

---

---

**Microbiologie de la chaîne  
alimentaire — Réaction de  
polymérisation en chaîne (PCR)  
pour la détection de micro-  
organismes pathogènes dans les  
aliments — Détection des clostridies  
productrices de neurotoxine  
botulique de type A, B, E et F**

*Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR)  
for the detection of food-borne pathogens — Detection of botulinum  
type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia*



# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)



## DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2013

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  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

# Sommaire

Page

|                                                                                                                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Avant-propos.....                                                                                                                                                                                 | iv        |
| Introduction.....                                                                                                                                                                                 | v         |
| <b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....                                                                                                                                                       | <b>1</b>  |
| <b>2</b> <b>Références normatives</b> .....                                                                                                                                                       | <b>1</b>  |
| <b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....                                                                                                                                                       | <b>1</b>  |
| <b>4</b> <b>Symboles et termes abrégés</b> .....                                                                                                                                                  | <b>2</b>  |
| 4.1    Symboles.....                                                                                                                                                                              | 2         |
| 4.2    Termes abrégés.....                                                                                                                                                                        | 2         |
| <b>5</b> <b>Principes</b> .....                                                                                                                                                                   | <b>2</b>  |
| 5.1    Généralités.....                                                                                                                                                                           | 2         |
| 5.2    Enrichissement microbien.....                                                                                                                                                              | 2         |
| 5.3    Extraction des acides nucléiques.....                                                                                                                                                      | 2         |
| 5.4    Amplification par PCR.....                                                                                                                                                                 | 2         |
| 5.5    Détection des produits PCR.....                                                                                                                                                            | 2         |
| 5.6    Confirmation.....                                                                                                                                                                          | 3         |
| <b>6</b> <b>Réactifs</b> .....                                                                                                                                                                    | <b>3</b>  |
| 6.1    Généralités.....                                                                                                                                                                           | 3         |
| 6.2    Milieux de culture.....                                                                                                                                                                    | 3         |
| 6.3    Extraction des acides nucléiques.....                                                                                                                                                      | 4         |
| 6.4    Réactifs pour la PCR.....                                                                                                                                                                  | 5         |
| <b>7</b> <b>Appareillage et matériel</b> .....                                                                                                                                                    | <b>5</b>  |
| 7.1    Généralités.....                                                                                                                                                                           | 5         |
| 7.2    Matériel pour la préparation des échantillons avant enrichissement.....                                                                                                                    | 5         |
| 7.3    Matériel pour l'enrichissement microbien.....                                                                                                                                              | 6         |
| 7.4    Matériel utilisé pour l'extraction des acides nucléiques.....                                                                                                                              | 6         |
| 7.5    Matériel utilisé pour la PCR.....                                                                                                                                                          | 6         |
| 7.6    Matériel utilisé pour la détection des produits PCR.....                                                                                                                                   | 6         |
| <b>8</b> <b>Échantillonnage</b> .....                                                                                                                                                             | <b>7</b>  |
| <b>9</b> <b>Mode opératoire</b> .....                                                                                                                                                             | <b>7</b>  |
| 9.1    Préparation de l'échantillon avant enrichissement.....                                                                                                                                     | 7         |
| 9.2    Enrichissement microbien.....                                                                                                                                                              | 7         |
| 9.3    Préparation des acides nucléiques.....                                                                                                                                                     | 8         |
| 9.4    Amplification par PCR.....                                                                                                                                                                 | 9         |
| 9.5    Confirmation d'un résultat PCR positif.....                                                                                                                                                | 9         |
| <b>Annexe A (normative) Schéma du mode opératoire</b> .....                                                                                                                                       | <b>11</b> |
| <b>Annexe B (informative) Réactions de PCR multiplex pour la détection de gènes codant les types A, B, E et F de la neurotoxine botulique utilisant une électrophorèse en gel d'agarose</b> ..... | <b>12</b> |
| <b>Annexe C (informative) Essais pour la détection des gènes codant les types A, B, E et F de neurotoxine botulique utilisant la PCR en temps réel</b> .....                                      | <b>30</b> |
| <b>Annexe D (informative) Préparation des spores de <i>C. botulinum</i></b> .....                                                                                                                 | <b>42</b> |
| <b>Bibliographie</b> .....                                                                                                                                                                        | <b>48</b> |

## 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'ISO/TS 17919 a été élaborée par le Comité européen de normalisation (CEN) comité technique CEN/TC 275 *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, 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 clostridies productrices de neurotoxine botulique sont ubiquitaires dans l'environnement. Elles sont à l'origine du botulisme, une affection neuroparalytique sévère due à l'action de neurotoxines botuliques (BoNT). À ce jour, sept sérotypes différents de BoNT (types A à G) ainsi qu'un certain nombre de leurs sous-types ont été identifiés.

Les principales BoNT responsables du botulisme chez l'Homme sont celles du type A (BoNT/A), du type B (BoNT/B), du type E (BoNT/E) et du type F (BoNT/F) et la présente Spécification technique traite des gènes codant ces toxines. Les clostridies productrices de BoNT des types A, B, E et F sont classées en quatre groupes distincts sur le plan physiologique (Groupe I *Clostridium botulinum*, Groupe II *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum*).

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 de brevets.

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, soit gratuites, soit 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:

Applied Biosystems, LLC  
Scott Miller, Legal Department  
5781 Van Allen Way  
CARLSBAD  
CA 92008  
États-Unis

Tel: +1 760 476 4387  
Fax: +1 760 476 6048  
email: Scott.miller@lifetechnologies.com

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/brevets](http://www.iso.org/brevets)) tient à jour des bases de données en ligne des droits de propriété relatifs à ses documents. Les utilisateurs sont invités à consulter les bases de données pour avoir l'information la plus à jour sur les droits de propriété.

# Sample Document

get full document from [standards.iteh.ai](https://standards.iteh.ai)

# Microbiologie de la chaîne alimentaire — Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments — Détection des clostridies productrices de neurotoxine botulique de type A, B, E et F

## 1 Domaine d'application

La présente Spécification technique spécifie une méthode horizontale de détection moléculaire des clostridies portant les gènes A, B, E et F de neurotoxine botulique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette méthode détecte les gènes, et non les toxines. Par conséquent, un résultat positif n'est pas nécessairement synonyme de présence de ces toxines dans l'échantillon examiné. La présente Spécification technique s'applique aux produits destinés à être consommés par l'Homme, aux aliments pour animaux et aux échantillons environnementaux.

La réaction de PCR de détection des séquences génétiques codant ces types particuliers de toxine est décrite dans les [Annexes B](#) et [C](#).

## 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 s'applique (y compris les éventuels amendements).

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

ISO 11133, *Microbiologie des aliments et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

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 20838:2006, *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 donnés dans l'ISO 22174 s'appliquent.

## 4 Symboles et termes abrégés

### 4.1 Symboles

|           |                               |
|-----------|-------------------------------|
| $c$       | concentration de la substance |
| $\rho$    | concentration massique        |
| $\varphi$ | fraction volumique            |
| $w$       | fraction massique             |

### 4.2 Termes abrégés

|      |                                              |
|------|----------------------------------------------|
| BoNT | botulinum neurotoxin (neurotoxine botulique) |
|------|----------------------------------------------|

## 5 Principes

### 5.1 Généralités

La méthode comprend les étapes consécutives suivantes:

- a) enrichissement microbien (voir [5.2](#));
- b) extraction des acides nucléiques (voir [5.3](#));
- c) amplification (voir [5.4](#));
- d) détection des produits PCR (voir [5.5](#));
- e) confirmation (voir [5.6](#)).

NOTE Une PCR en temps réel combine les étapes c) à e).

### 5.2 Enrichissement microbien

Le nombre de clostridies productrices de BoNT (spores ou cellules végétatives) à détecter est augmenté par incubation favorisant leur germination et leur développement dans un milieu nutritif liquide non sélectif, à savoir le bouillon tryptone-peptose-glucose à l'extrait de levure dans des conditions anaérobies.

### 5.3 Extraction des acides nucléiques

Les cellules bactériennes sont séparées du milieu nutritif et sont lysées, puis les acides nucléiques sont extraits afin d'être analysés par PCR.

### 5.4 Amplification par PCR

L'acide nucléique extrait est transféré au mélange PCR et l'amplification est effectuée dans un thermocycleur.

### 5.5 Détection des produits PCR

Les produits PCR sont détectés par électrophorèse en gel ou une autre méthode appropriée.

## 5.6 Confirmation

L'identité des produits PCR doit être confirmée par une méthode appropriée (par exemple séquençage, hybridation ou analyse de restriction).

## 6 Réactifs

### 6.1 Généralités

Pour toutes les étapes 5.1 b) à e), utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et des consommables adaptés aux applications de biologie moléculaire, tel que spécifié dans l'ISO 20837 et l'ISO 20838.

Les exigences relatives aux réactifs spécifiées dans l'ISO 20838:2006, Article 5, s'appliquent.

### 6.2 Milieux de culture

#### 6.2.1 Généralités

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

#### 6.2.2 Diluant

Suivre l'ISO 6887-1 et la partie pertinente de l'ISO 6887[9]-[13] traitant du produit à examiner.

#### 6.2.3 Milieu d'enrichissement non sélectif, bouillon tryptone-peptone-glucose-extrait de levure (bouillon TPGY) (Référence [7])

##### 6.2.3.1 Généralités

Un autre milieu d'enrichissement non sélectif validé peut être utilisé à condition que l'équivalence de ses performances soit démontrée.

##### 6.2.3.2 Composition et pH

|                                                  |              |
|--------------------------------------------------|--------------|
| Tryptone                                         | 50 g         |
| Peptone                                          | 5 g          |
| Extrait de levure                                | 20 g         |
| D-Glucose                                        | 4 g          |
| Thioglycolate de sodium, HSCH <sub>2</sub> COONa | 1 g          |
| Eau                                              | qsp 1 000 ml |
| pH 7,0 ± 0,2                                     |              |

##### 6.2.3.3 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau par ébullition. Après stérilisation, ajuster le pH à 7,0 ± 0,2 à 25 °C. Verser la base dans des fioles ou flacons de capacité appropriée. Stériliser pendant 15 min à 121 °C. Conserver au réfrigérateur à 5 °C ± 3 °C. Jeter tout le milieu qui n'a pas été utilisé dans les 4 semaines suivant la préparation.

## 6.2.4 Bouillon TPGY tamponné — uniquement pour les aliments acides et acidifiants

### 6.2.4.1 Solution mère (tampon phosphate)

#### 6.2.4.1.1 Solution 1

|                                                                                                 |              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{H}_2\text{O}$ ] | 138 g        |
| Eau                                                                                             | qsp 1 000 ml |

#### 6.2.4.1.2 Solution 2

|                                                              |              |
|--------------------------------------------------------------|--------------|
| Hydrogénophosphate de disodium [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ] | 142 g        |
| Eau                                                          | qsp 1 000 ml |

#### 6.2.4.1.3 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau par ébullition. À 250 ml de la solution 1, ajouter la solution 2 jusqu'à ce que le pH atteigne 7,2. Conserver au réfrigérateur à  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

### 6.2.4.2 Préparation du milieu complet

Dissoudre les composants spécifiés pour la base (6.2.3.2) dans 500 ml d'eau par ébullition. Ajouter 100 ml de tampon phosphate (6.2.4.1). La concentration finale en phosphate du milieu complet est de 0,1 mol/l. Ajouter de l'eau pour un volume final de 1 000 ml. Verser le milieu complet dans des fioles ou flacons de capacité appropriée. Stériliser pendant 15 min à  $121\text{ °C}$ . Conserver au réfrigérateur à  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ . Jeter tout le milieu qui n'a pas été utilisé dans les 4 semaines suivant la préparation.

## 6.3 Extraction des acides nucléiques

### 6.3.1 Chloroforme, $\text{CHCl}_3$ .

### 6.3.2 Éthanol, $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 96\text{ %}$ .

### 6.3.3 Acide éthylènediaminetétraacétique, sel disodique ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$ .

### 6.3.4 Bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB), $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$ .

### 6.3.5 Acide chlorhydrique, $\varphi(\text{HCl}) = 37\text{ %}$ .

### 6.3.6 Isopropanol, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ .

### 6.3.7 Protéinase-K, approximativement 20 unités/mg de lyophilisat.

### 6.3.8 Chlorure de sodium, $\text{NaCl}$ .

### 6.3.9 Hydroxyde de sodium, $\text{NaOH}$ .

### 6.3.10 Tris(hydroxyméthyle) aminométhane (tris), $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ .

**6.3.11 Tampon d'extraction au CTAB**,  $\rho(\text{CTAB}) = 20 \text{ g/l}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 1,4 \text{ mol/l}$ ,  $c(\text{tris}) = 0,1 \text{ mol/l}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,02 \text{ mol/l}$ .

Ajuster à pH 8,0 avec HCl ou NaOH.

**6.3.12 Tampon de précipitation au CTAB**,  $\rho(\text{CTAB}) = 5 \text{ g/l}$ ,  $c(\text{NaCl}) = 0,04 \text{ mol/l}$ .

**6.3.13 Solution de chlorure de sodium**,  $c(\text{NaCl}) = 1,2 \text{ mol/l}$ .

**6.3.14 Solution d'éthanol**,  $\varphi(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}) = 70 \text{ \%}$ .

**6.3.15 Solution de protéinase-K**,  $\rho = 20 \text{ mg/ml}$ , dissous dans de l'eau stérile.

Ne pas stériliser à l'autoclave. Conserver à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , mais éviter les décongelations/congelations répétées.

**6.3.16 Tampon tris-EDTA(TE)**,  $c(\text{tris}) = 0,01 \text{ mol/l}$ ,  $c(\text{Na}_2\text{EDTA}) = 0,001 \text{ mol/l}$ .

Ajuster à pH 8,0 avec HCl ou NaOH.

## 6.4 Réactifs pour la PCR

**6.4.1 ADN polymérase thermostable**, comme spécifié dans l'ISO 20838 et l'ISO 22174.

**6.4.2 Désoxynucléotidetriphosphates (dNTP)**, contenant dATP, dCTP, dGTP et dTTP ou dUTP, comme spécifié dans l'ISO 20838 et l'ISO 22174.

**6.4.3 Solution tampon pour la PCR**, comme spécifié dans l'ISO 20838 et l'ISO 22174.

La solution tampon pour la PCR contient habituellement l'ADN polymérase. Elle est susceptible de contenir ou pas du  $\text{MgCl}_2$  dont la concentration est spécifiée par le fabricant. Les teneurs finales en  $\text{MgCl}_2$  dépendent de la méthode et sont, par conséquent, mentionnées dans les annexes. Des réactifs prêts à l'emploi peuvent être disponibles dans le commerce. Si cela est le cas, suivre les instructions d'utilisation du fabricant.

### 6.4.4 Amorces et sondes

Les amorces et les sondes utilisées pour la détection particulière des séquences de gènes de neurotoxines sont répertoriées dans les [Annexes B](#) et [C](#).

## 7 Appareillage et matériel

### 7.1 Généralités

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

### 7.2 Matériel pour la préparation des échantillons avant enrichissement

**7.2.1 Bain-marie**, pouvant être maintenu à  $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**7.2.2 Centrifugeuse**, pour tubes à centrifuger de 50 ml et de 100 ml et avec accélération réglable jusqu'à  $12\,000g$ .

**7.2.3 Filtre à membrane**, filtre de nitrocellulose, taille des pores  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ .

**7.2.4 Tubes à centrifuger**, d'une capacité de 50 ml et de 100 ml.

### **7.3 Matériel pour l'enrichissement microbien**

**7.3.1 Bains-marie**, pouvant être maintenus à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ,  $65\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  et  $100\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**7.3.2 Jarre ou enceinte anaérobie**, pouvant être maintenue à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , conformément à l'ISO 7218.

**7.3.3 Incubateur**, pouvant fonctionner à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**7.3.4 Fioles ou flacons**, de capacité appropriée.

### **7.4 Matériel utilisé pour l'extraction des acides nucléiques**

Matériel approprié conformément à l'ISO 20837 et, en particulier, ce qui suit.

**7.4.1 Tubes pour centrifugeuse**, d'une capacité de 1,5 ml et de 2,0 ml.

**7.4.2 Bloc chauffant**, avec une vitesse d'agitation comprise entre 300 r/min et 1 400 r/min.

**7.4.3 Pipettes graduées et pointes à filtres**, pour des volumes compris entre 1 µl et 1 000 µl.

**7.4.4 Centrifugeuse**, pour des tubes à essai d'une capacité de 1,5 ml et 2,0 ml, par exemple microcentrifugeuse, pouvant atteindre une accélération de 12 000g.

**7.4.5 Mélangeur**, par exemple de type vortex.

### **7.5 Matériel utilisé pour la PCR**

Matériel approprié selon la méthode et, en particulier, ce qui suit.

**7.5.1 Pipettes et pointes à filtres**, d'une capacité comprise entre 1 µl et 1 000 µl.

**7.5.2 Tubes pour centrifugeuse**, d'une capacité de 1,5 ml et 2,0 ml.

**7.5.3 Microtubes de PCR à parois fines** (tubes à essai de 0,2 ml ou de 0,5 ml), microplaques PCR multipuits ou autre matériel adapté.

**7.5.4 Thermocycleur**.

### **7.6 Matériel utilisé pour la détection des produits PCR**

Matériel approprié selon la méthode et, en particulier, ce qui suit.

**7.6.1 PCR par analyse en point final**

**7.6.1.1 Système pour électrophorèse en gel horizontal**.

**7.6.1.2 Alimentation électrique**.

**7.6.1.3 Révélateur à ultraviolets (UV) ou caisson à UV**.

#### 7.6.1.4 Système de documentation de gel.

### 7.6.2 PCR en temps réel

#### 7.6.2.1 Thermocycleur de PCR en temps réel.

#### 7.6.2.2 Logiciel de détection et d'analyse approprié.

## 8 Échantillonnage

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

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou du stockage.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Préparation de l'échantillon avant enrichissement

#### 9.1.1 Généralités

Voir [Figure A.1](#).

Il est recommandé d'analyser au moins 25 g, notamment pour les échantillons de miel. Cependant, si l'approvisionnement est limité, des tailles d'échantillon plus petites peuvent être utilisées.

#### 9.1.2 Préparation de l'échantillon

Préparer et homogénéiser l'échantillon conformément à l'ISO 6887-1 et aux parties de l'ISO 6887[9]-[13] correspondant à la matrice concernée.

#### 9.1.3 Préparation des échantillons de miel

Placer le récipient contenant le miel au bain-marie ([7.2.1](#)) à  $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 30 min pour ramollir le miel. Retourner le récipient plusieurs fois pour mélanger l'échantillon.

Peser  $25\text{ g} \pm 2\text{ g}$  de miel dans un tube de centrifugeuse stérile d'une capacité de 100 ml ([7.2.4](#)) et ajouter au minimum 50 ml d'eau distillée ou déionisée stérile contenant 1 % (fraction volumique) de polysorbate 80, préchauffée à  $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Mélanger jusqu'à obtenir une solution homogène. Centrifuger le mélange à 12 000g ([7.2.2](#)) pendant 30 min. Retirer avec précaution le surnageant et le passer dans un filtre à membrane de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  ([7.2.3](#)). Si le filtre se bouche, filtrer tout surnageant restant à l'aide d'un filtre neuf. Conserver tous les filtres pour les prochaines étapes. Conserver temporairement le sédiment à  $5 \pm 3\text{ °C}$ .

### 9.2 Enrichissement microbien

#### 9.2.1 Inoculation

##### 9.2.1.1 Généralités

Retirer l'oxygène dissous du milieu d'enrichissement ([6.2](#)) par ébullition pendant 10 min à 15 min au bain-marie ([7.3.1](#)).

Si l'échantillon est acide ou acidifiant, le bouillon d'enrichissement doit être préparé conformément à [6.2.4](#).

### 9.2.1.2 Inoculation de la prise d'essai

#### 9.2.1.2.1 Cas de l'analyse des cellules végétatives et des spores

Ajuster la température du milieu d'enrichissement à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  au bain-marie (7.3.1). Transférer la prise d'essai dans le milieu d'enrichissement dégazé de manière à obtenir une dilution finale de  $10^{-1}$ .

#### 9.2.1.2.2 Cas de l'analyse des spores uniquement

Ajuster la température du milieu d'enrichissement à  $65\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  au bain-marie (7.3.1). Transférer la prise d'essai dans le milieu d'enrichissement préchauffé de manière à obtenir une dilution finale de  $10^{-1}$  à  $65\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Après inoculation, maintenir la fiole ou le flacon à  $65\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 10 min supplémentaires, puis refroidir rapidement à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  au bain-marie (7.3.1).

### 9.2.1.3 Inoculation des prises d'essai de miel

Ajuster la température du bouillon d'enrichissement à  $65\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  (7.3.1). Transférer le sédiment (9.1.3) dans une fiole ou un flacon (7.3.4) et le ou les filtres (9.1.3) dans une seconde fiole ou un second flacon (7.3.4), chacun(e) contenant au moins 10 ml du bouillon d'enrichissement chauffé, et dans tous les cas, s'assurer que la quantité de liquide est suffisante pour recouvrir les filtres. Incuber les deux fioles ou flacons à  $65\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 10 min au bain-marie (7.3.1).

NOTE Les échantillons de miel ne sont analysés que pour les spores.

## 9.2.2 Incubation

Incuber en conditions anaérobies (7.3.2) à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Après  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  d'incubation, retirer 1 ml de la culture pour l'analyse PCR et revenir immédiatement en conditions anaérobies.

Si le résultat de la première PCR est négatif, continuer l'incubation dans les mêmes conditions pendant  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$  supplémentaires, puis transférer 1 ml de la culture dans une fiole ou un flacon (7.3.4) contenant 9 ml de bouillon d'enrichissement (6.2.3). Incuber en conditions anaérobies (7.3.2) à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$  et procéder à une deuxième analyse PCR.

## 9.2.3 Témoins de processus

Les témoins de processus positifs et négatifs doivent être inclus conformément à l'ISO 22174.

Un exemple de méthode de préparation des spores est donné dans l'Annexe D.

## 9.3 Préparation des acides nucléiques

### 9.3.1 Généralités

Un mode opératoire d'extraction des acides nucléiques approprié pour les bactéries à Gram positif doit être utilisé.

Un exemple de mode opératoire est donné en 9.3.2 à 9.3.4. Ce mode opératoire comprend une étape de lyse — lyse thermique en présence de CTAB — suivie de plusieurs étapes d'extraction visant à éliminer les inhibiteurs, tels que les polysaccharides et les protéines.

Une fois la prise d'essai de la matrice préparée, appliquer le protocole d'extraction et de purification de l'ADN spécifié en 9.3.2 à 9.3.4.

Il est nécessaire d'adapter les masses et les volumes de tampon proportionnellement à la taille sélectionnée de la prise d'essai.

### 9.3.2 Extraction de l'échantillon

Transférer 1 000 µl de la culture (9.2.2) dans un tube de microcentrifugeuse (7.4.1). Centrifuger (7.4.4) pendant 5 min à environ 12 000g. Jeter la phase supérieure (aqueuse).

Ajouter au culot 500 µl de tampon d'extraction au CTAB (6.3.11) préchauffé (65 °C) et mélanger doucement jusqu'à ce que le culot soit lysé. Incuber pendant 30 min à 65 °C, sous agitation (7.4.2). Ajouter 20 µl de solution de protéinase-K (6.3.7), agiter doucement le tube et incuber pendant 30 min à 65 °C, sous agitation (7.4.2). Centrifuger pendant 10 min à environ 12 000g. Transvaser le surnageant dans un nouveau tube, ajouter 0,7 à 1 volume de chloroforme (6.3.1) et mélanger vigoureusement.

Centrifuger pendant 15 min à environ 12 000g. Transvaser la phase supérieure (aqueuse) dans un nouveau tube.

### 9.3.3 Précipitation au CTAB

Ajouter 2 volumes du tampon de précipitation au CTAB (6.3.12). Incuber pendant 60 min à température ambiante sans agitation. Centrifuger pendant 15 min à 12 000 g. Jeter le surnageant. Dissoudre l'ADN précipité en ajoutant 350 µl de solution de NaCl (6.3.13). Ajouter 350 µl de chloroforme (6.3.1) et mélanger vigoureusement. Centrifuger pendant 10 min à 12 000 g. Transvaser la phase aqueuse dans un nouveau tube.

NOTE La précipitation au CTAB n'est pas nécessaire pour toutes les matrices, seulement pour les matrices riches en protéines et en polysaccharides. Une purification sur phase solide de l'ADN (par exemple en utilisant des colonnes de séparation) est également possible à la condition que les résultats soient équivalents.

### 9.3.4 Précipitation de l'ADN

Ajouter 0,6 volume d'isopropanol (6.3.6), mélanger doucement en retournant le tube et laisser le tube à température ambiante pendant 20 min. Centrifuger pendant 15 min à 12 000g. Éliminer le surnageant. Ajouter 500 µl de solution d'éthanol (6.3.14) dans le tube et le retourner plusieurs fois. Cette étape est essentielle car elle permet de garantir le retrait total du CTAB. Centrifuger pendant 10 min à 12 000g. Éliminer le surnageant. Sécher le culot d'ADN et le dissoudre à nouveau dans 100 µl d'un tampon approprié, par exemple, tampon TE (6.3.16). Il s'agit de la solution mère maître d'ADN. L'ADN peut être conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

## 9.4 Amplification par PCR

Différents modes opératoires d'amplification par PCR peuvent être utilisés. La détection du produit de PCR peut être effectuée soit sur gel, soit par détection du signal de fluorescence.

Toutes les exigences concernant l'amplification par PCR sont spécifiées dans l'ISO 20838.

Des exemples de méthodes de PCR par analyse en point final sont décrits dans l'Annexe B et des exemples de méthodes de PCR par analyse en temps réel dans l'Annexe C.

### 9.4.1 Témoins PCR

Les témoins de PCR doivent être conformes à l'ISO 22174.

### 9.4.2 Détection des produits PCR

Différents modes opératoires de détection des produits PCR peuvent être utilisés. Des exemples pour les méthodes de PCR par analyse en point final sont décrits dans l'Annexe B et des exemples pour les méthodes de PCR en temps réel dans l'Annexe C.

## 9.5 Confirmation d'un résultat PCR positif

Suivre le mode opératoire spécifié dans l'ISO 20838.