
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Réaction de
polymérisation en chaîne (PCR) pour
la détection de micro-organismes
pathogènes dans les aliments —
Détection des *Yersinia enterocolitica*
et *Yersinia pseudotuberculosis*
pathogènes**

*Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR)
for the detection of food-borne pathogens — Detection of
pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia
pseudotuberculosis**



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 18867:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/518d82a6-4694-4189-86d8-33bc86b39da3/iso-ts-18867-2015>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2015, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principes	2
4.1 Généralités.....	2
4.2 Enrichissement microbien.....	2
4.3 Extraction de l'ADN.....	2
4.4 Amplification et détection.....	2
4.5 Isolement.....	2
5 Réactifs	2
5.1 Généralités.....	2
5.2 Milieux de culture.....	2
5.2.1 Généralités.....	2
5.2.2 Diluant.....	2
5.2.3 Milieux d'enrichissement.....	3
5.2.4 Milieux solides sélectifs.....	4
5.2.5 Solution d'hydroxyde de potassium en solution saline, KOH.....	5
5.3 Extraction de l'ADN.....	5
5.4 Réactifs pour la PCR.....	5
5.5 Amorces et sondes.....	6
6 Appareillage et équipement	6
6.1 Généralités.....	6
6.2 Équipement de préparation des échantillons avant l'enrichissement.....	6
6.3 Équipement pour l'enrichissement microbien.....	6
6.4 Équipement pour l'extraction de l'ADN.....	6
6.5 Équipement pour la PCR en temps réel.....	6
7 Échantillonnage	6
8 Mode opératoire	6
8.1 Préparation de l'échantillon avant l'enrichissement.....	7
8.1.1 Généralités.....	7
8.1.2 Préparation de l'échantillon.....	7
8.2 Enrichissement microbien.....	7
8.2.1 <i>Y. enterocolitica</i> pathogènes.....	7
8.2.2 <i>Y. pseudotuberculosis</i>	7
8.2.3 <i>Y. enterocolitica</i> et <i>Y. pseudotuberculosis</i> pathogènes.....	7
8.3 Isolement de colonies, facultatif.....	7
8.3.1 <i>Y. enterocolitica</i> pathogènes.....	7
8.3.2 <i>Y. pseudotuberculosis</i>	8
8.3.3 Témoins de processus.....	8
8.4 Extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN).....	8
8.5 Amplification PCR.....	8
8.5.1 Généralités.....	8
8.5.2 Témoins de PCR.....	9
8.6 Confirmation du produit PCR.....	9
8.6.1 Généralités.....	9
8.6.2 Interprétation du résultat de PCR.....	9
9 Rapport d'essai	9

Annexe A (normative) Détection par PCR et isolement des *Y. enterocolitica* pathogènes

(voir la Figure A.1).....	10
Annexe B (informative) PCR en temps réel pour la détection des <i>Y. enterocolitica</i>	11
Annexe C (informative) Détection et isolement des <i>Y. pseudotuberculosis</i>	21
Annexe D (informative) Détection simultanée des <i>Y. enterocolitica</i> et des <i>Y. pseudotuberculosis</i> pathogènes par PCR multiplex en temps réel.....	26
Bibliographie.....	29

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 18867:2015](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/518d82a6-4694-4189-86d8-33bc86b39da3/iso-ts-18867-2015>

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sis/518d82a6-4694-4189-86d8-33bc86b39da3/iso-ts-18867-2015).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est le 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).

Introduction

Yersinia enterocolitica et *Yersinia pseudotuberculosis* sont des bactéries pathogènes, agents de zoonoses, responsables au niveau mondial d'une infection d'origine alimentaire (yersiniose) chez l'homme. Les porcs domestiques sont le principal réservoir de *Y. enterocolitica* pathogènes,^[3] tandis que pour *Y. pseudotuberculosis*, un large éventail d'animaux domestiques et sauvages tels que les rongeurs, les cervidés, les oiseaux et divers animaux de ferme servent de réservoirs potentiels.^[4] Certains biotypes de *Y. enterocolitica* sont associés à l'infection humaine. Par contre, toutes les *Y. pseudotuberculosis* sont considérées comme potentiellement pathogènes pour l'homme.^[9]

Le gène *ail* (attachment invasion locus) situé sur l'ADN chromosomique est présent dans tous les bio-(séro) types de *Y. enterocolitica* associés à la maladie et un de ses variants est également présente dans *Y. pseudotuberculosis*.^[8] Le gène *ail* est le gène cible utilisé pour la détection décrite dans la présente Spécification technique, et les couples d'amorces et de sondes mis au point ciblent différents sites du gène *ail* pour les deux pathogènes.^{[7][8][13][14]}

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TS 18867:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/518d82a6-4694-4189-86d8-33bc86b39da3/iso-ts-18867-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/518d82a6-4694-4189-86d8-33bc86b39da3/iso-ts-18867-2015>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Détection des *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis* pathogènes

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique décrit deux méthodes horizontales pour la détection de biosérotypes pathogènes des *Y. enterocolitica* ainsi qu'une méthode pour la détection des *Y. pseudotuberculosis* en faisant appel à des méthodes basées sur la PCR en temps réel. Les méthodes décrites permettent la détection des deux micro-organismes pathogènes par enrichissement et permettent d'isoler des colonies. *Y. pestis*, l'agent responsable de la peste bubonique et pneumonique héberge aussi un variant du gène *ail* et sera détecté par le même ensemble d'amorce et de sonde que *Y. pseudotuberculosis*. Toutefois, *Y. pestis* n'est normalement pas associé aux aliments. La présente Spécification technique est applicable aux produits destinés à la consommation humaine, aux aliments pour animaux et aux échantillons environnementaux.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives 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 (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

ISO 10273, *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche de Yersinia enterocolitica présumées pathogènes*

ISO 20837, *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*

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

ISO 22119, *Microbiologie des aliments — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel pour la détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments — Exigences générales et définitions*

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 22174 et dans l'ISO 22119 s'appliquent.

4 Principes

4.1 Généralités

La méthode comporte plusieurs étapes consécutives:

- a) l'enrichissement microbien (4.2);
- b) l'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) (4.3);
- c) l'amplification et la détection (4.4);
- d) l'isolement (4.5).

4.2 Enrichissement microbien

Le nombre de cellules bactériennes pathogènes de *Y. enterocolitica* et de *Y. pseudotuberculosis* est augmenté en favorisant leur croissance dans un milieu nutritif liquide non sélectif ou semi-sélectif.

4.3 Extraction de l'ADN

Les cellules bactériennes sont séparées du bouillon nutritif, lysées et l'ADN est extrait pour être utilisé dans la réaction de PCR.

4.4 Amplification et détection

L'ADN extrait est amplifiée par PCR en temps réel avec sonde. La séquence cible est détectée en observant une nette augmentation du signal de fluorescence au-dessus du cycle seuil, *Ct*.

NOTE La PCR en temps réel avec sonde combine l'amplification, la détection et la confirmation de l'ADN cible.

ISO/TS 18867:2015
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/518d82a6-4694-4189-86d8-33bc86b39da3/iso-ts-18867-2015>

4.5 Isolement

Après obtention d'un résultat positif par PCR, l'organisme cible peut être isolé en utilisant les méthodes de culture décrites dans la présente Spécification technique.

5 Réactifs

5.1 Généralités

Pour les étapes indiquées en 4.1 b)-c), des réactifs de qualité biologie moléculaire et des consommables adaptés à la biologie moléculaire doivent être utilisés tel qu'indiqué dans l'ISO 20837 et l'ISO 20838.

Les exigences sont spécifiées dans l'ISO 20838.

Il convient d'utiliser les milieux et réactifs suivants.

5.2 Milieux de culture

5.2.1 Généralités

Voir l'ISO 7218 et l'ISO 11133 pour la préparation, la production et les essais de performance des milieux de culture.

5.2.2 Diluant

Voir l'ISO 6887-1 et la partie pertinente de l'ISO 6887 traitant du produit à examiner.

5.2.3 Milieux d'enrichissement

5.2.3.1 Bouillon de tryptone-soja supplémenté en levure, TSBY

5.2.3.1.1 Composition

Digestion pancréatique de caséine	17,0 g
Digestion papaïnique de farine de soja	3,0 g
Chlorure de sodium, (NaCl)	5,0 g
Phosphate dipotassique, (K ₂ HPO ₄)	2,0 g
Glucose	2,5 g
Extrait de levure	6,0 g
Eau	1 000 ml

5.2.3.1.2 Préparation

Dissoudre les ingrédients ci-dessus dans 1 000 ml d'eau distillée. Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,3 \pm 0,2$. Répartir le milieu dans des tubes ou des flacons de capacité adaptée pour obtenir des volumes appropriés pour les échantillons pour essai. Stériliser pendant 15 min à $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

Conserver le milieu dans l'obscurité et à température ambiante pendant une durée maximale de 4 semaines.

En alternative, utiliser un bouillon de tryptone-soja déshydraté (TSB) à 30 g/l supplémenté avec 0,6 % d'extrait de levure, pH $7,3 \pm 0,2$.

5.2.3.2 Bouillon à la peptone, au sorbitol et aux sels biliaries, PSB^[15]

5.2.3.2.1 Composition

Peptone	5,0 g
Sorbitol	10,0 g
Chlorure de sodium, (NaCl)	5,0 g
Hydrogénophosphate de sodium (Na ₂ HPO ₄)	8,23 g
Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	1,2 g
Sels biliaries	1,5 g
Eau	1 000 ml

5.2.3.2.2 Préparation

Dissoudre, dans de l'eau, les composants ou le milieu complet déshydraté, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,6 \pm 0,2$.

Répartir le milieu dans des tubes ou des flacons de capacité adaptée pour obtenir des volumes appropriés pour les échantillons pour essai. Stériliser pendant 15 min à $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

5.2.3.3 Bouillon d'enrichissement au froid, PMB [5]

5.2.3.3.1 Composition

Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4)	7,6 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	1,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	8,5 g
Mannitol	10,0 g
Sels biliaires N° 3	1,5 g
Eau	1 000 ml

5.2.3.3.2 Préparation

Dissoudre, dans de l'eau, les composants ou le milieu complet déshydraté, en chauffant si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,6 \pm 0,2$.

Répartir le milieu dans des tubes ou des flacons de capacité adaptée pour obtenir des volumes appropriés pour les échantillons pour essai. Stériliser pendant 15 min à $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

5.2.4 Milieux solides sélectifs

STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.2.4.1 Gélose à la cefsulodine, à l'Irgasan et à la novobiocine, CIN[10]

5.2.4.1.1 Milieu de base, composition

Digestion enzymatique de gélatine	17,0 g
Digestion enzymatique de caséine et de tissus animaux	3,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Mannitol	20,0 g
Pyruvate de sodium	2,0 g
Chlorure de sodium, (NaCl)	1,0 g
Sulfate de magnésium, ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$)	0,01 g
Désoxycholate de sodium	0,5 g
Rouge neutre	0,03 g
Violet cristallisé	0,001 g
Gélose	12,5 g
Eau	1 000 ml

5.2.4.1.2 Préparation

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu de base déshydraté, en portant à ébullition. Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C . Répartir le milieu dans des fioles de capacité appropriée. Stériliser pendant 15 min à $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

5.2.4.2 Suppléments

5.2.4.2.1 Solution de cefsulodine (15 mg/ml)

Dissoudre 1,5 g de cefsulodine dans 100 ml d'eau. Stériliser par filtration.

5.2.4.2.2 Irgasan™ [5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénol], solution éthanolique (4 mg/ml).

Dissoudre l'Irgasan dans l'éthanol, conserver la solution à environ -20 °C pendant une durée maximale de 4 semaines.

5.2.4.2.3 Solution de novobiocine (2,5 mg/ml)

Dissoudre la novobiocine dans l'eau. Stériliser par filtration.

5.2.4.3 Composition du milieu complet

Milieu de base (5.2.4.1.1)	997 ml
Solution de cefsulodine (5.2.4.2.1)	1 ml
Solution d'Irgasan (5.2.4.2.2)	1 ml
Solution de novobiocine (5.2.4.2.3)	1 ml

5.2.4.4 Préparation

Ajouter stérilement chaque solution antibiotique au milieu de base, refroidi à environ 45 °C, puis mélanger. Couler environ 15 ml de milieu complet dans des boîtes de Petri stériles.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/518d82a6-4694-4189-ISO/TS-18867-2015>

5.2.5 Solution d'hydroxyde de potassium en solution saline, KOH

5.2.5.1 Composition

Hydroxyde de potassium (KOH)	0,25 g/0,50 g
Solution saline	100 ml

NOTE Il est recommandé d'utiliser du KOH à 0,5 % préparé extemporanément pour *Y. enterocolitica* pathogènes et à 0,25 % pour *Y. pseudotuberculosis*.

5.2.5.2 Préparation

Dissoudre l'hydroxyde de potassium dans la solution saline. Répartir la solution dans des fioles de capacité adéquate. Stériliser pendant 15 min à 121 °C ± 1 °C. Préparer la solution la veille de son utilisation.

5.3 Extraction de l'ADN

Un mode opératoire d'extraction de l'ADN ainsi que des réactifs appropriés pour les bactéries à Gram négatif doivent être utilisés.

NOTE Il est également possible d'utiliser des kits disponibles dans le commerce.

5.4 Réactifs pour la PCR

Voir l'ISO 22119 et l'ISO 20838.

5.5 Amorces et sondes

Les amorces et les sondes pour la détection des *Y. enterocolitica* et des *Y. pseudotuberculosis* pathogènes sont listées dans l'[Annexe B](#) et l'[Annexe C](#).

6 Appareillage et équipement

6.1 Généralités

Équipement de microbiologie (voir l'ISO 7218, l'ISO 20837 et l'ISO 22119), en particulier, ce qui suit.

6.2 Équipement de préparation des échantillons avant l'enrichissement

Homogénéisateur péristaltique et sacs stériles avec filtre.

NOTE Il est recommandé d'utiliser un filtre de faible porosité adapté pour la PCR.

6.3 Équipement pour l'enrichissement microbien

Étuves, réglables respectivement à $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ et à $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

6.4 Équipement pour l'extraction de l'ADN

6.4.1 **Micro-tubes à centrifuger**, de capacités de 1,5 ml et 2,0 ml.

6.4.2 **Centrifugeuse**, pour des tubes de réaction d'une capacité de 1,5 ml et 2,0 ml et pouvant atteindre une accélération jusqu'à environ $14\,000 \times g$.

[ISO/TS 18867:2015](#)

6.4.3 **Bloc chauffant thermostaté**, de capacité thermique jusqu'à 100°C .

6.4.4 **Pipettes graduées et cônes à filtres pour pipettes**, pour des volumes compris entre 1 μl et 1 000 μl .

6.4.5 **Agitateur**.

6.5 Équipement pour la PCR en temps réel

6.5.1 **Thermocycleur de PCR en temps réel**.

6.5.2 **Plaques de 96 puits et/ou barrettes de 8 puits**.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Spécification technique. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Mode opératoire

Voir le diagramme à l'[Annexe A](#).