

Troisième édition
2004-06-15

AMENDEMENT 1
2020-03

**Microbiologie des aliments —
Méthode horizontale pour le
dénombrement de *Bacillus cereus*
présomptifs — Technique par
comptage des colonies à 30 degrés C**

**AMENDEMENT 1: Ajout de tests
optionnels**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method
for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* — Colony-count
technique at 30 degrees C*

AMENDMENT 1: Inclusion of optional tests



Numéro de référence
ISO 7932:2004/Amd.1:2020(F)

© ISO 2020

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dec10c7a-065c-4b7e-b501-8c8c246c5c07/iso-7932-2004-amd-1-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Avant-propos

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

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

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

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

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 463, *Microbiologie de la chaîne alimentaire*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dec10c7a-065c-4b7e-b501-8c8c246c5c07/iso-7932-2004-amd-1-2020>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présumptifs — Technique par comptage des colonies à 30 degrés C

AMENDEMENT 1: Ajout de tests optionnels

Dans le Domaine d'application

Désigner la NOTE existante comme NOTE 1 et ajouter la NOTE suivante:

NOTE 2 La diversité au sein du groupe *Bacillus cereus* est importante, avec 7 groupes phylogénétiques^{[21][22]} et un nombre croissant d'espèces.

Après le paragraphe 9.4

Ajouter le nouveau paragraphe 9.5:

9.5 Essais optionnels

9.5.1 Généralités

Tous les essais mentionnés ci-dessous sont optionnels et destinés à des recherches complémentaires (par exemple épidémiologiques) sur les souches isolées du groupe *Bacillus cereus* obtenues en 9.4.1, suivant les modes opératoires décrits aux [Annexes C](#) à F.

Dans cet amendement, le terme «groupe *B. cereus*» est utilisé à la place de «*B. cereus* présumptif», car il est plus précis d'un point de vue scientifique, comme l'explique l'avis scientifique de l'EFSA publié en 2016^[28].

9.5.2 Détection des variants *cytK-1* ou *cytK-2* du gène codant la cytotoxine K

Certaines souches présentes dans les bactéries du groupe *B. cereus* contiennent l'un des deux variants rencontrés pour le gène codant la cytotoxine, *cytK-1* et *cytK-2*. Le gène *cytK-1* étant spécifique de *Bacillus cytotoxicus*,^{[17][22]} il permet d'identifier rapidement *B. cytotoxicus*.^[20] Le mode opératoire de l'[Annexe C](#) décrit une méthode PCR validée qui cible les deux variants du gène *cytK* et, s'ils sont présents, indique laquelle des deux formes est présente. Il permet également d'identifier les isolats de *B. cytotoxicus*.

9.5.3 Détection des souches du groupe *Bacillus cereus* capables de produire du céréulide

Certaines souches présentes dans les bactéries du groupe *B. cereus* sont capables de produire un dodécadepsipeptide thermostable, appelé céréulide. Ce céréulide, lorsqu'il est produit dans les aliments, peut provoquer une intoxication alimentaire avec syndrome émétique.

NOTE La méthode de quantification du céréulide est décrite dans l'ISO 18465^[10].

Le gène *ces* codant une peptide synthétase du céréulide est impliqué dans la synthèse non ribosomique du céréulide^[16]. Le mode opératoire de l'[Annexe D](#) décrit une méthode PCR rapide et validée qui cible le gène *ces*.

9.5.4 Essai de mobilité pour le dépistage de *B. anthracis*

L'essai de mobilité décrit à l'Annexe E permet de dépister les *B. anthracis* présomptifs présents parmi les bactéries isolées du groupe *B. cereus*.

NOTE Cet essai présente toutefois des limites importantes telles qu'indiquées à l'Annexe E (voir E.1 et [Tableau E.1](#)).

9.5.5 Examen au microscope du cristal parasporal de *Bacillus thuringiensis*

L'espèce *B. thuringiensis*, l'une des espèces du groupe *B. cereus*, peut être différenciée des autres espèces de ce groupe par l'examen au microscope de la formation du cristal parasporal.

Le mode opératoire pour l'examen de la formation du cristal parasporal est décrit à l'Annexe F.

Après l'Annexe B

Ajouter ce qui suit sous forme d'[Annexes C, D](#), E et F.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/dec10c7a-065c-4b7e-b501-8c8c246c5c07/iso-7932-2004-amd-1-2020>

Annexe A (informative)

Détection des gènes *cytK-1* ou *cytK-2* des variants de la cytotoxine K par réaction en chaîne par polymérase (PCR) dans les souches du groupe *Bacillus cereus* et identification de *Bacillus cytotoxicus*

A.1 Généralités

Le gène chromosomique *cytK-2* code la cytotoxine K, une entérotoxine présente parmi les souches de *B. cereus sensu stricto* et de *B. thuringiensis*^[22].

La présence du gène *cytK-2* est également mentionnée dans des souches d'autres espèces du groupe *B. cereus*^[29]. Le gène *cytK-1* est un variant du gène *cytK-2* en raison d'un polymorphisme marqué et code une forme plus cytotoxique de la cytotoxine K qui est présente uniquement chez *B. cytotoxicus*^[18].

Cette méthode est applicable aux colonies correctement isolées des souches du groupe *B. cereus*, après une préparation appropriée de l'ADN.

A.2 Principes

A.2.1 Généralités

La méthode comprend les étapes successives suivantes:

- a) extraction de l'acide nucléique;
- b) amplification du gène cible et interprétation.

A.2.2 Extraction de l'acide nucléique

Les cellules bactériennes sont prélevées sur des colonies correctement isolées et l'acide nucléique est extrait pour être utilisé dans la réaction de PCR.

A.2.3 Amplification du gène cible et interprétation

L'acide nucléique extrait est sélectivement amplifié par PCR. La détection des produits PCR est effectuée par électrophorèse sur agarose. L'interprétation est déduite de la présence ou de l'absence de la bande attendue.

A.3 Réactifs

A.3.1 Généralités

Tous les réactifs nécessaires à cette annexe sont des réactifs de qualité biologie moléculaire et les consommables adaptés à la biologie moléculaire. Ils doivent être utilisés conformément aux indications données dans l'ISO 20837^[11] et l'ISO 20838^[12].

A.3.2 Extraction de l'acide nucléique

Le mode opératoire et les réactifs d'extraction de l'acide nucléique utilisés doivent être adaptés aux bactéries à Gram positif.

Des kits du commerce peuvent également être utilisés.

A.3.3 Réactifs pour PCR

Se référer aux normes ISO 22174^[14] et ISO 20838^[12].

A.3.4 Amorces

Les amorces utilisées pour la détection des gènes de la cytotoxine K sont répertoriées dans le [Tableau C.1](#).

Tableau C.1 — Séquences d'oligonucléotides, caractéristiques et amplicons obtenus

Amorce		Séquence (5' - > 3')	Variante du gène	Position sur le gène <i>cytK</i>	Taille de l'amplicon (pb)
CK1F	F	CAA TTC CAG GGG CAA GTG TC	<i>cytK-1</i> Numéro d'accès ^a DQ885233.1	314-333	426
CK1R	R	CCT CGT GCA TCT GTT TCA TGA G		740-719	
CK2F	F	CAA TCC CTG GCG CTA GTG CA	<i>cytK-2</i> Numéro d'accès ^a AJ318876.2	314-333	585
CK2R	R	GTG IAG CCT GGA CGA AGT TGG		899-879	
Légende					
F: sens					
R: antisens					
^a Consulter les séquences nucléotidiques accessibles au public à l'adresse http://www.ncbi.nlm.nih.gov					

A.4 Équipement et consommables

A.4.1 Généralités

Équipement approprié conforme à la méthode et, en particulier, ce qui suit:

A.4.2 Équipement pour l'extraction de l'acide nucléique

C.4.2.1 Tubes pour microcentrifugeuse, d'une capacité de 1,5 ml ou 2,0 ml.

C.4.2.2 Centrifugeuse, pour tubes d'une capacité de 1,5 ml ou 2,0 ml, et capable d'atteindre une accélération d'environ 14 000 *g*.

C.4.2.3 Bloc thermique, pouvant atteindre 100 °C.

C.4.2.4 Pipettes graduées et embouts à filtres pour pipettes, pour des volumes compris entre 1 µl et 1 000 µl.

C.4.2.5 Agitateur.

A.4.3 Équipement pour PCR

C.4.3.1 Thermocycleur.

C.4.3.2 Microtubes de PCR à parois minces, tubes de 0,2 ml ou 0,5 ml, microplaques multipuits pour PCR ou tout autre équipement approprié.

A.4.4 Équipement pour la détection de produits PCR

Voir l'ISO 20838^[12].

A.5 Mode opératoire

A.5.1 Généralités

Voir [Figure C.1](#).

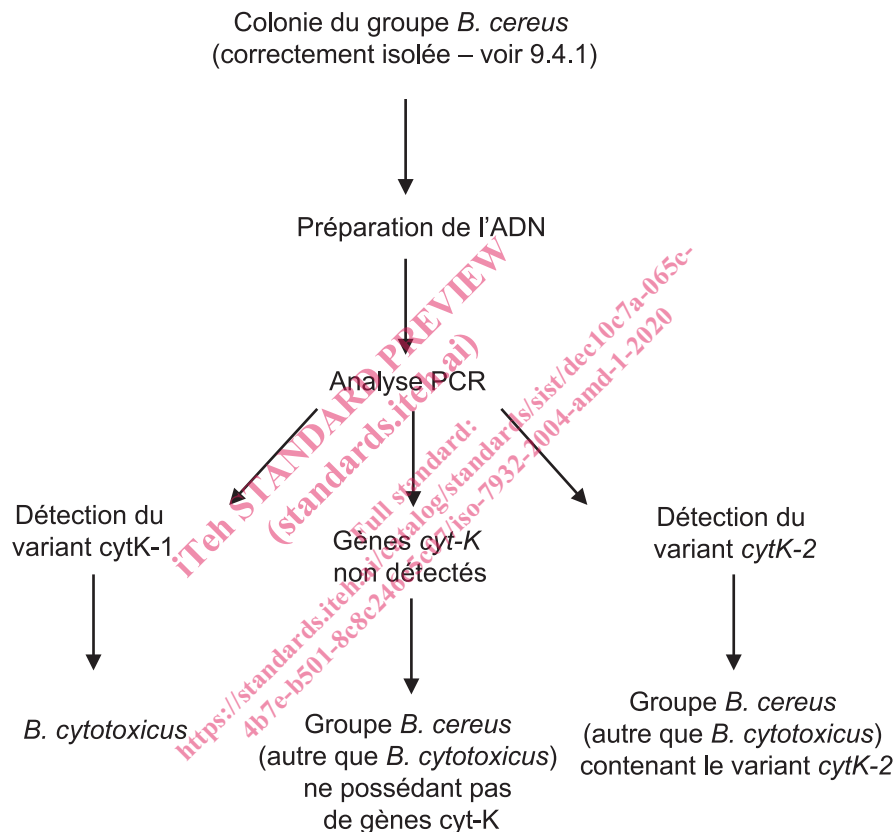


Figure C.1 — Logigramme pour la détection par PCR du gène de la cytotoxine K (variants *cytK-1* ou *cytK-2*) dans les souches du groupe *B. cereus* et l'identification de *B. cytotoxicus*

A.5.2 Extraction de l'acide nucléique

Pour l'extraction de l'ADN, il convient d'utiliser des colonies du groupe *B. cereus* confirmées conformément à 9.4. Facultativement, avant extraction de l'ADN, les colonies peuvent être lavées par centrifugation dans 1 ml d'eau exempte de nucléases. Tout mode opératoire d'extraction de l'acide nucléique applicable aux bactéries à Gram positif et adapté à cette fin peut être utilisé (par exemple, Référence ^[15]).

Une anse de 10 µl de colonie est prélevée (d'une gélose MYP ou d'une gélose non sélective) et mise en suspension dans 1 ml d'eau exempte de nucléases, centrifugée à 11 000 g pendant 15 min. Le culot est remis en suspension dans 500 µl de tampon d'extraction (1,7 g/l de dodécylsulfate de sodium, 200 mmol/l de Tris-HCl (pH 8), 20 mmol/l d'EDTA, 200 mmol/l de NaCl). La suspension est incubée à 55 °C pendant 1 h avec 25 µl de protéinase K (10 µg/µl). L'ADN est extrait avec un volume de phénol puis avec un volume de chloroforme. La phase aqueuse est précipitée avec 2,5 volumes

d'éthanol froid (fraction volumique de 100 %) et centrifugée à 11 000 g pendant 20 min. Le surnageant est jeté et le culot est lavé une fois avec 800 µl d'éthanol froid (fraction volumique de 70 %). Après séchage, le culot est dissous dans 50 µl d'eau exempte de nucléases et conservé à -20 °C. La quantité d'ADN est déterminée par absorbance à 260 nm dans un spectrophotomètre et doit être ajustée à une concentration compatible avec la sensibilité de la PCR (voir C.6.3).

D'autres méthodes ou kits de purification prêts à l'emploi et disponibles dans le commerce peuvent être utilisés si des témoins (voir C.5.3.2) sont soigneusement employés.

A.5.3 Amplification par PCR

A.5.3.1 Généralités

Le volume total de PCR est de 15 µl par réaction. Les réactifs sont répertoriés dans le [Tableau C.2](#). Les concentrations finales en réactifs indiquées dans le tableau se sont révélées appropriées.

Tableau C.2 — Réactifs de PCR

Réactif (concentration)	Concentration finale	Volume par réaction (µl)
Tampon ADN polymérase ^a (10x)	1x	1,5
Mélange de dNTP (5 mmol/l chacun)	0,2 mmol/l chacun	0,6
CK1F (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,375
CK1R (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,375
CK2F (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,375
CK2R (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,375
MgCl ₂ (25 mmol/l)	2,5 mmol/l	1,5
ADN polymérase ^a	0,75 U	0,15
ADN matrice (génomique - 25 ng/µl)		2,5
Compléter au volume à 15 µl avec de l'eau exempte de nucléases		
^a Ce protocole a été validé à l'aide du tampon AmpliTaq®10x et de la polymérase AmpliTaq® ¹⁾ disponibles dans le commerce et du mélange maître contenant les quatre dNTP.		
¹⁾ Le tampon AmpliTaq®10x et la polymérase AmpliTaq® sont des produits fournis par Applied Biosystems, Foster City, CA, États-Unis. Le mélange maître est un produit fourni par Eurogentec. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.		

Différents protocoles d'amplification par PCR peuvent être utilisés, en fonction de l'ADN polymérase et de la technique de préparation de l'ADN utilisées. Cependant, la réaction PCR doit être stringente, réalisée à l'aide des amorces décrites dans le [Tableau C.1](#) avec une température d'hybridation appropriée (voir [Tableau C.4](#)) et les témoins appropriés (voir C.5.3.2), la fiabilité des amorces étant validée avec une température d'hybridation spécifique. Les souches témoins sont répertoriées dans le [Tableau C.3](#).

Tableau C.3 — Souches témoins à inclure dans les essais PCR

Numéro WDCMa (espèce)	<i>cytK-1</i>	<i>cytK-2</i>
WDCM 00218 (<i>Bacillus cereus</i>)	Témoin négatif	Témoin positif
WDCM 00220 (<i>Bacillus cytotoxicus</i>)	Témoin positif	Témoin négatif
WDCM 00222 (<i>Bacillus weihenstephanensis</i>)	Témoin négatif	Témoin négatif
^a Consulter le catalogue des souches de référence disponible sur www.who.int pour avoir des informations sur les numéros de collection des souches de culture et les coordonnées des contacts.		

A.5.3.2 Témoins de PCR

Tous les témoins appropriés indiqués dans l'ISO 22174^[14] doivent être mis en œuvre. Au moins un témoin positif et un témoin négatif, représentés pour chaque variant de gène par un ADN de souche bactérienne négative connu et par un ADN de souche bactérienne positive connu, respectivement, doivent être inclus dans la réaction PCR pour vérifier les conditions d'amplification.

Il convient que l'ADN des témoins positifs (notamment les témoins de processus indiqués dans l'ISO 22174^[14]) soit obtenu selon le même protocole d'extraction de l'ADN que pour les souches d'essai.

A.5.3.3 Programme d'amplification

Le programme d'amplification indiqué dans le [Tableau C.4](#) a été utilisé lors de l'étude d'évaluation.

Tableau C.4 — Programme d'amplification

Dénaturation initiale		94 °C pendant 5 min
Amplification	Dénaturation	94 °C pendant 15 s
	Hybridation	57 °C pendant 30 s
	Élongation	72 °C pendant 30 s
Nombre de cycles		30
Extension finale		72 °C pendant 7 min

A.5.3.4 Détection des produits PCR

Les produits PCR sont détectés après électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %) avec un marqueur de poids moléculaire approprié (voir l'ISO 20838^[12]).

A.5.4 Interprétation du résultat de la PCR

Il convient que le résultat obtenu, y compris les témoins spécifiés ci-dessus (voir C.5.3.2), soit tel qu'indiqué ci-après, à défaut de quoi la PCR doit être répétée.

Le résultat de la PCR sera:

- positif pour le variant *cytK-1*, si un produit PCR spécifique de 426 pb a été détecté et si tous les témoins donnent les résultats attendus; ou
- positif pour le variant *cytK-2*, si un produit PCR spécifique de 585 pb a été détecté et si tous les témoins donnent les résultats attendus; ou
- négatif pour les gènes de la cytotoxine K, si aucun produit PCR spécifique n'a été détecté et si tous les témoins donnent les résultats attendus.

A.5.5 Confirmation du produit PCR

Voir l'ISO 22174^[14].

A.6 Caractéristiques de performance

A.6.1 Généralités

Cette méthode a été évaluée lors d'une étude de validation intralaboratoire. Elle a été soumise à essai sur un total de 160 souches du groupe *B. cereus* et de 10 espèces hors-groupe, en incluant du transfert de Southern ou le séquençage des produits PCR^[23], puis appliquée sur 391 souches^[22]. L'essai s'est avéré très fiable, avec 0 % de faux-négatifs et 0 % de faux-positifs. L'analyse BLASTN^[25] a également montré l'absence d'autre cible que le gène *cytK* parmi les organismes bactériens, pour les quatre amorces