
**Microbiologie des aliments — Méthode
basée sur la réaction de polymérisation
en chaîne (PCR) en temps réel pour
la détection des micro-organismes
pathogènes dans les aliments —
Méthode horizontale pour la détection
des *Escherichia coli* producteurs de
Shigatoxines (STEC) et la détermination
des sérogroupes O157, O111, O26, O103
et O145**

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35719694-adeb-4b5b-bcff-10d8b8c8-883e-483a-b83e-883a883a883a>

Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO/TS 13136:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35719694-adeb-4b5b-bcff-1c9e80ce04d9/iso-ts-13136-2012>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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	2
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
4.1 Généralités	2
4.2 Enrichissement microbien	3
4.3 Extraction des acides nucléiques	3
4.4 Gènes cibles	3
4.5 Détection	3
4.6 Isolement	4
5 Diluants, milieux de culture et réactifs	4
5.1 Milieux de culture	4
5.2 Réactifs pour l'extraction des acides nucléiques	5
5.3 Réactifs pour la PCR	5
6 Appareillage	6
7 Échantillonnage	6
8 Préparation de l'échantillon pour essai	6
9 Mode opératoire	6
9.1 Prise d'essai et suspension mère	6
9.2 Enrichissement	7
9.3 Extraction des acides nucléiques	7
9.4 Amplification par PCR (pour la PCR en temps réel)	7
9.5 Isolement de souches	8
10 Expression des résultats	8
11 Données de performances	9
Annexe A (normative) Schéma du mode opératoire de criblage	13
Annexe B (normative) Schéma du mode opératoire d'isolement et de confirmation	14
Annexe C (informative) Identification des <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shigatoxines (STEC) par amplification PCR multiplex des gènes de virulence et détection des amplicons par électrophorèse en gel d'agarose	15
Annexe D (informative) Contrôle interne d'amplification	20
Annexe E (informative) Amorces et sondes pour les réactions PCR	21
Annexe F (normative) Isolement des souches STEC	23
Bibliographie	24

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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO/TS 13136 a été élaborée par le 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).

Introduction

Les *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) sont des bactéries pathogènes à l'origine de diarrhée ou d'affections plus sévères chez l'Homme telles que la colite hémorragique ou le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Bien que les STEC puissent appartenir à un grand nombre de sérogroupes, les souches qui ont été clairement associées aux formes les plus sévères d'affections, comme le SHU, appartiennent aux sérogroupes O157, O26, O111, O103 et O145 (Référence [1]).

La nomenclature suivante a été adoptée dans la présente Spécification technique:

- *stx*: gènes codant une Shigatoxine (synonyme de *vtx*);
- *Stx*: Shigatoxine (synonyme de *Vtx*: Vérocytotoxine);
- STEC: *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (synonyme de VTEC: *Escherichia coli* producteurs de vérocytotoxines).

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 brevet.

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

Le détenteur de ces droits de propriété a donné l'assurance à l'ISO qu'il consent à négocier des licences avec des demandeurs du monde entier, à des termes et conditions raisonnables et non discriminatoires. À ce propos, la déclaration du détenteur des droits de propriété est enregistrée à l'ISO. Des informations peuvent être demandées à:

Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)

10 rue Pierre Curie

F-94700 MAISONS-ALFORT Cedex

France

ISO/TS 13136:2012
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35719694-adeb-4b5b-bcff-1c9e80ce04d9/iso-ts-13136-2012>

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.

L'ISO (www.iso.org/patents) maintient une base de données en ligne des brevets avec leurs documents correspondants. Les utilisateurs sont encouragés à consulter les bases de données pour les informations à jour concernant les brevets.

iTeh STANDARD PREVIEW **(standards.iteh.ai)**

ISO/TS 13136:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35719694-adeb-4b5b-bcff-1c9e80ce04d9/iso-ts-13136-2012>

Microbiologie des aliments — Méthode basée sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Méthode horizontale pour la détection des *Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) et la détermination des sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145

IMPORTANT — Il est nécessaire de considérer toutes les souches STEC comme pathogènes pour l'Homme dans la mesure où toutes peuvent potentiellement être à l'origine d'affections sévères selon le risque associé à la présentation de la denrée alimentaire (prête à être consommée ou bien destinée à être consommée après un traitement technologique comme la pasteurisation, la cuisson, etc., utilisé pour réduire le nombre des bactéries présentes dans la denrée alimentaire) et selon l'état de santé du sujet consommant la denrée alimentaire.

De plus, du fait de la plasticité génomique de cette espèce bactérienne, de nouvelles combinaisons de gènes de virulence peuvent être à l'origine de l'émergence de nouveaux séro-pathovars tels que les *E. coli* entéroaggrégatifs et producteurs de Shigatoxines O104, à l'origine des épidémies de syndrome hémolytique et urémique (SHU) en Allemagne et en France de mai à juin 2011. De nouveaux séro-pathovars d'*E. coli* atypiques peuvent apparaître suite à l'acquisition par une souche d'*E. coli* appartenant à un pathovar autre que les STEC, d'un bactériophage lysogène portant un gène *stx*.

Ces souches atypiques sont couvertes par le domaine d'application de la présente méthode et peuvent être facilement détectées car elles sont positives pour les gènes *stx*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35719694-adeb-4b5b-bcff-1c9e80ce04d9/iso-ts-13136-2012>

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique décrit l'identification d'*Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines (STEC) par détection des gènes suivants:

- les principaux gènes de virulence des STEC, *stx* et *eae* (Références [2][3]);
- les gènes associés aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145 (Références [3][4]).

Dans les deux cas, lorsqu'au moins l'un des gènes *stx* est détecté, un protocole d'isolement de souches est mise en place.

L'isolement d'une souche STEC à partir d'échantillons positifs pour la présence des gènes associés aux sérogroupes couverts par le domaine d'application de la présente méthode peut être facilité par le recours à des techniques d'enrichissement adaptées au séro groupe détecté [par exemple par séparation immunomagnétique (ou IMS pour immunomagnetic separation)].

Le protocole utilise la PCR en temps réel comme technologie de référence pour la détection des gènes de virulence et des gènes associés aux sérogroupes.

La présente Spécification technique s'applique:

- aux produits destinés à être consommés par l'Homme et aux aliments pour animaux;
- aux échantillons environnementaux dans la zone de production et de manipulation des aliments;
- aux échantillons environnementaux dans la zone de production primaire.

2 Références normatives

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

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

ISO 20838, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences relatives à l'amplification et à la détection pour les méthodes qualitatives*

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

Les définitions 3.1 à 3.3 ont été établies à partir des données épidémiologiques relatives aux affections dues aux STEC, recensées par les organismes en charge de ces données comme les centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies [CDC (Centers for Disease Control)] et, en Europe, le Centre européen de prévention et contrôle des maladies [ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)] et l'Autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments [EFSA (European Food Safety Authority)].

- 3.1**
***Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines**
STEC
souches d'*E. coli* possédant un des gènes codant une Stx
- 3.2**
***Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines et provoquant des lésions d'attachement et d'effacement**
STEC provoquant des lésions d'attachement et d'effacement
souches d'*E. coli* possédant un des gènes codant une Stx et le gène *eae* codant l'intimine

NOTE Cette combinaison de gènes de virulence est souvent associée aux formes les plus sévères d'affections dues aux STEC.

- 3.3**
***Escherichia coli* producteurs de Shigatoxines et appartenant aux sérogroupes hautement pathogènes**
STEC appartenant aux sérogroupes hautement pathogènes
souches d'*E. coli* possédant un des gènes codant une Stx et le gène *eae* codant l'intimine et appartenant à l'un des sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145

4 Principe

4.1 Généralités

La méthode spécifiée comprend les étapes consécutives suivantes:

- enrichissement microbien;
- extraction des acides nucléiques;
- détection des gènes de virulence;
- détection des gènes associés aux sérogroupes;
- isolement de souches à partir des échantillons positifs.

La Figure A.1 fournit un schéma du mode opératoire de criblage.

4.2 Enrichissement microbien

Le nombre de bactéries STEC à détecter est augmenté par incubation de la prise d'essai dans l'un des milieux nutritifs liquides non sélectifs suivants:

- bouillon tryptone de soja modifié (TSB supplémenté par 1,5 g/l de sels biliaires n° 3, mTSB) supplémenté par 16 mg/l de novobiocine (mTSB+N);
- eau peptonée tamponnée (BPW);
- bouillon tryptone de soja modifié (TSB supplémenté par 1,5 g/l de sels biliaires n° 3, mTSB) supplémenté par 12 mg/l d'acriflavine (mTSB+A) pour l'analyse du lait et des produits laitiers.

Le mTSB doit être utilisé pour l'analyse des matrices susceptibles de contenir des niveaux élevés de microflore contaminante. La novobiocine et l'acriflavine inhibent la croissance des bactéries à Gram positif et favorisent la croissance des cellules à Gram négatif, dont les STEC. Le BPW doit être utilisé pour analyser les échantillons qui sont supposés contenir des bactéries cibles stressées (tels que des produits surgelés) afin de revivifier les bactéries STEC stressées, ainsi que des niveaux de microflore contaminante présumés inférieurs à ceux d'échantillons frais.

NOTE L'ajout de novobiocine est controversé et a fait l'objet d'études par plusieurs auteurs. Il a été observé que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique des STEC non O157 est inférieure à celle des souches O157 (Référence [5]). L'ajout de novobiocine dans le bouillon d'enrichissement mTSB à la concentration habituelle de 20 mg/l, tel que spécifié dans l'ISO 16654^[19], semble inhiber la croissance d'environ un tiers des souches non O157 (Référence [6]), augmentant ainsi le risque de résultats faux négatifs.

4.3 Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont extraits conformément aux exigences du système de détection choisi.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/35719694-adeb-4b5b-bcff-1c9e80ce04d9/iso-ts-13136-2012>

4.4 Gènes cibles

Les acides nucléiques purifiés sont utilisés pour la détection des gènes cibles suivants:

- les principaux gènes de virulence pour les STEC: les gènes *stx*, codant les Shigatoxines, et le gène *eae*, codant une protéine de 90 kDa, l'intimine, impliquée dans le mécanisme d'adhésion dit d'attachement et d'effacement, caractéristique des souches STEC à l'origine d'affections sévères. Les gènes *stx* codent une famille de toxines comprenant deux principaux types: *stx1* et *stx2*. Le gène *stx2* comprend sept variants connus (de *stx2a* à *stx2g*) (Référence [22]). Il a été démontré que seuls les variants *stx2a*, *stx2b* et *stx2c* sont produits par les souches STEC spécifiées à l'Article 1, et les gènes *stx* correspondants sont par conséquent ciblés dans la présente Spécification technique. Les numéros d'accès GenBank correspondant aux gènes variants *stx2* sont:
 - *stx2a*: X07865
 - *stx2b*: L11078
 - *stx2c*: M59432
- le gène *eae* codant l'intimine
- les gènes *rfbE*(O157), *wbdl*(O111), *wzx*(O26), *ihp1*(O145) et *wzx*(O103), afin d'identifier les sérogroupes correspondants.

4.5 Détection

La détection des gènes cibles est réalisée conformément au système de détection choisi.

4.6 Isolement

Si la présence d'une souche STEC est suspectée, le protocole d'isolement est mis en place. Si l'un des sérogroupes spécifiés dans le domaine d'application de la présente Spécification technique est détecté, un enrichissement adapté au séro groupe détecté (par exemple par séparation immunomagnétique) peut être réalisé puis mis en culture sur un milieu gélosé tryptone-bile-glucuronide (TBX) ou, si possible, sur un milieu sélectif spécifique (voir Annexe F, Notes 2 et 3) de manière à faciliter l'isolement de la souche STEC correspondante de la microflore annexe.

5 Diluants, milieux de culture et réactifs

Au cours de l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée stérile ou de l'eau de pureté équivalente.

5.1 Milieux de culture

5.1.1 Bouillon tryptone de soja modifié (mTSB)

5.1.1.1 Milieu de base

Composition et pH

Hydrolysate enzymatique de caséine	17 g
Hydrolysate enzymatique de soja	3 g
D(+) Glucose	2,5 g
Chlorure de sodium	5 g
Hydrogénophosphate de di-potassium (K_2HPO_4)	4 g
Sels biliaires n° 3	1,5 g
Eau	qsp 1 000 ml
pH 7,4 ± 0,2	

Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu déshydraté dans l'eau. Ajuster le pH avec un pH-mètre, à pH 7,4 ± 0,2 à 25 °C et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

5.1.1.2 Solution de novobiocine

Composition

Novobiocine	0,16 g
Eau	10 ml

Préparation

Dissoudre la novobiocine dans l'eau et stériliser par filtration sur membrane au moyen de filtres de 0,22 µm ou 0,45 µm.

Préparer le jour de l'utilisation.

5.1.1.3 Solution d'acriflavine

Composition

Acriflavine	0,12 g
Eau	10 ml

Préparation

Dissoudre l'acriflavine dans l'eau et stériliser par filtration sur membrane au moyen de filtres de 0,22 µm ou 0,45 µm.
Préparer le jour de l'utilisation.

5.1.1.4 Préparation du milieu complet

Immédiatement avant utilisation, ajouter 1 ml de solution de novobiocine (5.1.1.2) ou d'acriflavine (5.1.1.3) aux 1 000 ml de milieu mTSB refroidi (5.1.1.1).

La concentration finale en novobiocine doit être de 16 mg/l de mTSB.

La concentration finale en acriflavine doit être de 12 mg/l de mTSB.

5.1.2 Eau peptonée tamponnée (BPW)

Composition et pH

Peptone	10 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4)	3,5 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	1,5 g
Eau	qsp 1 000 ml
pH	$7,0 \pm 0,2$

Préparation

Dissoudre les composants ou la poudre déshydratée dans l'eau. Ajuster le pH avec un pH-mètre, à $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ à 25 °C et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

5.2 Réactifs pour l'extraction des acides nucléiques

Les réactifs à utiliser pour l'extraction des acides nucléiques ne sont pas listés, car ils dépendent de la méthode choisie (9.3).

5.3 Réactifs pour la PCR

Voir l'ISO 20838.

5.3.1 Oligonucléotides (amorces) et sondes de détection

Les amorces et sondes utilisées pour la détection spécifique des gènes cibles par PCR conventionnelle et en temps réel sont données à l'Annexe C et à l'Annexe E.

6 Appareillage

Matériel de laboratoire courant de microbiologie (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Bain-marie ou bloc chauffant, pouvant être maintenu à des températures allant jusqu'à 100 °C.

6.2 Incubateur, conforme à l'ISO 7218, pouvant être maintenu à 37 °C ± 1° C.

6.3 Appareillage pour l'extraction des acides nucléiques.

Matériel adapté conformément à la méthode choisie (le cas échéant).

6.4 Pipettes, de capacités comprises entre 1 µl et 100 µl, ISO 7550^[16].

6.5 Microtubes de PCR en temps réel à parois fines (tubes à essai de 0,2 ml/0,5 ml), microplaques PCR multipuits ou autre récipient en plastique à usage unique léger et transparent adapté.

6.6 Thermocycleur. Plusieurs marques d'appareils sont disponibles et la marque utilisée peut être choisie conformément aux règles du laboratoire.

6.7 Appareil pour la détection des produits PCR.

Une émission de lumière suivant la réaction PCR 5'-nucléase est détectée par l'automate de PCR en temps réel.

6.8 Mélangeur péristaltique, avec sacs stériles et éventuellement avec un dispositif de réglage de la vitesse et de la durée.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Spécification technique. Se référer à la Norme internationale spécifique traitant du produit concerné, ou aux réglementations spécifiques. S'il n'existe aucune Norme internationale traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé aux parties concernées de conclure un accord à ce sujet.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, qui n'a pas été endommagé ni modifié pendant le transport ou le stockage.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique traitant du produit concerné. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique, il est recommandé aux parties concernées de conclure un accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai et suspension mère

9.1.1 Généralités

Utiliser la quantité de milieu d'enrichissement nécessaire pour obtenir une dilution finale de 10⁻¹ de la prise d'essai d'origine.