fiabilité durant une utilisation normale. On peut citer comme exemple de ces variations: les volumes de réaction (par exemple, 29 vs. 30 μ l), la température d'annelage (par exemple, $\pm 1^\circ\text{C}$) et/ou d'autres

variations pertinentes. Les expériences doivent être effectuées au moins en triplicats. La réponse d'un essai en présence de ces petits changements ne devrait pas s'écarter de plus de ± 35 pour cent dans les expériences de reproductibilité par rapport à la réponse obtenue dans les conditions originales.

24. Le caractère approprié de l'essai de robustesse doit être démontré pour chaque méthode. Par exemple, pour une méthode PCR en temps réel, les facteurs suivants et leur origine / source devraient en principe être pris en compte: différents modèles de thermocycleur, ADN polymérase, uracyl-n-glycosylase, concentration de chlorure de magnésium, concentration directe et inversée de l'amorce, concentration de la sonde, profil de température, profil de la durée, concentrations de dNTP (y compris de dUTP, le cas échéant).

Sensibilité

25. Pour une méthode PCR quantitative, on devrait obtenir dans toute la fourchette de la méthode une fonction linéaire de Ct en tant que fonction du logarithme de la concentration de la cible. Le coefficient de corrélation, le point d'intersection y et la pente de la droite de régression devraient être indiqués. Le pourcentage de résidus pour chacun des calibrateurs devrait de préférence être ≤ 30 pour cent

26. On indiquera, outre les paramètres de la courbe, quelle fourchette des valeurs de la pente est acceptable afin de procéder à la quantification car elle est aussi importante que le calcul de l'efficacité de la réaction. (par exemple, -2,9 à -3,3 pour la détection de l'ADN ou les valeurs optimales correspondantes qui indiquent une efficacité de l'amplification proche de 100 pour cent).

27. Dans les cas où un laboratoire emploie la méthode Δ CT au lieu d'une méthode quantitative reposant sur le calibrage, il appartiendra à l'analyste de garantir que la quantité totale d'ADN se situe bien dans la fourchette pour laquelle l'essai a été validé.

Sélectivité

28. La sélectivité de la méthode devrait être démontrée par des preuves expérimentales. Cette démonstration devrait comprendre l'analyse des échantillons contenant un mélange d'ADN cible et d'ADN non ciblé où les limites de détection (si elles se situent dans la fourchette dynamique) sont réellement vérifiées. Étant donné que la méthode devrait être sélective de l'ADN cible, elle ne devrait donner un résultat positif qu'avec une matrice alimentaire contenant l'ADN cible.

29. Les amorces et les sondes devraient avoir été confrontées aux bases de données des séquences pertinentes pour d'éventuelles homologies avec d'autres séquences pouvant être présentes dans les matrices attendues, conformément à l'utilisation prévue. Après une telle évaluation, la sélectivité doit être démontrée de manière expérimentale.

30. Pour les essais sélectifs de l'ADN cible. Comme preuves expérimentales concernant la spécificité de l'ADN cible, il faudrait notamment:

- Analyser au moins dix échantillons provenant de différents lots d'aliments ou d'ingrédients exempts de séquences d'ADN cible, encore que les échantillons devraient contenir l'ADN spécifique du taxon. Tous ces essais devraient donner un résultat négatif. Par exemple, si l'ADN cible correspond à un événement de transformation d'une plante à ADN recombiné spécifique, des échantillons devraient être tirés d'autres événements de transformation (non-cible), ainsi que de plantes à ADN non recombiné appartenant à la même espèce végétale.
- Tester un nombre approprié d'échantillons d'ADN provenant de chaque source.
- Analyser deux répétitions pour chaque échantillon d'ADN, qui donnera des résultats dans les limites d'une valeur Ct de 0,5.

31. Les résultats des essais devraient indiquer clairement qu'aucun effet de chimie ou de lecture instrumentale n'a été observé.

32. Pour les essais des séquences d'ADN spécifiques du taxon Comme preuves expérimentales concernant la sélectivité du taxon, il faudrait notamment:

- Analyser au moins dix échantillons provenant de différents lots d'aliments ou d'ingrédients issus d'organismes appartenant au taxon concerné, mais classés en différentes catégories de sous-taxons. Tous ces essais devraient donner un résultat positif. Par exemple, si l'on suppose que la spécificité du

taxon correspond à une espèce végétale comme le maïs, les échantillons pourraient correspondre à des variétés de maïs d'origines génétiques différentes.

- Analyser au moins dix échantillons provenant de différents lots d'aliments ou d'ingrédients issus d'organismes appartenant au taxon concerné, qui peuvent être présents dans les matrices alimentaires pertinentes. Tous ces essais devraient donner un résultat négatif. Par exemple (et dans le sillage de l'exemple précédent), si les dix premiers essais étaient appliqués à différentes farines de maïs, dans le second groupe d'essais, il pourrait être approprié d'analyser la farine de blé/soja/riz.
- Tester un nombre approprié d'échantillons d'ADN provenant de chaque source.
- Analyser deux répétitions pour chaque échantillon d'ADN, qui donnera des résultats dans les limites d'une valeur Ct de 0,5.

33. Les résultats des essais indiqueront clairement qu'aucun effet de chimie ou de lecture instrumentale n'a été observé.

Justesse

34. Comme pour toute méthode, la justesse d'une méthode doit être déterminée en comparant les résultats obtenus par l'analyse d'un matériau de référence avec la valeur connue ou assignée du matériau de référence. Il conviendra de prendre en compte l'incidence des effets de la matrice de l'échantillon, en particulier lorsque celle-ci diffère de celle du matériau de référence.

35. Une justesse dont la valeur serait de $\pm 25\%$, pour ce qui concerne l'étape de la PCR, devrait être acceptable dans toute la fourchette dynamique.

RÉFÉRENCES POUR L'ANNEXE II

AOAC (2002). International Methods Committee: Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.

Cankar K, Štebih D, Dreo T, Žel J, Gruden K (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6(37).

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P and Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18(10):1211-1215.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Huebner P, Waiblinger HU, Pietsch K and Brodmann P (2001). Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International* 84(6):1855-1864.

Kay S and Van den Eede G (2001). The limits of GMO detection. *Nature Biotechnology* 19(5):504.

Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli, M and Marmiroli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control.* 21(2):143-149.

ANNEXE III: VALIDATION D'UNE MÉTHODE PCR QUANTITATIVE

Introduction

1. Une méthode PCR qualitative doit être validée autant que possible de la même façon qu'il est prévu de l'utiliser pour les analyses de routine – ce qui signifie qu'il doit être démontré que la sensibilité de la méthode est telle qu'elle permet de détecter de manière fiable un échantillon positif et ne produit pas un nombre important de faux positifs.

2. De par leur nature même, les résultats d'un essai qualitatif font référence à l'identification au-dessus ou au-dessous d'une limite de détection. Comme pour les méthodes quantitatives, la limite de détection d'une méthode qualitative peut être définie comme la concentration à laquelle un échantillon positif donne un résultat positif dans au moins 95 pour cent des cas. Il en découle que le taux de résultats faux négatifs est au plus de 5 pour cent. Ces résultats peuvent aussi s'exprimer en taux ou pourcentage.

Taux de faux positifs

3. C'est la probabilité qu'un échantillon d'essai négatif connu ait été classé comme positif par la méthode. Pour des raisons de commodité, ce taux peut être exprimé en pourcentage:

$$\% \text{ résultats faux positifs} = 100 \times \frac{\text{nombre d'échantillons négatifs connus mal classés}}{\text{nombre total d'échantillons négatifs connus}}$$

Taux de faux négatifs

4. C'est la probabilité qu'un échantillon positif connu ait été classé comme négatif par la méthode. Pour des raisons de commodité, ce taux peut être exprimé en pourcentage :

$$\% \text{ résultats faux négatifs} = 100 \times \frac{\text{nombre d'échantillons positifs connus mal classés}}{\text{nombre total d'échantillons positifs connus}}$$

Note: étant donné que différentes définitions sont utilisées pour les taux de faux positifs et de faux négatifs, le rapport de validation devrait préciser celle qui a été utilisée.

5. Afin de montrer le taux de faux négatifs dans un essai qualitatif, une série d'échantillons avec une concentration connue constante de matériau positif dans un pool de matériaux négatifs doivent être analysés et les résultats évalués. Il importe de noter que le concept d'intervalles de confiance et d'incertitude statistique doit être appliqué au risque de résultats faux positifs et/ou faux négatifs. Le niveau de confiance souhaité détermine la taille et le nombre des pools qui doivent être analysés.

Robustesse

6. Comme pour toute méthode validée, des efforts raisonnables doivent être déployés pour démontrer la robustesse de l'essai. Il s'agit notamment de l'optimisation et de l'analyse minutieuse de l'incidence des petites modifications apportées à la méthode pour des raisons techniques, comme décrit dans l'Annexe concernant la PCR quantitative.

ANNEXE IV: VALIDATION D'UNE MÉTHODE FONDÉE SUR LES PROTÉINES

ESSAI QUANTITATIF

1. La procédure qui est décrite ci-après est seulement l'une des procédures pouvant être employées pour effectuer un essai de détection immunologique des protéines d'intérêt.
2. Par exemple, dans un essai ELISA typique pour détecter les protéines, on mesure la quantité de substance rapporteur issue de la réaction enzymatique. La courbe d'étalonnage est obtenue en reportant la densité optique sur l'axe des y et la concentration des étalons sur l'axe des x, ce qui donne une courbe dose/réponse utilisant une équation quadratique ou un autre modèle de courbe ajustée requis par la méthode. Pour obtenir une valeur quantitative exacte, la densité optique pour les solutions de dosage échantillon doit appartenir à la portion linéaire de la courbe de calibrage. Si la densité optique est trop élevée, la solution de dosage doit être diluée jusqu'à ce que la densité optique tombe dans la fourchette de quantification de l'essai. La concentration de l'analyte protéique dans l'échantillon original est calculée en corrigeant de tout facteur de dilution qui a été introduit en préparant l'échantillon à appliquer sur la microplaque. Le facteur de dilution est calculé en utilisant le poids initial de l'échantillon et le volume du liquide d'extraction, ainsi que les dilutions effectuées ultérieurement.
3. On peut utiliser différents échantillons témoins pour prouver la performance de l'essai. Un échantillon blanc comme un puits vide ou une solution tampon peut être inséré dans l'essai afin de déterminer toute réponse de fond qui sera soustraite des réponses de l'échantillon et du calibrage si on le souhaite. Un échantillon témoin négatif (c'est-à-dire la solution d'extrait de matrice dont on sait qu'elle ne contient pas d'analyte) sera utilisé pour montrer tout effet de matrice ou réponse non spécifique se produisant dans l'essai. Un contrôle positif ou un extrait de matrice auquel a été ajoutée une quantité déterminée d'analyte peut être effectué pour démontrer l'exactitude du test. Les étalons et les échantillons peuvent être soumis à un nombre de répétition approprié pour estimer la fidélité du test. Les blancs, les échantillons témoins négatifs, les échantillons témoins positifs, les matériaux de référence et les répétitions peuvent être passés sur chaque microplaque pour contrôler les variations d'une plaque à l'autre.

MATÉRIAUX DE RÉFÉRENCE

4. Lorsqu'il y a lieu, le matériau de référence comprend la même matrice que l'échantillon cible à analyser. Il comprend en général des échantillons témoins négatifs et des matériaux de référence positifs. Par exemple, si la matrice à tester est de la farine de soja, le matériau de référence positif normalisé sera de la farine de soja contenant une proportion connue de la protéine d'intérêt. Autrement, un échantillon ou un extrait pur de la protéine d'intérêt peut être utilisé à condition que l'utilisation de ces protéines de référence ait été validée pour la matrice en question. Dans certains cas, la matrice de référence n'est pas disponible. L'accès aux matériaux de référence est important durant la mise au point, la validation et l'utilisation des immuno-essais pour l'analyse des protéines dans la matrice alimentaire. Le meilleur matériau de référence disponible devrait être utilisé afin de respecter les règlements et les exigences d'essai.
5. Lorsque des aliments ou des ingrédients alimentaires sont disponibles avec et sans l'analyte, il est très aisé de préparer un échantillon de référence avec une proportion déterminée du matériau cible. Dans d'autres cas, créer des échantillons de référence pour certaines matrices et certains analytes peut s'avérer difficile. La stabilité et l'uniformité sont des éléments importants. Par exemple, si la matrice à tester est formée d'un mélange de matériaux, l'analyste devra associer des matériaux de façon à obtenir un échantillon de référence homogène avec une quantité connue de la protéine. La stabilité de ces matériaux devra être évaluée dans les conditions de stockage et de test.

VALIDATION D'UNE MÉTHODE QUANTITATIVE FONDÉE SUR LES PROTÉINES

6. Les principes de la validation des méthodes décrits dans le protocole harmonisé ISO/UIPAC/AOAC s'appliquent aux méthodes fondées sur les protéines.

7. Les paramètres pour la validation d'une méthode quantitative comprennent: exactitude/justesse, sélectivité, efficacité de l'extraction, sensibilité, fourchette de quantification, fidélité, robustesse, applicabilité et praticabilité.
8. L'exactitude est démontrée en mesurant la récupération de l'analyte à partir des échantillons fortifiés et est exprimée comme étant la récupération moyenne à plusieurs niveaux dans toute la fourchette quantitative.
9. La récupération des protéines d'intérêt devrait être déterminée en comparant les résultats obtenus à partir de l'analyse d'un matériau de référence ayant une valeur connue ou assignée pour ce matériau de référence. On tiendra compte de l'incidence des effets de la matrice de l'échantillon, particulièrement lorsque celle-ci diffère de celle du matériau de référence. Le taux de récupération devrait se situer entre 70 et 120 pour cent.
10. On entend par efficacité de l'extraction la mesure de l'efficacité avec laquelle une méthode d'extraction donnée sépare l'analyte protéique de la matrice. Elle est exprimée en pourcentage de l'analyte récupéré à partir de l'échantillon. L'efficacité de la procédure d'extraction peut être difficile à démontrer. Il peut ne pas y avoir d'autre méthode de détection permettant de comparer les résultats de l'immuno-essai. Une façon de traiter le problème de l'efficacité de l'extraction consiste à démontrer la récupération de l'analyte protéique cible à partir de chaque type de fraction d'aliment par extraction exhaustive, c'est-à-dire en procédant à l'extraction de l'échantillon jusqu'à ce que la protéine ne puisse plus être détectée.
11. La fidélité intra-essai décrit la variation observée dans un essai. Elle peut s'évaluer en déterminant la variation (coefficient de variation exprimé en pourcentage) entre les essais répétés à différentes concentrations sur la courbe d'étalonnage et sur la variation groupée (RSD_r) calculée à partir des valeurs d'absorbance dans les étalons provenant d'essais indépendants effectués des jours différents. La fidélité inter-essai décrit la variation observée entre des essais distincts et peut se mesurer par l'analyse des échantillons de contrôle qualité sur chaque microplaque. Les échantillons de contrôle qualité nécessaires consistent en deux pools d'extraits, un extrait des échantillons contenant l'analyte cible et un autre extrait des échantillons témoins. Si la protéine est stable dans l'extrait, elle sera stockée congelée et une portion sera dégelée et dosée sur chaque microplaque. La fidélité inter-essai peut être évaluée dans le temps et exprimée en tant que coefficient de variation exprimé en pourcentage.
12. L'écart-type de répétabilité relatif (RSD_r) devrait être ≤ 25 pour cent dans toute la fourchette dynamique de la méthode.
13. L'écart-type de reproductibilité relatif (RSD_R) devrait être inférieur à 35 pour cent à la concentration cible et dans la majorité de la fourchette dynamique, sauf à la limite de quantification où il pourrait être supérieur.
14. La linéarité de la dilution permet d'estimer si l'essai peut donner des résultats équivalents indépendamment de la fourchette quantitative de la courbe d'étalonnage que la densité optique de l'échantillon interpole. Pour mener ces expériences, il est conseillé de diluer des échantillons qui sont positifs pour la protéine cible de façon à ce qu'au moins trois des dilutions donnent des valeurs qui occupent toute la fourchette quantitative de la courbe. Le coefficient de variation des résultats ajustés provenant de plusieurs dilutions d'un extrait d'échantillon unique devrait en théorie être $\leq 20\%$.

Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

15. Il convient de noter que si la LOD ou la LOQ sont établies à des niveaux très inférieurs à la fourchette dans laquelle la méthode devra être utilisée, il n'est pas nécessaire de procéder à une détermination précise. Cela serait le cas, par exemple, lorsque la LOD est de 1 ng/kg, alors que la fourchette de la validation de la méthode ne s'étend que pour des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g}/\text{kg}$.
16. Il est courant lorsqu'on estime la LOD de supposer qu'elle est la force du signal d'un blanc augmentée de trois fois l'écart-type du blanc. Cette méthode donne au mieux une estimation, et s'appuie sur une distribution gaussienne normale des mesures du blanc autour de zéro. Cette hypothèse convient en général pour des méthodes comme ELISA, mais la meilleure détermination de la LOD s'obtient de façon expérimentale. Autrement, la LOD est couramment définie comme une concentration égale à l'étalon le plus faible utilisé dans l'essai, si une valeur positive est constamment obtenue avec cet étalon.

17. Pour une méthode quantitative, il importe de savoir si la LOQ pour une matrice particulière est proche des valeurs à mesurer.

Réactivité croisée

18. On entend par réactivité la mesure dans laquelle des analogues ou d'autres molécules peuvent se lier aux anticorps de détection; elle devrait donc être caractérisée et décrite dans la méthode. L'absence de réactivité croisée devrait être contrôlée à l'aide de résultats expérimentaux obtenus en testant la méthode avec des protéines ou des molécules provenant de taxons non cibles et étroitement apparentées, et des protéines cibles purifiées ou des matériaux de référence et témoins positifs pour le contrôle. Le potentiel d'interférences des réactifs et du matériel de laboratoire peut être évalué en dosant des extraits de matériau exempt d'analyte.

Effets de matrice

19. Si la réponse de la méthode est modifiée par une substance dans l'extrait final autre que l'analyte protéique spécifique, la réponse non spécifique est appelée un effet de matrice. Une façon de gérer les effets de matrice consiste à démontrer que la méthode d'analyse donne des résultats identiques avec ou sans la présence de la matrice échantillon dans l'extrait. Avec cette procédure, l'absence d'effets de matrice devrait être démontrée dans toutes les matrices pour lesquelles l'essai doit être utilisé. Une autre procédure (même si elle est moins souhaitable) pour gérer les effets de matrice consiste à préparer les solutions-étalons dans des extraits provenant de matrice exempte d'analyte. On pourrait ainsi garantir que les effets de matrice sont constants entre les étalons et les échantillons.

Robustesse

20. On entend par robustesse la mesure de la capacité d'une méthode analytique de ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées dans les paramètres de la méthode; elle donne une indication de sa fiabilité durant une utilisation normale. On peut citer comme exemple de ces variations: les volumes de réaction, la température d'incubation (par exemple, +/- 1°C pour les incubations en four et +/- 4°C pour les incubations à température ambiante) et/ou d'autres variations pertinentes. Les expériences doivent être effectuées au moins en triplicat et la récupération doit être calculée. La réponse d'un essai en présence de ces petits changements ne devrait pas s'écarter de plus de ± 30 pour cent par rapport à la réponse obtenue dans les conditions originales.

ESSAI QUALITATIF

21. Les dispositifs de flux latéral sont des instruments utiles pour les tests sur place ou sur le terrain. D'autres essais immunologiques comme les méthodes classiques ELISA peuvent aussi être utilisés pour les essais qualitatifs. Afin de garantir des résultats fiables, les essais devraient être validés, et la description des caractéristiques de performance devrait inclure la sensibilité, la sélectivité, l'applicabilité, la limite de détection, la robustesse, les effets de matrice et, le cas échéant, l'effet crochet.

VALIDATION D'UNE MÉTHODE QUALITATIVE FONDÉE SUR LES PROTÉINES

22. Les mêmes principes s'appliquent aux essais qualitatifs fondés sur les protéines et aux essais de PCR qualitative. Ces procédures, y compris le calcul des taux de faux positifs et de faux négatifs, peuvent donc s'appliquer aux méthodes fondées sur les protéines. En général, compte tenu de la plus grande fiabilité des méthodes en flux latéral et bande fondées sur les protéines, les tests ne sont pas répétés sur chaque échantillon. En revanche, si un test ELISA est effectué (étant de type quantitatif), il faut utiliser des puits doubles.

Applicabilité

23. Les analytes, matrices et concentrations pour lesquels une méthode d'analyse peut être utilisée devraient être indiqués.

24. L'extraction des protéines peut être un facteur déterminant dans la performance d'une méthode fondée sur les protéines, et les tampons utilisés peuvent aussi influencer sur la performance au moment de la détection. Une optimisation attentive est donc nécessaire pour garantir que les méthodes de détection des

protéines sont fiables. Les critères applicables pour déterminer la limite de détection (LOD) devraient être établis pour la méthode. Pour confirmer la LOD dans des essais qualitatifs, des niveaux d'enrichissement proches de la LOD peuvent être utilisés, pourvu que l'un des niveaux utilisés réponde au critère selon lequel il doit dépasser la LOD mais en être proche. Si ces procédures peuvent donner une indication de la performance de la méthode, des échantillons prélevés aux caractéristiques bien connues (s'ils sont disponibles) constituent la meilleure matrice à partir de laquelle on pourra établir l'applicabilité d'une méthode.

Praticabilité

25. La praticabilité de la méthode doit être évaluée en fonction de paramètres comme: la quantité d'échantillons qui peuvent être traités pendant un temps donné, les coûts fixes estimés pour appliquer la méthode et le coût approximatif par échantillon, les difficultés pratiques rencontrés dans l'utilisation quotidienne ou dans des conditions particulières, ainsi que d'autres facteurs qui peuvent être importants pour les opérateurs.

RÉFÉRENCES POUR L'ANNEXE IV

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins GR, Lipp M, Shan G, Stave JW and Pantella V. (2006). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *AOAC International* 89:913-928

Guidelines for the Validation and Use of Immunoassays for Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients. Lipton et al., *Food and Agricultural Immunology*, 2000, 12, 153-164.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

ISO 21572:2004. Foodstuffs-Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products-protein based methods. Genève International Organization for Standardization.

Mihaliak CA and Berberich SA (1995). Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration, in: Nelson JO, Karu AE and Wong RB (eds.) *Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies. ACS Symposium Series 586:288-300.*

Stave JW (1999). Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO: future needs. *Food Control* 10:367-374.

Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, Magin KM, Astwood JD, Bhakta NS, Leach JN, Sanders PR and Fuchs RL (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready(R) soybeans. *Food Control* 10(6):407-414.

USDA (2004). U.S. Department of Agriculture/Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration Directive 9181.2. [On line] <http://archive.gipsa.usda.gov/reference-library/directives/9181-2.pdf>.

ANNEXE V : CRITÈRES D'ACCEPTATION DU CONTRÔLE ANALYTIQUE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS POUR DES MÉTHODES DE PCR QUANTITATIVE

1. Au minimum, les critères d'acceptation suivants sont communs à toutes les méthodes de PCR quantitative et applicables à chaque cycle PCR:
 - La moyenne des répétitions du contrôle positif de l'ADN cible, à une concentration pertinente, s'écarte de moins de 3 écarts-types par rapport à la valeur attribuée. Le cas échéant, un contrôle de l'ADN cible est défini comme un ADN de référence ou un ADN extrait d'un matériau de référence certifié ou connu pour être un échantillon positif représentatif de la séquence ou de l'organisme à l'étude. Le contrôle est destiné à démontrer ce que devrait être le résultat des analyses des échantillons d'essai contenant la séquence cible.
 - Le contrôle du réactif d'amplification ne doit pas avoir pour résultat un signal d'amplification supérieur au bruit de fond. Le contrôle du réactif d'amplification est défini comme étant le contrôle contenant tous les réactifs, excepté l'ADN matrice extrait de l'échantillon d'essai. Au lieu de l'ADN matrice, un volume correspondant de réactif exempt d'acide nucléique (comme l'eau ou un tampon) est ajouté à la réaction à la réaction.
2. Pour que le résultat d'un échantillon inconnu soit acceptable, l'écart-type relatif des essais répétés de l'échantillon devrait être ≤ 35 pour cent.