



**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS**

**OTTAWA**

**DÉTERMINATION DES ENTÉROTOXINES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
DANS LES ALIMENTS ET LES BOUILLONS DE CULTURE  
[MÉTHODE D'AGGLUTINATION PASSIVE INVERSÉE AU LATEX (APIL)]**

**Comité des méthodes microbiologiques  
Division de l'évaluation microbiologique  
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments  
Direction générale des produits de santé et des aliments, Santé Canada  
Repère postal : 2204A1  
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

**Courriel: Don\_Warburton@hc-sc.gc.ca**

**M. Akhtar  
Division de la recherche en microbiologie,  
Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments  
Santé Canada, Repère postal : 2204A2  
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

**1. APPLICATION**

Cette méthode est applicable à la détermination de la production d'entérotoxines par *Staphylococcus aureus* dans les aliments, les ingrédients alimentaires ou dans les bouillons de culture. La méthode vise à appuyer les activités de vérification de la conformité aux articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Lorsqu'une méthode officielle est prescrite pour un aliment, cette méthode doit être suivie.

Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-67 datée d'avril 1998.

**2. PRINCIPE**

Les aliments en cause dans les intoxications staphylococciques renferment souvent moins de 10 ng de toxine par gramme d'aliment. Seuls le dosage radio-immunologique (RIA), la méthode ELISA et l'hémagglutination passive inversée sont suffisamment sensibles pour détecter ce faible taux de toxine sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours à des étapes complexes de concentration. L'hémagglutination passive inversée est la plus simple à effectuer, mais elle donne parfois des résultats non spécifiques avec certains aliments. Pour surmonter cette difficulté, la méthode d'agglutination passive inversée au latex (APIL) a été mise au point. Dans cette méthode, des particules de latex au polystyrène enduites d'anticorps remplacent les érythrocytes employés dans l'épreuve d'hémagglutination passive inversée. La méthode APIL permet de détecter les entérotoxines staphylococciques de types A, B, C et D (ESA, ESB, ESC et ESD).

Voici une description de l'épreuve d'agglutination passive inversée au latex. Des trousse conçues spécialement pour réaliser l'épreuve sont disponibles sur le marché.

### 3. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3.

### 4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

### 5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

**Note:** Le surveillant du laboratoire doit veiller à ce que l'analyse décrite dans la présente méthode est effectuée conformément à la norme internationale « ISO/IEC 17025 :1999 (ou dernière révision): Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais ».

Les milieux listés plus bas sont disponibles dans le commerce et ils doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 pour la formulation des milieux individuels

**Note:** Si l'analyste utilise des variantes des milieux indiqués ici (qu'il s'agisse d'un produit disponible dans le commerce ou fabriqué à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au superviseur du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 1) Trousse SET-RPLA pour les entérotoxines de types A, B, C et D. La trousse est distribuée par Oxoid Canada ou Fisher Scientifique. Elle contient suffisamment des réactifs suivants pour analyser 20 échantillons:
  - a. Suspensions de particules de latex sensibilisées avec les antisérums - ESA, ESB, ESC et ESD. 5 ml/fiole
  - b. Suspension témoin de latex 5 ml/fiole
  - c. Entérotoxines staphylococciques lyophilisées de types SEA, SEB, SEC et SED, à reconstituer avec 0,5 ml de diluant.
  - d. Diluant (solution physiologique tamponnée au phosphate contenant 0,5% d'albumine sérique bovine (p/v) et 0,1% d'azoture de sodium) 50 ml
- 2) Solution physiologique tamponnée au phosphate (phosphate 0,05 M dans du NaCl 0,15 M contenant de l'azoture de sodium à 0,05%, pH 7,4).
- 3) Hypochlorite de sodium à 2% (NaOCl)
- 4) Hydroxyde de sodium 4N (NaOH)
- 5) Acide chlorhydrique 4N (HCl)
- 6) Plaques pour microtitrage (type V, 8 rangées de 12 puits) et couvercles
- 7) Micropipette (25 µL) et embouts
- 8) Agitateur à plate-forme
- 9) Mélangeur ou homogénéisateur

10) Centrifugeuse réfrigérée

## 6. MARCHE À SUIVRE

### 6.1 Instructions générales

- 6.1.1 La trousse APIL doit être gardée au réfrigérateur à 2 - 8°C. Dans ces conditions, les réactifs conserveront leur réactivité jusqu'à la date apparaissant sur la boîte de la trousse. Après reconstitution, les contrôles d'entérotoxines doivent être conservés à 2 - 8°C. Dans ces conditions, les contrôles d'entérotoxines reconstitués conserveront leur réactivité pendant 3 mois ou jusqu'à la date apparaissant sur la boîte de la trousse, selon la date la plus rapprochée.
- 6.1.2 Les réactifs portant des numéros de lot différents ne doivent pas être inter-changés.
- 6.1.3 les réactifs et le diluant contiennent de l'azoture de sodium à 0,1% comme préservatif. L'azoture de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb ou en cuivre et former des azotures métalliques explosifs. Les solutions contenant de l'azoture de sodium doivent être disposées comme des déchets chimiques.
- 6.1.4 Un récipient à déchets contenant de l'hypochlorite de sodium à 2% doit être préparé et utilisé pour la disposition des extraits de culture, des extraits alimentaires, des contrôles de toxines, etc.

### 6.2 Extraction à partir d'aliments

- 6.2.1 Pour les aliments à haute teneur en humidité (viandes crues, fruits de mer, champignons en conserve, etc.), déposer dans un bocal de mélangeur 50 g d'échantillon et 50 ml de solution physiologique tamponnée au phosphate. Mélanger à haute vitesse pendant 2 min et laisser ensuite l'homogénat reposer à la température de la pièce pendant 10 min. Continuer selon les étapes 6.2.5 à 6.2.7.
- 6.2.2 Pour les aliments semi-secs (fromage, jambon, salami, gâteaux, etc.), déposer dans un bocal de mélangeur 50 g d'échantillon et 100 ml de solution physiologique tamponnée au phosphate. Mélanger à haute vitesse pendant 2 min et laisser ensuite l'homogénat reposer à la température de la pièce pendant 10 min. Continuer selon les étapes 6.2.5 à 6.2.7.
- 6.2.3 Pour les aliments secs (pâtes, lait en poudre, etc.), déposer dans un bocal de mélangeur 50 g d'échantillon et 150 ml de solution physiologique tamponnée au phosphate. Mélanger à haute vitesse pendant 2 min et laisser ensuite l'homogénat reposer à la température de la pièce pendant 10 min. Pour les pâtes sèches, mélanger d'abord l'échantillon seul à haute vitesse pendant 2-3 min jusqu'à ce qu'il se transforme en poudre. Ajouter ensuite la solution physiologique tamponnée au phosphate et mélanger le tout. Laisser reposer à 4°C pendant 1-2 h. Mélanger encore une fois à grande vitesse pendant 2-3 min, et laisser ensuite l'homogénat reposer à la température de la pièce pendant 10 min. Continuer selon les étapes 6.2.5 à 6.2.7.
- 6.2.4 Dans le cas d'échantillons de lait liquide, exécuter les étapes 6.2.5 à 6.2.7. Utiliser 50 ml comme unité analytique.
- 6.2.5 Centrifuger l'homogénat à 10 000 t/min (16 300 x g) pendant 20 min à 4°C.
- 6.2.6 Décanter et garder le liquide surnageant.
- 6.2.7 Si le liquide surnageant est encore trouble comme dans le cas du fromage et d'autres produits laitiers, ajuster le pH à 4,6 avec du HCl 4N. Centrifuger de la manière décrite ci-dessus et neutraliser le liquide surnageant avec du NaOH 4N. Si le liquide surnageant est encore trouble, centrifuger de nouveau. Pour minimiser les réactions non spécifiques de l'épreuve APIL, l'extrait d'aliment doit être limpide.

- 6.2.8 Certains types d'aliments, comme les nouilles sèches, donnent souvent des résultats faussement positifs par analyse directe. Il faut nettoyer ces extraits d'aliments et les concentrer par chromatographie d'affinité aux chélates métalliques (voir tableau 1).

### 6.3 Extraction à partir de bouillons de culture

- 6.3.1 Ensemencer un bouillon coeur-cerveau, contenant de l'extrait de levure à 0,5% (BHI-YE) avec une colonie isolée de *S. aureus* et incubé pendant 24 h à 35-37°C.
- 6.3.2 Centrifuger le bouillon et diluer le liquide surnageant avec 4 volumes de solution physiologique tamponnée au phosphate.

**Note:** La protéine A produite par *S. aureus* donne des résultats faussement positifs. En diluant le liquide surnageant d'une culture de *S. aureus* incubée pendant 24 h avec 4 volumes de solution physiologique tamponnée au phosphate, on réduit la concentration de la protéine A à une valeur qui ne donne pas de résultats faussement positifs avec l'épreuve APIL. La protéine A ne pose pas de problème dans l'analyse des extraits d'aliments.

### 6.4 Épreuve d'agglutination passive inversée au latex (APIL)

- 6.4.1 Chaque extrait d'aliment est analysé de la façon suivante dans 20 puits d'une plaque pour microtitrage : quatre puits pour chacune des quatre entérotoxines de types A, B, C et D, et un puits pour le témoin au latex. Chaque extrait de bouillon peut nécessiter six puits ou plus pour chacun des quatre types d'entérotoxine selon la quantité de toxine produite par la culture. Inscrive verticalement le numéro de l'échantillon et le type de toxine sur la plaque pour microtitrage, c'est-à-dire A, B, C, D et L (témoin au latex) et horizontalement, les facteurs de dilution (0=non dilué, 2x, 4x, 8x, etc.).

**Note:** À chaque jour où l'on fait un essai, il faut vérifier l'activité des suspensions de particules de latex sensibilisées avec des anti-ESA, -ESB, -ESC ou -ESD et la suspension témoin au latex par rapport à leurs entérotoxines correspondantes à titre de témoins positifs et la solution de dilution à titre de témoin négatif. Il n'y a pas lieu de répéter ces témoins pour chaque échantillon si les analyses ont lieu le même jour. Jeter les réactifs s'ils ne rencontrent pas les normes de spécificité ou sensibilité.

- 6.4.2 Déposer 25 µL de diluant dans chaque puits, sauf les premiers puits (rangée 0) qui contiendront les échantillons non dilués pour la détermination de chaque entérotoxine et le témoin au latex.
- 6.4.3 Ajouter 25 µL de l'extrait d'aliment aux premiers puits (0) et aux deuxièmes puits (2x) pour chaque détermination d'entérotoxine et le témoin au latex (identifiés A, B, C, D et L respectivement).
- 6.4.4 Bien mélanger le contenu du deuxième puits (2X) pour la détermination ESA (identifié A) en remplissant et vidant la solution au moins 5 fois avec la micropipette. Transférer 25 µL de ce puits dans le 3e puits (4X) pour la détermination ESA et mélanger de la même façon qu'auparavant. Transférer 25 µL du 3e puits dans le 4e puits (8X) pour la détermination ESA, mélanger de la même façon qu'auparavant. Continuer cette dilution en double au besoin pour les 5e et 6e puits.
- 6.4.5 Répéter les dilutions doubles effectuées en 6.4.4 pour les déterminations de ESB, ESC, ESD, ainsi que pour le témoin au latex (identifiés B, C, D et L respectivement).
- 6.4.6 Agiter vigoureusement chacune des suspensions au latex fournies avant de les utiliser. Ajouter 25 µL de la suspension au latex sensibilisée avec l'antisérum-ESA à chacun des quatre puits de la première série (série A), 25 µL de la suspension au latex sensibilisée avec l'antisérum-ESB à chacun des quatre puits de la deuxième série (série B), 25 µL de la suspension au latex sensibilisée avec l'antisérum-ESC à chacun des quatre puits de la troisième série (série C), 25 µL de la suspension au latex sensibilisée avec l'antisérum-ESD à chacun des quatre puits de la quatrième série (série D) et 25 µL de la suspension témoin au latex à chacun des quatre puits de la cinquième série (série témoin L).

- 6.4.7 Placer la plaque pour microtitrage dans un contenant garni d'une double épaisseur de papier filtre imbibé d'eau. Couvrir le contenant afin de maintenir l'humidité. On peut également utiliser un couvercle ou une feuille adhésive transparente afin de sceller les puits et prévenir l'évaporation. Dans ces cas, il n'est pas nécessaire de placer la plaque dans un contenant humide.
- 6.4.8 Utiliser un agitateur à plate-forme pour agiter la plaque à 100 t/min dans son contenant ou l'agiter à la main pendant une à deux minutes. Il faut éviter de faire déborder les puits.
- 6.4.9 Laisser reposer la plaque **sans agitation**, sur une surface exempte de vibrations, à la température ambiante pendant 20-24 heures.
- 6.4.10 Examiner les puits pour l'agglutination du latex à l'aide d'un fond noir.

## 6.5 Interprétation des résultats

- 6.5.1 Comparer le degré d'agglutination des particules de latex à l'illustration dans le mode d'emploi du fabricant. Les puits dont le degré d'agglutination se situe entre (+) et (+++) indiquent la présence du type spécifique de toxine. Si la réaction d'agglutination n'est pas claire, confirmer la réaction en utilisant un microscope stéréoscopique ou une loupe capable de grossir 10x. Les témoins de latex doivent être négatifs. Parfois, une agglutination non spécifique dans les puits témoins de latex peut être observée; dans ce cas, on peut quand même considérer que le résultat obtenu dans les puits contenant les échantillons est positif si la dilution de l'échantillon de ces puits est supérieure à celle du témoin positif non spécifique. Si tous les puits de toxines A, B, C et D présentent un résultat positif avec le même degré d'agglutination, il faut alors considérer que l'épreuve a donné un résultat faussement positif. Dans ce cas, il faut soumettre l'extrait d'aliment ou l'extrait de bouillon à une étape de nettoyage/concentration par chromatographie d'affinité aux chélates métalliques (voir tableau 1).
- 6.5.2 Il est possible d'estimer la quantité d'entérotoxine présente dans l'échantillon en comparant les résultats de l'agglutination avec ceux de solutions étalons d'entérotoxines. L'épreuve permet de détecter 0,5 à 1,0 ng de toxine par ml d'extrait. Si des solutions étalons ne sont pas disponibles, on peut estimer qu'une agglutination de degré (+) équivaut à 0,5-1,0 ng de toxine par ml d'extrait.

## 7. RÉFÉRENCES

- 7.1 Park, C.E. et R. Szabo. Evaluation of the Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) Test Kits for the Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, and D in Foods. J. Can. Microbiol. 32: 723-727.
- 7.2 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**

Se reporter aux sections 6.2.1 à 6.2.8

**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 de gel (pour 100-150 ml d'extrait d'aliment) ou 5,0 ml de gel (pour 50-99 ml d'extrait d'aliment) 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 Ajouter 100 ml de la solution de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans l'entonnoir fritté qui contient le gel lavé (le gel deviendra 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 brassant légèrement sur un agitateur rotatif pendant 2 h à la température ambiante.
- 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 (tampon phosphate de sodium 0,05 M avec du NaCl 0,15 M, pH 6,5).
- ÉTAPE 7 Prendre le baril d'une seringue de 10 ml et déposer un tampon circulaire (morceau de papier filtre épais, de 0,6-0,8 mm) au fond du baril, et ajouter ensuite 2 ml de gel non chargé.
- ÉTAPE 8 Ajouter 10 ml de la solution physiologique tamponnée au gel de l'ÉTAPE 6, et verser ensuite lentement le gel sur la partie supérieure des 2 ml de gel non chargé contenus dans le baril de la seringue (ÉTAPE 7) de façon à ne pas perturber le gel au fond.
- ÉTAPE 9 Après avoir bourré le baril de la seringue de gel bleu, procéder à l'élution des matières fixées, en ajoutant des fractions successives de 1,0 ml d'imidazole 0,05 M dans la solution tamponnée, et recueillant des fractions de 1,0 ml par tube. Surveiller la bande couleur qui commence à sortir après environ 5 ml avec 5,0 ml de gel ou 12 ml avec 8,0 ml de gel.
- ÉTAPE 10 Combiner les cinq premières fractions colorées, habituellement de la 12<sup>e</sup> à la 16<sup>e</sup> (pour 8,0 ml de gel), ou de la 5<sup>e</sup> à la 9<sup>e</sup> (pour 5 ml de gel), pour analyser les entérotoxines staphylococquiques.

(On peut réutiliser le gel après régénération.)

**3. Régénération du Sépharose-6B**

- ÉTAPE 1 Transférer le gel sur un entonnoir en verre fritté (d'une capacité de 50 ou 150 ml).
- ÉTAPE 2 Laver le gel avec des fractions de 10 ml d'acide éthylènediaminetétra-acétique (EDTA) jusqu'à ce que la couleur bleue disparaisse (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 à utiliser.