

DETECTION DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

Les entérotoxines staphylococciques sont la cause de nombreuses toxi-infections alimentaires. Huit types sont actuellement connus dont le plus courant (type A) est responsable de 75% des cas. La dose limite infectante est de l'ordre de 100 ng de toxine par prise, il est donc indispensable d'avoir des méthodes de détection sensibles. Plusieurs kits utilisant des techniques immunologiques sont disponibles mais généralement non satisfaisants au niveau de leur sensibilité. Ce défaut est pallié avec un enrichissement de l'extrait alimentaire, avant dosage, par une méthode de dialyse/concentration, protocole mis au point au CNEVA Paris. L'association de ce mode de préparation aux diverses troupes assure la détection des entérotoxines à des niveaux inférieurs au seuil de toxicité.

GENERALITES

Les entérotoxines staphylococciques sont des métabolites de la croissance de staphylocoques toxigènes coagulase +. Des travaux ont rapportés que certains staphylocoques coagulase - seraient toxigènes mais leurs réelles implications dans des toxi-infections alimentaires restent à prouver. Ce sont des toxines protéiques de 27000 à 30000 daltons préformées dans les aliments contaminés par un nombre suffisant de staphylocoques toxigènes (supérieur à 10^5 cellules/g).

Elles sont responsables de nombreux cas de toxi-infections alimentaires (TIA) se situant, en France, au second rang des TIA d'origine bactérienne. La symptomatologie est rapide et brutale, entre 1 et 6 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé, avec vomissements, diarrhées et douleurs abdominales. La dose limite infectante est de l'ordre de 100 ng par prise alimentaire.

La prise en compte des facteurs « dose toxique et extraction difficile » pour ces entérotoxines de staphylocoques implique la nécessité de détenir des techniques de détection sensibles dans les denrées alimentaires complexes tels que les produits laitiers.

Huit entérotoxines sont à ce jour, connues, les types A, B, C₁, C₂, C₃, D, E et H. Parmi celles-ci, les plus fréquemment impliquées dans les phénomènes toxi-infectieux sont les types A, B, C_n, (n=1,2,3) et D, le type A représentant 75% des TIA à staphylocoques. Le type E correspond à 1% des souches staphylocoques toxigènes; quant au type H, il est encore actuellement peu décrit en raison de son identification récente (1995). Néanmoins, il faut retenir qu'il a été identifié dans des produits laitiers impliqués dans une TIA en Amérique du sud.

RECHERCHE DES ENTEROTOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

Elle se divise en deux parties : préparation de l'aliment en vue d'une extraction, puis détection des entérotoxines, d'autre part.

1 PREPARATION DES ALIMENTS

L'extraction des entérotoxines staphylococciques se fait à partir d'un broyat de l'aliment dans une solution aqueuse, suivi d'une acidification, une centrifugation, une neutralisation et une ultime centrifugation, la recherche des toxines étant réalisée sur la phase aqueuse issue de la deuxième centrifugation.

Des études réalisées au CNEVA Paris sur l'extraction des entérotoxines montrent que le taux de recouvrement des entérotoxines ajoutées à différentes matrices alimentaires est variable et partiel, inférieur à 50% selon les produits. Par ailleurs, ce taux est encore plus faible dans le cas d'une contamination naturelle.

2 RECHERCHE DES ENTEROTOXINES

Elle se fait à l'aide de méthodes immunologiques, de type :
EIA (Enzyme Immuno Assay)
ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay)
RPLA (Reverse Phase Latex Agglutination).

L'utilisateur ne peut intervenir sur les caractéristiques de ces différents outils de diagnostic délivrés sous forme de troupes de détection. La plupart ont de bonne sensibilité pour les toxines en solution, mais pas toujours suffisante au niveau de l'échantillon. En effet, compte tenu des paramètres « seuil de toxicité et extraction difficile et partielle », un seuil de détection de l'ordre de 0,1 ng de toxine par gramme de produit serait souhaitable pour certifier de la qualité hygiénique des produits en matière d'entérotoxines staphylococciques.

2-1 Dialyse/concentration

Des études menées au CNEVA Paris sur les facteurs pouvant intervenir sur l'extraction des entérotoxines et sur la composition de l'extrait alimentaire montrent que le seul facteur déterminant est « l'enrichissement de l'extrait ». Actuellement, celui-ci est réalisé par la méthode de dialyse/concentration. La phase récupérée à l'issue de la 2^{ème} centrifugation est mise à concentrer dans des sacs de dialyse, sous l'action du polyéthylène glycol. L'extrait concentré est ensuite solubilisé et repris par une solution tampon à pH 7,3. Le protocole détaillé peut être fourni sur simple demande.

La méthode d'enrichissement de l'extrait alimentaire par « dialyse/concentration » joue un rôle important dans la recherche des entérotoxines, car elle permet d'abaisser leur seuil de détection dans les denrées complexes, à des niveaux proches du seuil toxique.

Cette technique fait actuellement partie de la méthode officielle de recherche des entérotoxines staphylococciques (note de service DGAL/SDHA/N°97/N°8097 du 28 mai 1997). Néanmoins, en raison du manque de praticabilité et de standardisation de la « dialyse/concentration », d'autres techniques de capture et de purification des entérotoxines staphylococciques, faisant appel à la chromatographie d'affinité, sont à l'étude.

2-2 Point sur les techniques « officielles et/ou reconnues » de détection des entérotoxines staphylococciques en 1997

→ AOAC Official Method 976-31. *Staphylococcal Enterotoxins in Foods. Microsolide Gel Double Diffusion Test (1976 et 1977).*

* Seuil de détection : 0,1 à 0,01 µg d'entérotoxines/ml.

- * Durée : 48 à 72 heures.
- * Toxines détectées : A à E.

→ AOAC Official Method 980-32. *Staphylococcal Enterotoxins in Foods. Extraction and separation methods (1980 et 1981).*

- * Durée : 3 jours (dialyse/concentration + chromatographie).

→ AOAC Official Method 993-06. *Staphylococcal Enterotoxins in selected Foods. Polyvalent Enzyme Immunoassay method (TECRA SET) (first action 1993).*

- * Seuil de détection : 4 à 10 ng d'entérotoxines/g d'aliment.
- * Durée : 4 heures + préparation de l'extrait.
- * Toxines détectées : A à E.

→ *J. of AOAC International (1996). Immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins (TRANSIA SET tubes) : inter-national interlaboratory studies. C. Lapeyre, M.N. De Solan and X. Drouet*

- * Seuil de détection : 0,5 à 1,5 ng d'entérotoxines/g d'aliment.
- * Durée : 90 mn + préparation de l'extrait.
- * Toxines détectées : A à E.

→ TRANSIA SET tubes : validation AFNOR, en attente.

→ *Méthode du CNEVA Paris. Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal A, B, C_n and D in food samples. Food Microbiology (1988). C. Lapeyre, F. Janin and S.V. Kaveri. Technique de référence pour les validations AFNOR et pour la DGAL.*

- * Seuil de détection : < 0,1 ng d'entérotoxines/g d'aliment.
- * Durée : 3 heures + préparation de l'extrait.
- * Toxines détectées : A à E.

annexe : *extrait de la note DGAL/SDHA/N°17/N°8097 du 28 mai 1997*

Il y a lieu de distinguer la méthode officielle et les méthodes de routine. Cependant, dans les deux cas, compte-tenu de la fréquence des résultats « faux-négatifs » et en l'absence de technique validée AFNOR, il importe de faire précéder la détection des toxines par une phase de dialyse/concentration adaptée pour pallier au faible rendement d'extraction de toxines.

Méthodes de routine

La mise en oeuvre d'une de ces méthodes comporte la phase de dialyse/concentration puis l'utilisation, au choix du laboratoire selon son équipement et ses habitudes, de l'une des méthodes dont la liste figure ci dessous.

SET RPLA (Oxoid)	RPLA
SET EIA (Bommeli)	EIA
Ridascreen SET A, B, C, D, E (Biopharm)	EIA
SET Vidas (Bio Mérieux)	ELFA
TRANSIA SET tubes, SET plaques(Transia-Diffchamb)	EIA

Cependant, compte-tenu de la fréquence élevée des résultats « faux-positifs », dans le cas où l'utilisation d'une de ces méthodes révélerait la présence d'entérotoxine, le résultat doit être confirmé par l'utilisation d'une seconde parmi celles citées et différente de la première.

Pour les laboratoires susceptibles de la mettre en oeuvre, la méthode SET-EIA du fabricant Bommeli peut, au titre de l'autocontrôle, être utilisé directement sans phase de dialyse/concentration.

Les méthodes utilisées en routine pourront être mises en oeuvre dans le cadre des autocontrôles.

Méthode officielle

La méthode officielle préconisée par le CNEVA Paris comporte la phase de dialyse/concentration puis l'utilisation obligatoirement de l'une des deux trousse TRANSIA, méthodes présentant le moins d'interférences possibles avec les enzymes endogènes de la matrice laitière.

La méthode de référence devra être utilisée dans le cas où la recherche d'entérotoxines est en relation, avec une toxi-infection alimentaire collective à partir de produits laitiers ou bien dans le cadre de contrôle officiel lorsque la numération de *Staphylococcus aureus* est supérieure à 10⁴germes/grammes.

2-3 Trousses de détection des entérotoxines staphylococciques

Il existe actuellement sept trousse de détection :

- SET RPLA (Oxoid)
- SET EIA (Bommeli)
- TECRA S.E.V.I. (BioenterprisesPty.Ldt)
- TRANSIA SET tubes (Transia-Diffchamb)
- TRANSIA SET plaques (Transia-Diffchamb)
- Ridascreen SET A, B, C, D, E (Biopharm)
- SET Vidas (Bio Mérieux)

Parmi ces trousse, TECRA est recommandée par l'AOAC, TRANSIA SET tubes est en attente de reconduction de validation AFNOR et a été expertisée lors d'une étude collaborative internationale publiée dans le JAOAC en 1996.

Par ailleurs, la commercialisation de la trousse SET Vidas est momentanément stoppée.

Le tableau 1 présente les avantages et inconvénients de chacune de ces trousse.

2-4 Point sur les techniques d'identification et de détection des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers (cadre des contrôles officiels et de routine)

Ces techniques sont décrites dans la note de service DGAL/SDHA/N°17/N°8097 du 28.05.97, faisant référence à l'arrêté du 30 mars 1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché (voir en annexe).

(par C. LAPEYRE, CNEVA Paris)

FABRICANT	NOM	Type	Toxines détectées	Test : Volume durée enzyme	Limite de détection	AVANTAGES	INCONVENIENTS
OXOID	SET RPLA	RPLA	[A] - [B] - [C] - [D]	25 µl 24 Heures	0,2 ng/ml	* Pas d'interférence pour le lait cru * Sensibilité + + * Détection spécifique * Contrôle matrice	* Interprétation difficile * Durée longue * Pas de détection de SEE * Concentration OUI
Bommeli	SET EIA	EIA	[A] - [B] - [C] - [D]- [E] - [H] !!	20 ml 1 nuit + 7H Phosphatase	0,1 à 1 * ng/ml (* SED)	* Sensibilité ++++ (sauf SED) * Concentration NON * Détection possible H (Ac - D) !! * Détection spécifique * Contrôle matrice	* Assez difficile d'emploi * Faux positifs (+) dans les produits laitiers (E.E.) * Durée longue
Bioenterprises Pty Ltd	TECRA S.E.V.I.	EIA	[A B C D]	200 µl 4H péroxydase	1 ng/ml	* Test rapide et facile	* Sensibilité mauvaise * Pas de détection de SEE * Faux positifs (+) dans les produits laitiers (E.E.)
Diffchamb TRANSIA	1- SET tubes 2- SET plaques	EIA	[A B C D E]	500 µl test 1 200 µl test 2 90 min péroxydase	0,05 à 0,2 ng/ml	* Sensibilité ++ * Tests rapides et faciles * Automatisation possible pour le test 2	* Faux positifs (+) dans les produits laitiers (E.E.) * Concentration OUI
Biopharm	Ridascreen SET A, B, C, D, E	EIA	[A] - [B] - [C] - [D]- [E]	100 µl 2 H30 péroxydase	0,1 ng/ml	* Sensibilité + + * Détection spécifique * Contrôle matrice * Test rapide et facile	* Faux positifs (+) dans les produits laitiers (E.E.) * Concentration OUI
Bio Mérieux	SET VIDAS	ELFA	[A B C D E] H !!	500 µl 1H 20 Phosphatase	0,1 à 1 * ng/ml (* SEC)	* Test rapide et facile * Automate * Détection possible H (Ac - D) !! * Sensibilité + + (sauf SEC)	* Faux positifs (+++) dans les produits laitiers (E.E.) * Concentration OUI * Automate

Tableau 1 : Liste des différentes trousse disponibles avec les avantages et inconvénients

H !! : la détection de cette entérotoxine n'est pas prouvée
AC - D : méthode utilisant des anticorps anti entérotoxines D
SEE, SEC, SED : Staphylococcal enterotoxin E, C, D
E.E.: Enzyme endogène

