



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

**DÉTECTION DES ENTÉROTOXINES PRODUITES PAR LE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
DANS LES ALIMENTS**

[MÉTHODE DE DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE (ELISA) AU MOYEN DE LA TROUSSE TECRA]

M. Akhtar

**Division de la recherche microbiologique
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments
Repère postal : 2204A2
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

1. APPLICATION

La présente méthode est conçue pour la détection directe de n'importe laquelle des sept entérotoxines staphylococciques dans les aliments et les ingrédients alimentaires. Sa limite de détection atteint ou dépasse 1 ng/mL. Cette méthode permet de détecter les entérotoxines A, B, C₁, C₂, C₃, D et E. Comme la méthode ne permet pas d'identifier le type de toxine, il faut utiliser les méthodes MFLP-67 ou MFLP-69 pour confirmer les résultats positifs. Cette version révisée remplace la méthode MFLP-68 datée d'octobre 1993.

2. PRINCIPE

L'immuno-essai visuel constitue un test rapide, sensible et spécifique de détection des entérotoxines staphylococciques. La méthode employée est celle du titrage avec immuno-adsorbant lié à une enzyme (ELISA) de type sandwich (11.1). Des anticorps de capture qui ont une grande affinité pour les entérotoxines sont adsorbés à la surface des puits Removawells^{MD}. Si l'échantillon contient des entérotoxines staphylococciques, les anticorps adsorbés les captureront. Toutes les autres substances contenues dans l'échantillon sont éliminées par lavage. On complète le sandwich en ajoutant des anticorps marqués par une enzyme (conjugué), qui sont spécifiques des entérotoxines staphylococciques. Le virage au vert du substrat incolore révèle ensuite la présence de l'enzyme.

3. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 3.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 30

5. MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX

- 1) Trousse d'immuno-essai visuel pour la détection des entérotoxines A, B, C₁, C₂, C₃, D et E. Disponible chez International Bioproducts, Inc., 14796 95th Street, Redmond, WA 98052 É.-U. (téléphone : 800 745-1044; télécopieur : 206 881-6880).

6. MARCHE À SUIVRE

6.1 Instructions générales

- 6.1.1 Ne pas utiliser la trousse après la date de péremption indiquée. Il faut préparer les réactifs avec soin et indiquer sur l'étiquette extérieure de la boîte la date de reconstitution des produits. Reconstituer au départ une fiole de conjugué avec une fiole de diluant pour conjugué et reconstituer la seconde fiole de conjugué selon les besoins. Il faut utiliser le conjugué reconstitué dans les 28 jours, et tous les autres réactifs au plus tard 56 jours après leur reconstitution. Il faut garder tous les composants au réfrigérateur (2-8°C) lorsqu'ils ne servent pas.
- 6.1.2 Les composants de la trousse d'immuno-essai visuel sont conçus pour être utilisés comme un tout. Il ne faut donc pas utiliser ensemble des composants qui portent des numéros de lot différents.
- 6.1.3 Il faut employer une nouvelle pointe de pipette pour chaque échantillon. Il faut éviter la contamination croisée des puits. Si l'on utilise des récipients en plastique pour verser le conjugué et le substrat, il faut toujours garder les deux récipients séparés.
- 6.1.4 Il faut préparer des témoins positif et négatif pour chaque épreuve. On recommande fortement d'analyser les témoins alimentaires positif et négatif en même temps.
- 6.1.5 Il faut préparer un récipient contenant de l'hypochlorite de sodium à 2% pour y jeter toutes les toxines inutilisées, les eaux de lavage, etc.
- 6.1.6 Il faut toujours garder les bandes Removawell^{MD} inutilisées qu'il faut sceller de nouveau dans la pochette fournie, avec du ruban adhésif, après chaque utilisation.
- 6.1.7 Il ne faut pas utiliser de contenant en verre, en polycarbonate ou en polystyrène, matériaux qui absorbent les entérotoxines staphylococciques. Nous recommandons d'utiliser des contenants en polypropylène.

6.2 Préparation des échantillons d'aliment non traités à la chaleur ou qui ont pu être contaminés après la transformation.

- 6.2.1 Déposer 50 g d'aliment dans un bocal de mélangeur un sac de «stomacher». Ajouter de la solution tampon pour extraction de toxine (TRIS-HCL 0,25 M, pH 8,0) en utilisant les ratios suivants d'aliment (poids) et de tampon (volume) : 1:1 pour aliments à haute teneur en humidité, comme les fruits de mer, les viandes crues, le tofu, les germes de soya, les champignons en conserve, etc); 1:2 dans les cas des aliments semi-secs (fromage, jambon, salami, gâteaux, etc.); et 1:4 dans celui des aliments secs (pâtes, aliments en poudre, etc.). Pulvériser les pâtes sèches au moyen d'un appareil de laboratoire. Mélanger à haute vitesse durant 2-3 min et laisser ensuite l'homogénat à reposer à la température de la pièce pendant 20 min.
- 6.2.2 Transférer la suspension dans des bouteilles de centrifugeuse en acier inoxydable ou en polypropylène. Centrifuger la suspension pendant 20 min à 16 300 x g.
- 6.2.3 Décanter et garder le liquide surnageant.
- 6.2.4 Dans le cas du fromage et des autres produits laitiers, ajuster le pH à 4,6 avec du HCl 4N. Centrifuger de la façon décrite ci-dessus et neutraliser le liquide surnageant avec du NaOH 4N. Si le liquide surnageant est encore trouble, centrifuger de nouveau.

- 6.2.5 Pour les échantillons de lait liquide, sauter les étapes 6.2.1 à 6.2.4. Utiliser un échantillon de 20 mL.
- 6.2.6 Ajuster le pH du liquide surnageant entre 7,0 et 8,0.
- 6.2.7 Prélever 10 mL du liquide surnageant et ajouter 0,1 mL de sérum animal normal (lapin, veau, porc, p.ex.). Bien mélanger. Ajouter 10 µL d'additif pour échantillon à l'éprouvette. Utiliser 200 µL pour l'analyse. Si le résultat est positif, il faut l'indiquer.

6.3 Marche à suivre pour concentrer des extraits d'aliment

Pour augmenter la concentration d'entérotoxines staphylococciques dans les extraits d'aliment, il faut utiliser les deux méthodes suivantes (9.2 et 9.6)

- 6.3.1 Déposer 100 mL dans un tube à dialyse (boîte en cellulose de 2,3 cm de largeur à plat et point de rupture de moins de 14 000).

Note : Vérifier si le tube à dialyse a des fuites en le remplissant avec de l'eau distillée avant d'ajouter l'extrait.

- 6.3.2 Déposer le tube à dialyse contenant l'extrait dans une solution de polyéthylèneglycol (PEG) °C à 30 % p/v, 20 000 MW, et laisser reposer l'extrait à la température de la pièce (20 - 25 °C) jusqu'à ce que le volume diminue à 5 mL ou moins (pendant la nuit).
- 6.3.3 Retirer le tube à dialyse du PEG et en laver soigneusement l'extérieur avec de l'eau distillée pour éliminer toute trace de PEG qui pourrait y rester.
- 6.3.4 Faire tremper le tube une heure environ dans du TRIS O, 25 M de pH 8 afin de produire un volume total de 5 mL d'extrait concentré.
- 6.3.5 Retirer l'extrait du tube à dialyse. Clarifier l'extrait par centrifugation (10 minutes 3 000xg) et filtrer le liquide surnageant dans une seringue préparée (coton hydrophile) en recueillant l'éluat.
- 6.3.6 Répéter les opérations 6.2.6 et 6.2.7

7. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Suivre les instructions du fabricant.

8. CONFIRMATION DU TYPE DE TOXINE

Il faut utiliser les méthodes de laboratoire MFLP-67 ou MFLP-69 pour confirmer le type de toxine.

9. RÉFÉRENCES

- 9.1 Freed, R.C, Evenson, M.L., Reiser, R.F., M.S. Bergdoll. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Environ. Microbiol. **44**: 1349-1355.
- 9.2 Park, C.E., Akhtar, M., et K. Rayman. Nonspecific reactions of a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit (TECRA) for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 22
- 9.3 Park, C.E., Akhtar, M., et K. Rayman. 1993. Simple solutions to false-positive staphylococcal enterotoxin assays with seafood tested with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA). Appl. Environ. Microbiol. **59**: 2210-2213.
- 9.4 Park, C.E., Warbuton. D.W., Laffey, P.J., et collaborateurs. 1996. A collaborative study on the detection of staphylococcal enterotoxin in foods with an enzyme immunoassay kit (TECRA). J. Food Prot. **59**: 390-397.

- 9.5 Akhtar, M. Park, C.E.. et K. Rayman. 1996. Effect of urea treatment on recovery of staphylococcal enterotoxin A from heat-processed foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3274-3276.
- 9.6 Dickie, N. et M. Akhtar. 1989. Concentration of staphylococcal enterotoxin from food extract using copper chelate sepharose. *J. Food. Prot.* **52**: 903-905.

TABLEAU 1. MÉTHODES POUR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ AUX CHÉLATES MÉTALLIQUES**1. Préparation de l'échantillon**

Voir les opérations 6.1.1 à 6.1.6.

2. Chromatographie d'affinité aux chélates métalliques (7.2)

- ÉTAPE 1 Bien mélanger le gel de la bouteille d'Iminodiacétate lié par covalence au Sépharose-6B (Pharmacia) et transférer 8,0 mL du gel (pour 100-150 mL d'échantillon) ou 5,0 mL de gel (pour 50-99 mL d'échantillon) dans un entonnoir en verre fritté d'une capacité de 150 mL. Laver le gel avec 100 mL d'eau distillée.
- ÉTAPE 2 Préparer une solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 0,5% (p/v) en faisant dissoudre 1,25 g de cristaux de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 250 mL d'eau distillée (pour deux échantillons).
- ÉTAPE 3 Introduire 100 mL de la solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans l'entonnoir fritté renfermant le gel lavé. (Le gel vire au bleu.)
- ÉTAPE 4 Lorsque le gel est viré au bleu (chargé d'ions Cu), le laver avec 100 mL d'eau distillée pour éliminer les ions Cu en excès (ions Cu non chargés).
- ÉTAPE 5 Transférer le gel dans une bouteille de dilution de 100 mL et ajouter l'extrait d'aliment (50-100 mL d'extrait d'aliment, pH 7,4); laisser l'extrait agir avec le gel en agitant légèrement sur un agitateur rotatif pendant 1 h à la température de la pièce.
- ÉTAPE 6 Transférer le contenu dans un entonnoir fritté et laver le gel dix fois avec des fractions de 10 mL d'une solution physiologique tamponnée au phosphate de sodium 0,05 M, dans du NaCl 0,15 M pH 6,5.
- ÉTAPE 7 Introduire 2 mL de gel non chargé dans une ampoule de seringue de 10 mL après y avoir déposé un morceau circulaire de papier filtre de 0,6 à 0,8 mm d'épaisseur.
- ÉTAPE 8 Ajouter 10 mL du tampon PBS au gel de l'ÉTAPE 6 et verser lentement le gel sur les 2 mL de gel non chargé qui se trouve dans l'ampoule de la seringue (ÉTAPE 7) de façon à ne pas perturber le gel du fond.
- ÉTAPE 9 Après avoir garni l'ampoule de la seringue avec le gel bleu, procéder à l'élution des substances fixées en ajoutant des fractions successives de 1,0 mL d'imidazole 0,05 M dans le sérum, et collecter des fractions de 1,0 mL par tube. Surveiller la couleur qui commence à sortir après environ 5 mL avec 5,0 mL de gel ou 12 mL avec 8,0 mL.
- ÉTAPE 10 Combiner les cinq premières fractions colorées, habituellement de la 12^e à la 16^e (pour 8,0 mL de gel) ou de la 5^e à la 9^e (pour 5,0 mL de gel), pour analyser les entérotoxines staphylococciques.

(Le gel peut être réutilisé après régénération du gel usé.)

3. Régénération du Sépharose-6B

- ÉTAPE 1 Transférer le gel dans un entonnoir en verre fritté (de 50 ou 150 mL).
- ÉTAPE 2 Laver le gel avec des fractions de 10 mL d'acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA) 0,5 M jusqu'à ce que la couleur bleue soit partie (il faut environ 100 mL pour laver complètement le gel).

ÉTAPE 3 Laver le gel avec de l'eau distillée en remplissant six fois l'entonnoir fritté (env. 300 mL d'eau distillée).

ÉTAPE 4 Le gel est prêt.