



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**DÉTERMINATION DE LA NUCLÉASE THERMOSTABLE DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS DANS LES ALIMENTS**

R. Szabo

**Division de l'évaluation microbiologique
Bureau de dangers microbiens, Direction des aliments, DGPSA
Repère postal : 2204A1
Ottawa, Ontario K1A 0L2**

Rick_Szabo@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détermination de la nucléase thermostable (TNase) dans les aliments et les ingrédients alimentaires. Cette méthode peut servir à déterminer la présence de la TNase staphylococcique et à confirmer ainsi que l'aliment a contenu des *S. aureus*. Cette méthode peut aussi servir à titre d'outil de dépistage au cours d'activités liées à la conformité et d'indicateur de la contamination des aliments par des entérotoxines staphylococciques. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-28 datée de septembre 1997.

2. DESCRIPTION

Des études internationales de la DGPS (8.2-8.5) ont démontré que cette méthode peut donner des résultats satisfaisants avec les produits suivants : viandes, poisson, volaille, légumes, céréales et produits laitiers contaminés naturellement, et les aliments contaminés artificiellement.

3. PRINCIPE

Le *Staphylococcus aureus* produit une nucléase thermostable qui, comme les entérotoxines staphylococciques, est stable aux combinaisons température/temps d'utilisation courante dans la transformation des aliments. Comme le nombre de cellules viables de l'organisme peut tomber à des niveaux impossibles à détecter, dans certaines circonstances, le dénombrement des *S. aureus* dans les aliments finis comme moyen de déterminer si les produits risquent de contenir des entérotoxines peut avoir une valeur limitée. On a établi un lien étroit entre la TNase et la production d'entérotoxines. La détection de la TNase dans les aliments indique que ceux-ci ont contenu, à un moment donné, au moins 10^6 cellules de *S. aureus* par g. Comme les épreuves de dépistage des entérotoxines coûtent trop cher pour le dépistage de routine des aliments et comme il se peut que les cellules ne survivent pas à la transformation ou à l'entreposage, la présente méthode constitue une épreuve rapide et peu coûteuse qui peut indiquer si un aliment a été contaminé par un nombre important de *S. aureus* et, par conséquent, peut contenir une entérotoxine staphylococcique.

4. DÉFINITIONS

Voir l'Annexe A du volume 2.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'Annexe B du volume 2.

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Il faut préparer les réactifs et les milieux suivants. Voir l'annexe G du volume 2 et la référence 8.1

- 1) Acide chlorhydrique (HCl) 3N.
- 2) Acide trichloroacétique (ATC) 3M.
- 3) Tampon Tris 0,05 M, pH 9,0
- 4) Hydroxyde de sodium (NaOH) 1N et 0,1N.
- 5) Gélose ADN au bleu de toluidine sur lame de microscope ou dans des boîtes de Pétri
- 6) Stomacher, mixeur ou l'équivalent.
- 7) Centrifuge capable de produire une force de 23 000 x g.
- 8) Lait en poudre écrémé (LPE) (ne doit pas contenir de Tnase).
- 9) Chiffons Kimwipes (Kimberley-Clark Ltd., Toronto).
- 10) Miracloth (Calbiochem Ltd.).
- 11) Incubateur pouvant maintenir une température de 35°C

NOTE: Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 +/-1,0 °C. De même, des températures plus basses de 30° ou 25° peuvent être à +/-1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à +/-0,5 °C de variation. Une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

- 12) pH mètre ou papier pH capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité pH dans l'échelle de pH 3,5 à 9,5 (voir la Note p. 4)
- 13) Cultures contrôles ; utiliser les cultures suivantes ou des souches équivalentes.
Contrôle positif : *S. aureus* coagulase positive ATCC 27154, 25923
- 14) Bain-marie bouillant ou l'équivalent
- 15) Tnase anti-staphylococcique (optionnel)

7. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage doit être analysée individuellement ou par groupes de 2 (voir 7.2.1.2). Il faut effectuer l'analyse en suivant les instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage au laboratoire

Sauf dans le cas des aliments stables à la température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5 °C) ou au congélateur jusqu'au moment de l'analyse.

7.2 Détermination de la TNase

7.2.1 Méthode d'extraction

7.2.1.1 Dans le cas des aliments solides emballés, des viandes, des fromages et plus particulièrement des produits en conserve, prélever l'échantillon d'analyse à la surface, de préférence le long du serti.

Note: Ne pas prélever un échantillon au milieu de la masse

7.2.1.2 Dans le cas des aliments secs, ajouter 5 g de lait en poudre écrémé (LPE) et 75 ml d'eau à chaque unité d'analyse de 30 g (voir sec. 5). Si l'aliment est liquide, mélanger 80 ml du produit avec 5 g de LPE. Pour tous les autres aliments, mélanger 30 g d'aliments avec 5 g de LPE et 60 ml d'eau. Il n'est pas nécessaire d'ajouter du lait en poudre écrémé aux produits laitiers.

Note: Le lait en poudre écrémé ne doit pas contenir de TNase.

(OPTIONNEL) Prélever 30 g de 2 unités d'échantillonnage distinctes et réunir les prélèvements pour former un échantillon composite de 60 g. Pour les aliments secs, ajouter 7,5 g de LPE et 150 ml d'eau. Si l'aliment est liquide, combiner 100 ml de 2 unités d'échantillonnage distinctes pour former un échantillon composite de 200 ml et mélanger avec 7,5 g de LPE. Pour les autres aliments, mélanger avec 7,5 g de LPE et 120 ml d'eau. Il n'est pas nécessaire d'ajouter du LPE aux produits laitiers.

7.2.1.3 Mélanger au mixeur les aliments secs, comme les pâtes alimentaires, pendant 2 minutes avant d'ajouter le LPE et l'eau et encore pendant 2 minutes après l'avoir fait. Déposer ensuite au réfrigérateur pendant 1-2 heure et mélanger une troisième fois pendant 2 minutes pour obtenir une suspension homogène.

7.2.1.4 Tout en agitant constamment, ajuster le pH de l'homogénéat d'aliment à $3,8 \pm 0,2$ avec du HCl 3N.

7.2.1.5 Centrifuger l'homogénéat pendant 30 minutes à 23 000 x g (14 000 TM ou 12 000 TM avec un rotor de 4,25 ou 5,75 po de rayon respectivement). Pour certains aliments, des forces g moins élevées peuvent suffire pour obtenir un liquide surnageant clair. Dans le cas des aliments riches en lipides, il peut être nécessaire d'utiliser une centrifugeuse réfrigérée pour obtenir une couche solide et compacte de matière grasse à la surface. Il peut être nécessaire d'écarter cette couche pour obtenir le liquide surnageant.

7.2.1.6 Filtrer le liquide surnageant à travers 2 couches de Kimwipes ou d'une seule couche pré humectée de Miracloth.

7.2.1.7 Ajouter au filtrat de l'ATC 3M froid de façon à obtenir un ratio final d'une partie d'ATC pour 20 parties de filtrat. Bien mélanger.

7.2.1.8 Centrifuger le filtrat traité à l'ATC à 23 000 x g pendant 15 minutes.

7.2.1.9 Jeter le liquide surnageant et dissoudre le sédiment dans 2 ml (4 ml dans le cas d'extrait de produits qui ont été composés) de tampon Tris 0,05M (pH 9,0). En agitant constamment, ajuster le pH à $7,5 \pm 0,5$ avec du NaOH 1N ou 0,1N. Comme le volume

est faible, il faut utiliser une seule électrode étroite combinée pour mesurer le pH. On peut aussi utiliser du papier indicateur de pH à plage étroite. Boucher le tube à centrifuger et le déposer dans un bain d'eau bouillante ou de vapeur pendant 15 minutes. Laisser refroidir. Si le temps ne permet pas de terminer le test de la TNase, on peut alors entreposer l'extrait pour la nuit entre 0 et 5 °C avant de passer à l'étape 7.2.1.10.

- 7.2.1.10 En agitant constamment, ajuster soigneusement le pH à $9,0 \pm 0,2$ avec du NaOH 0,1N ou 1N de façon à ce que le volume final ne dépasse pas 2,5 ml (5,0 ml dans le cas des extraits de produits qui ont été composés). Pour éviter d'inactiver la TNase, le pH ne doit pas dépasser 9,2. Si l'extrait est visqueux ou trouble, il faut le centrifuger à 23 000 x g pendant 10 minutes.

Note: Ne pas utiliser d'électrode Ag/AgCl pour ajuster le pH d'une solution qui contient du tampon Tris. Le Tris forme un complexe avec l'Ag, ce qui fausse la mesure du pH. Il est recommandé d'utiliser une électrode combinée au calomel.

- 7.2.1.11 Enlever et garder la partie liquide de l'extrait.

7.2.2 Épreuve de la thermonucléase

Procéder de la façon suivante pour l'analyse de la nucléase thermostable (TNase) :

- 7.2.2.1 On utilise comme milieu de la gélose ADN - bleu de toluidine (TDA).
- 7.2.2.2 Pipetter 3,0 ml du mélange fondu de TDA sur une lame de microscope ou sur une plaque en plastique pour réactions immunologiques ; ou pipetter dans une boîte de Pétri à fond plat suffisamment de TDA pour obtenir une épaisseur de 1,8 mm (12 - 13 ml pour des boîtes d'un diamètre interne de 85 à 90 mm).
- 7.2.2.3 Utiliser un perce-bouchon ou une pipette Pasteur coupée au diamètre requis pour découper dans la gélose deux séries de deux rangées horizontales de puits d'un diamètre interne de 2 mm, à une distance de 8 à 10 mm centre à centre les uns des autres. Pour l'épreuve de séro-inhibition, découper une rangée supplémentaire de puits anti-TNase entre les deux rangées de puits à échantillon de telle façon qu'au point le plus rapproché, le bord externe du puits anti-TNase se trouve à 2 ou 3 mm des puits d'échantillon situés immédiatement au-dessus et immédiatement au-dessous (fig. 1 (a) et 2). Un gabarit aidera à aligner les puits. Retirer les bouchons de gélose par aspiration. Répéter deux fois si une boîte de Pétri est utilisée, mais noter qu'on n'utilise que quatre puits par rangée horizontale au bas de la boîte, ce qui permet de l'orienter facilement et de reconnaître les puits qui contiennent l'anti-TNase et ceux qui contiennent le tampon Tris (fig. 1(b) et 2). Si l'on ne dispose pas d'anti-TNase, effectuer seulement l'épreuve de la TNase sans exécuter le test de la séro-inhibition.
- 7.2.2.4 Dans chacun des quatre puits (deux puits de la rangée du haut contenant l'échantillon et deux puits contenant un échantillon correspondant dans la rangée du bas d'une série de deux rangées), ajouter 5 µl de l'extrait liquide chauffé (7.2.1.11). Voir la fig. 2.
- 7.2.2.5 Dans un puits d'anti-TNase situé entre deux puits d'échantillon d'une série de quatre, ajouter 5 µl d'une dilution appropriée d'anti-TNase. Dans l'autre puits «d'anti-TNase», ajouter 5 µl de tampon Tris 0,05M à pH 9,0.
- 7.2.2.6 Incuber la lame ou la boîte de Pétri dans une chambre humide pendant 4 heures à 35-37 °C. Mesurer ensuite et enregistrer le diamètre de la zone rose qui révèle l'activité de la TNase. L'aplatissement de la zone rose à proximité du puits contenant l'anti-TNase révèle qu'il y a séro-inhibition (fig. 1). Laisser la lame pendant la nuit (de 16 à 18 h) dans la chambre humide à la température de la pièce et mesurer de

nouveau et consigner le diamètre de la zone rose. Noter toute séro-inhibition. Il est plus facile de mesurer la zone rose lorsqu'on trace d'abord le tour extérieur au moyen d'un stylo-bille à pointe fine. Effectuer périodiquement un contrôle de réactif en ajoutant de la TNase staphylococcique dans les puits d'échantillon.

L'addition de tampon Tris dans le deuxième puits «anti-TNase» est nécessaire pour deux raisons :

- a) S'il y a un aplatissement non spécifique des zones roses séparées par les puits d'anti-TNase, cet aplatissement se produira aussi dans les zones roses séparées par les puits contenant le tampon. La réaction sera donc négative pour ce qui est de la TNase staphylococcique. Ces réactions sont rares, mais ont déjà été observées.
- b) S'il y a vraiment inhibition par l'anti-TNase, il est beaucoup plus facile de déceler même la zone la plus infime d'inhibition en la comparant à la zone non inhibée dans les deux puits d'échantillon adjacents séparés par le puits contenant le tampon.

7.2.2.7 Si le diamètre de la zone rose, incluant celui du puits, est égal ou supérieur à 4 mm après 4 heures d'incubation à une température de 35-37 °C et s'il est inhibé par l'anti-TNase, la réaction est positive. Si le diamètre est inférieur à 4 mm après 4 heures d'incubation à une température de 35-37 °C, et s'il augmente après avoir incubé pendant la nuit à la température de la pièce et s'il est inhibé, la réaction est positive. Si l'une ou l'autre des réactions décrites ci-dessus survient sans inhibition, le résultat est négatif. Si le diamètre de la zone rose est inférieur à 4 mm après 4 heures d'incubation à une température de 35-37 °C et s'il n'augmente pas et n'est pas inhibé, ou si la zone rose disparaît après une incubation pendant la nuit à la température de la pièce, la réaction est négative.

7.3 Interprétation

Une épreuve positive pour la TNase indique que l'aliment peut être dangereux parce qu'à un moment donné, il peut avoir été contaminé par au moins 10^6 cellules de *S. aureus* par gramme et qu'il peut donc contenir de l'entérotoxine staphylococcique.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.2 Chesbro, W.R. and K. Auburn. 1967. Enzymatic detection of the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol.* **15**:1150-1159.
- 8.3 Lachica, R.V.F., P.D. Hoeplich and C. Genigeorgis. 1971. Metachromatic agar-diffusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Microbiol.* **21**:585-587.
- 8.4 Lachica, R.V.F. 1976. Simplified thermonuclease test for rapid identification of *Staphylococcus aureus* recovered on agar media. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**:633-634.
- 8.5 Rayman, M.K., C.E. Park, J. Philpott and E.C.D. Todd. 1975. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **29**:451-454.