
**Microbiologie des aliments — Réaction
de polymérisation en chaîne (PCR) pour
la détection des micro-organismes
pathogènes dans les aliments —
Exigences relatives à la préparation des
échantillons pour la détection qualitative**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain
reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens —
Requirements for sample preparation for qualitative detection*

[ISO 20837:2006](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20837:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>

© ISO 2006

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 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	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Principe	1
4 Exigences générales de laboratoire	2
5 Réactifs, appareillage et matériel	2
6 Mode opératoire	2
Annexe A (informative) Normes relatives à l'enrichissement des micro-organismes (bactéries)	5
Annexe B (informative) Méthode pour l'extraction d'ADN à partir de bactéries Gram-négatives	6
Bibliographie	8

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20837:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>

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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'ISO 20837 a été élaborée par le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20837:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadb6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>

Introduction

La recherche de micro-organismes pathogènes présents dans les aliments par PCR est généralement réalisée au moyen des étapes successives (ou simultanées) suivantes:

- l'homogénéisation de l'échantillon;
- l'enrichissement (en culture) du micro-organisme pathogène étudié et le traitement de l'échantillon;
- l'extraction des acides nucléiques (facultative);
- l'amplification des acides nucléiques du micro-organisme pathogène étudié;
- la détection de l'ADN amplifié dans le micro-organisme pathogène étudié.

L'Annexe A indique les références de Normes internationales relatives à l'enrichissement de certaines bactéries dans des matrices alimentaires. L'Annexe B fournit un exemple d'une méthode spécifique de préparation des échantillons.

La présente Norme internationale fait partie d'une série de normes et d'une Spécification technique réunies sous le titre générique *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments*.

- *Exigences générales et définitions* (ISO 22174);
- *Exigences relatives à la préparation des échantillons pour la détection qualitative* (ISO 20837);
- *Critères de performances pour les thermocycleurs* (ISO/TS 20836);
- *Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour des méthodes qualitatives* (ISO 20838).

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) attire l'attention sur le fait qu'il est déclaré que la conformité avec les dispositions du présent document peut impliquer l'utilisation d'un ou plusieurs brevets intéressant la technologie PCR.

L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à la portée de ces droits de propriété.

L'ISO a été informé que les sociétés Applied Biosystems, Roche Molecular Systems Inc., et F. Hoffmann-La Roche Ltd., détiennent des droits de propriété concernant la technologie PCR. Les sociétés précitées ont donné l'assurance à l'ISO qu'ils consentent à négocier des licences avec des demandeurs du monde entier, à des termes et conditions raisonnables et non discriminatoires. À ce propos, la déclaration des détenteurs de ces droits de propriété est enregistrée à l'ISO. Des informations peuvent être demandées à:

Licensing Department
Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
États-Unis

et

Roche Molecular Systems, Inc.
Licensing Department
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
États-Unis

L'attention est d'autre part attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété autres que ceux qui ont été mentionnés ci-dessus. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de l'identification de ces droits de propriété en tout ou partie.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20837:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/41aadba6-78b3-43f1-a69e-2f8c01c9d619/iso-20837-2006>

Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences relatives à la préparation des échantillons pour la détection qualitative

AVERTISSEMENT — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer l'intervention de produits, d'opérations et d'équipements à caractère dangereux. La présente norme n'a pas la prétention d'aborder tous les problèmes de sécurité concernés par son usage. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente norme d'établir des règles de sécurité et d'hygiène appropriées et de déterminer l'application des restrictions réglementaires avant utilisation.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale fournit des critères et des exemples de préparation d'échantillons permettant d'obtenir des échantillons compatibles avec la méthode PCR ou des acides nucléiques de qualité appropriée et en quantité suffisante pour la méthode PCR.

Elle contient une description des principes généraux mis en œuvre. Les références de normes relatives à l'enrichissement de micro-organismes sont données dans l'Annexe A et une méthode détaillée d'extraction de l'ADN est donnée dans l'Annexe B.

La présente Norme internationale a été élaborée pour des matrices alimentaires mais pourrait également être appliquée à des aliments pour animaux et à des matrices agricoles/environnementales avec quelques adaptations, si nécessaire.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 22174:2005, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions*

3 Principe

3.1 Généralités

Les méthodes de préparation des échantillons visent à obtenir des échantillons compatibles avec la méthode PCR ou des acides nucléiques de qualité appropriée et en quantité suffisante pour la méthode PCR.

NOTE La qualité des acides nucléiques dépend, par exemple, de la pureté chimique, de la longueur moyenne des molécules et de l'intégrité structurale des molécules d'acide nucléique extraites.

Il convient que l'enrichissement et le traitement de l'échantillon permettent de détecter les faibles concentrations en micro-organismes cibles et de réduire les substances inhibant la PCR. Il convient d'employer les modes opératoires physiques, chimiques ou biochimiques les moins destructifs possible pour l'intégrité de l'acide nucléique permettant ainsi de rendre l'échantillon ou la solution d'acides nucléiques compatible avec une amplification par PCR.

3.2 Enrichissement et traitement de l'échantillon

Le traitement de l'échantillon peut être effectué directement sur l'échantillon ou après enrichissement de la manière décrite dans les normes répertoriées dans l'Annexe A ou dans d'autres normes appropriées.

3.3 Extraction de l'acide nucléique

L'extraction de l'acide nucléique repose essentiellement sur la libération de l'ADN présent dans les bactéries et sur l'élimination ultérieure ou simultanée des inhibiteurs de PCR.

L'Annexe B fournit un exemple d'une méthode d'extraction/purification de l'ADN. Cette méthode est donnée uniquement à titre d'exemple et il convient que les utilisateurs la modifient afin de l'adapter aux besoins de chaque laboratoire.

4 Exigences générales de laboratoire

Il convient que le traitement de l'échantillon soit réalisé dans des zones/pièces de travail séparées, conformément au 6.3 de l'ISO 22174:2005.

5 Réactifs, appareillage et matériel

Voir les Annexes A et B de la présente Norme internationale ainsi que l'ISO 22174:2005.

6 Mode opératoire

6.1 Enrichissement et traitement de l'échantillon relatif aux bactéries

Il convient que les échantillons d'aliments soient enrichis conformément aux Normes internationales correspondantes ou à d'autres normes appropriées. Il est possible d'utiliser d'autres milieux d'enrichissement estimés plus adaptés à la méthode PCR, dans la mesure où il a été prouvé, par le biais d'une validation, que leurs performances sont au moins comparables à celles décrites dans des Normes internationales.

Certains milieux d'enrichissement recommandés dans les Normes internationales contiennent moins de substances inhibant la PCR que les autres, ce à quoi il convient d'attacher une attention particulière lors du choix de la méthode de préparation de l'échantillon.

Pour certains produits, il convient de veiller au blocage de la croissance de micro-organismes de fond concurrents, par exemple en ajoutant des produits chimiques ou des antibiotiques sélectifs.

Il est possible d'essayer des méthodes moins destructives, telles que la dilution, la centrifugation, la digestion protéique, la filtration, la centrifugation en gradient de densité, la séparation immunomagnétique, etc. En cas d'absence de réponse de la PCR, il est possible d'essayer des méthodes plus sévères, telles que l'ébullition, l'utilisation de chélateurs ou de produits chimiques corrosifs comme le chloroforme et l'éthanol ou encore des kits ayant des effets similaires. Des traitements physiques simples peuvent être utilisés pour réduire la teneur en matières grasses des échantillons dans lesquels cette teneur est élevée. Les chélateurs peuvent être utilisés pour réduire la forte teneur en calcium des produits laitiers, qui peut avoir un effet inhibiteur.

6.2 Extraction de l'acide nucléique

6.2.1 Extraction de l'ADN

6.2.1.1 Libération et purification de l'ADN

Plusieurs principes d'extraction de l'ADN peuvent être combinés. Il est possible par exemple d'effectuer les opérations suivantes:

- a) dégrader les protéines présentes dans les cellules extraites avec des protéases (par exemple la protéinase K) et l'ARN avec des ribonucléases;
- b) précipiter les peptides obtenus à l'aide de solvants organiques (par exemple un mélange de phénol et de chloroforme) afin de laisser l'ADN dans la phase aqueuse;
- c) purifier la solution d'ADN et en augmenter la concentration à l'aide d'une précipitation à l'éthanol en présence de cations monovalents;
- d) recueillir l'ADN précipité par centrifugation;
- e) rincer l'ADN avec de l'éthanol et le remettre en suspension dans le tampon, par exemple le tampon de tris(hydroxyméthyl)aminométhane/EDTA (tampon Tris EDTA) ou le tampon Tris.

Il est possible d'utiliser un coprécipitant de l'ADN tel que le glycogène, le glycol polyéthylénique (PEG) ou l'ARNt de transfert dans le but d'améliorer la récupération de l'ADN pendant les étapes de précipitation. Utiliser uniquement des coprécipitants ne présentant aucune activité de nucléase, exempts d'inhibiteurs/de concurrents de PCR et n'ayant aucune homologie de séquence avec la cible potentielle de la PCR étudiée.

NOTE L'utilisation d'évaporateurs concentrateurs pour le séchage des culots d'ADN obtenus à l'issue de l'étape de précipitation peut entraîner une contamination croisée.

L'ADN peut être libéré par dissociation thermique de la cellule, par exemple au moyen d'une ébullition de 10 min. Après l'ébullition, l'échantillon glacé est centrifugé et le surnageant est utilisé pour la méthode PCR. Afin de faciliter la dissociation de la cellule, il est possible, avant l'ébullition, d'effectuer un traitement enzymatique (avec, par exemple, du lysozyme, de la mutanolysine, pour utilisation avec des bactéries Gram positives) suivi d'une incubation avec des protéases ou des protéinases. D'autres méthodes telles l'agitation vigoureuse avec des billes peuvent s'avérer nécessaires lorsque l'organisme possède une paroi de cellule particulièrement dure (*Mycobacterium* spp. par exemple).

Toute autre méthode, y compris des kits disponibles dans le commerce, peut être utilisée pour l'extraction de l'acide nucléique à condition que les résultats soient au moins comparables.

6.2.1.2 Qualité et quantité d'ADN

Il convient que la qualité et le rendement de l'ADN extrait selon une méthode donnée à partir d'une matrice donnée soient répétables et reproductibles en termes d'amplification par PCR, dans la mesure où la matrice contient suffisamment d'ADN. En particulier, la méthode utilisée doit permettre la récupération de fragments d'ADN dont la taille moyenne est égale ou supérieure aux produits PCR analysés.

La concentration et la pureté de l'ADN isolé peuvent être déterminées selon des méthodes fluorimétriques ou par électrophorèse sur gel. L'ADN purifié peut être déterminé selon des méthodes spectrophométriques.

L'électrophorèse sur gel d'agarose suivie d'une coloration au bromure d'éthidium fluorescente sous rayonnement ultraviolet (UV) permet d'estimer rapidement le dosage et la qualité de l'ADN (voir Référence [1]).

Certaines méthodes de préparation de l'échantillon, comme l'ébullition, nécessitent d'utiliser la solution d'acide nucléique directement après la préparation, quand les acides nucléiques libérés sont instables.