

Recherche des entérotoxines de *Staphylococcus aureus* par dosage radioimmunologique

par Françoise JANIN*, Marie-Laure DE BUYSER*
et Christiane LAPEYRE*

RÉSUMÉ

Les entérotoxines staphylococciques dont on connaît au moins 5 sérotypes (A, B, C, D et E) sont des protéines de faible poids moléculaire. Ces métabolites de certaines souches de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sont responsables d'intoxications alimentaires très banales. Les doses émétiques sont très faibles de l'ordre de 1 µg et même de 0,1 µg. Il est donc difficile de mettre ces toxines en évidence dans l'aliment. Ces protéines sont thermostables et résistent bien à l'action des enzymes protéolytiques alors que les staphylocoques sont thermosensibles.

Le dosage radioimmunologique appliqué aux 4 principaux sérotypes impliqués dans les épisodes de toxi-infections alimentaires (TIA) permet de doser jusqu'à 1 ng d'entérotoxine par gramme d'aliment. Nous avons utilisé le dosage adapté par MILLER (1978). Chaque type d'entérotoxine est marqué à l'Iode 125, le complexe antigène-anticorps est précipité avec de la protéine A. Cette méthode est quantitative lorsque l'on réalise une courbe étalon avec des quantités connues d'entérotoxine froide purifiée.

Cent vingt-sept aliments incriminés dans des TIA ont été étudiés suivant ce protocole. Dans 35 échantillons, nous avons retrouvé au moins un sérotype d'entérotoxine, le sérotype A étant prédominant.

Mots clés : *S. aureus* - Entérotoxines - Dosage radioimmunologique.

* Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Laboratoire Central d'Hygiène alimentaire, 43, rue de Dantzig - 75015 Paris.

SUMMARY**DETECTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXINS
BY RADIOIMMUNOASSAY**

Staphylococcal enterotoxins (SE) are known to be responsible of the most current types of foodborne diseases for human.

Certain strains of *Staphylococcus aureus* are able to produce at least 5 different enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED and SEE) associated with foodborne disease. The toxins are similar in their activity and composition. They induce an emetic reaction and are resistant to the action of heat and proteolytic enzymes.

In order to detect them directly in food, we used radio-immunoassay RIA for determining 4 serotypes (A, B, C and D) as previously described by MILLER (1978).

Each type was labelled using Iodide 125. Standard curve was established with different amount of purified enterotoxin. The analysis can be performed in less than 24 hours with a detection limit of 1 ng/g of food.

Enterotoxin determination was performed using RIA method on 127 foodstuffs implicated in food poisoning. 35 foods were found contaminated by enterotoxins. Type A was prevalent.

Key words : *S. aureus* - Enterotoxins - Radioimmunoassay.

Les Toxi-Infections Alimentaires (TIA) d'origine bactérienne sont extrêmement fréquentes, cependant l'agent responsable est très souvent difficile à mettre en évidence. D'après la littérature, l'étiologie de plus de 50 % des épisodes déclarés reste inconnue.

Les intoxications provoquées par *S. aureus*, font partie de celles qui sont les plus difficiles à comptabiliser. Cela est dû au fait que les symptômes qui apparaissent très rapidement après l'ingestion des repas, disparaissent généralement sans traitement en 24 ou 48 h. Ils se manifestent sous forme de vomissements, nausées souvent accompagnées de diarrhées. On les assimile fréquemment à des « indigestions » et aucune déclaration n'est faite lorsque cela se produit à la suite d'un repas familial. Ce type d'intoxication prend un caractère dramatique lorsqu'il se produit dans une collectivité, les malaises pouvant apparaître sur le lieu de travail ou dans une école, le nombre de malades étant alors très élevé. Les intoxications collectives font donc souvent l'objet d'une enquête et chaque fois que cela est possible les malades sont examinés. Les germes pathogènes et les toxines sont recherchés dans les aliments suspects.

Une croissance importante de *S. aureus* (> 10⁶ germes/gramme) est nécessaire pour que les entérotoxines soient présentes en quantité suffisante pour déclencher une TIA.

Ces métabolites sont des protéines de faible poids moléculaire, on en connaît au moins 5 sérotypes de structure très voisine et présentant la même toxicité (A, B, C, D et E). On parle alors d'intoxination car si les souches de bactéries sont détruites à la suite d'un traitement appliqué aux aliments, la toxicité des entérotoxines est conservée.

Ces différentes entérotoxines ont été initialement purifiées au « Food Research Institute » Madison, E.U. Elles se caractérisent par une grande stabilité en particulier vis-à-vis de l'action de la chaleur et des enzymes protéolytiques. La plupart des techniques qui permettent de mettre en évidence ces entérotoxines utilisent le pouvoir antigénique de ces protéines. Actuellement, les tests sur animaux sont abandonnés par manque de spécificité.

La recherche des entérotoxines dans les aliments reste difficile à mettre en œuvre. Les méthodes d'immunodiffusion en gélose en boîte (ROBBINS, 1974) ou sur lame (CASSMAN, 1969) qui sont employées pour l'étude de la toxino-génèse des souches de *S. aureus* ne présentent pas la sensibilité nécessaire pour détecter les faibles teneurs d'entérotoxines habituellement rencontrées dans les aliments.

Nous avons pratiqué la technique miniaturisée sur lame. Elle requiert une extraction très longue (DE BUYSER, 1982), à partir d'une quantité importante d'aliments (100 g).

Les techniques biochimiques telles que la radioimmunologie et les méthodes immunoenzymatiques étant beaucoup plus sensibles, conviennent mieux à la recherche dans les aliments.

La mise en œuvre d'un dosage immunologique nécessite toutefois la préparation de tous les sérotypes d'entérotoxine et des antisérums correspondants. Les réactifs ne sont pas actuellement commercialisés à part le sérotype B, ce qui explique le fait que les entérotoxines soient très rarement recherchées.

MATERIEL ET METHODES

Nous utilisons pour la recherche des sérotypes A, B, C et D, un dosage radioimmunologique adapté par MILLER (1978) auquel nous avons apporté quelques modifications au niveau notamment du marquage (JANIN, 1983).

Plusieurs dosages radioimmunologiques peuvent être employés. La méthode de MILLER est un dosage direct par compétition entre l'entérotoxine marquée à l'Iode 125 et l'entérotoxine froide, l'antigène étant en excès par rapport à la quantité d'anticorps. On précipite le complexe antigène-anticorps avec de la protéine A qui se fixe sur les chaînes Fc des immunoglobulines, et cela d'autant

plus facilement que les chaînes Fab sont déjà occupées. On évalue la quantité de radioactivité contenue dans le précipité.

Les entérotoxines purifiées à plus de 95 % ont été préparées au laboratoire à partir de souches productrices des sérotypes A, C et D (fournies par le Pr BERGDOLL, Madison E.U.), le sérotype B a été acheté chez MAKOR (Israël).

- Les immunsérums anti A et anti C ont été préparés au laboratoire, le sérotype D a été fourni par le Pr BERGDOLL (Food Research Institute, Madison, E.U.).

- L'iode 125, sous forme d'iodure de sodium, d'activité spécifique 100 mCi/ml provient de chez Amersham France par livraison de 2 mCi.

- Une suspension cellulaire porteuse de protéine A est préparée au laboratoire à partir de la souche Cowan I de *S. aureus* (Institut Pasteur, Paris) suivant la méthode de CULLEN (1976). La suspension cellulaire est conservée à -18° C.

- Le marquage à l'Iode 125 des entérotoxines est réalisé sous hotte ventilée en utilisant comme agent d'oxydation de l'iodo-gen (1-3-4-6 tetrachloro 3 α ,6 α diphényl glycoluril® (PIERCE). L'Iode libre est séparé de la protéine marquée par passage sur colonne PD 10 (PHARMACIA) remplie de Gel G.25.

- La radioactivité est déterminée avec un compteur gamma Mini Assay (Mini Instruments). On utilise une activité d'environ 20 000 cpm pour chaque tube.

- Les antisérums sont dilués de manière à précipiter 50 % de l'antigène marqué en l'absence d'antigène froid.

- Des extraits d'aliments sont préparés suivant la méthode de MILLER (1978) à partir de 10 g d'aliments. Pour certains produits, il est nécessaire de purifier l'extrait en le passant sur une petite colonne remplie de Sepharose Protein A afin d'éliminer les immunoglobulines qui gênent le dosage (laits crus et fromages au lait cru).

- Dosage RIA. Le dosage est réalisé à partir de 100 μ l d'extrait d'aliment ou de 100 μ l d'une solution contenant une dose connue d'entérotoxine. 50 μ l d'immunsérum sont ajoutés à la dilution donnant 50 % de précipitation avec l'antigène marqué. L'incubation à 37° C est maintenue pendant 1 h.

Ensuite 100 μ l de solution contenant l'entérotoxine marquée à l'Iode 125 sont ajoutés, le mélange est incubé 1 h à 37° C. On précipite le complexe antigène-anticorps en ajoutant 200 μ l de suspension de cellules Cowan I, riches en protéine A ainsi que 500 μ l de tampon Tris 0,01 M, NaCl 0,1 M.

Après une centrifugation à 5 000 tours/minute, on prélève délicatement le surnageant. Un comptage de radioactivité est fait sur le précipité. Deux témoins sont traités simultanément en ajoutant tous les réactifs sans l'anticorps (Bo), le maximum de précipitation est évalué en déterminant avec tous les réactifs mais sans antigène froid (Bm) la radioactivité fixée à l'anticorps.

La quantité de radioactivité B-Bo retrouvée dans le précipité permet d'estimer la dose d'entérotoxine contenue dans l'échantillon, s'il y a présence d'entérotoxine B-Bo < Bm-Bo.

RESULTATS

COURBES ÉTALONS

Elles sont établies en portant en abscisse le logarithme des doses d'entérotoxine et en ordonnée la quantité de radioactivité retrouvée dans le précipité. Sur la figure 1, est représentée la courbe étalon obtenue avec l'entérotoxine A. Cette courbe est construite en répétant 10 fois chaque dose.

La zone de concentration dans laquelle on peut travailler est comprise entre 2 et 30 ng/ml d'extrait.

Les courbes obtenues avec les 4 sérotypes étudiés sont très similaires.

ETUDE DES ALIMENTS

Le dosage radioimmunologique a été réalisé pour étudier les aliments suspectés d'avoir provoqué une intoxication alimentaire. Quelques produits ont été étudiés à la suite d'analyses de contrôle mettant en évidence une contamination importante par *S. aureus* ($> 10^5/g$).

A la suite de plaintes de consommateurs, il n'est pas toujours possible de collecter les restes du repas incriminé et on est souvent réduit à prélever chez le fabricant ou le commerçant un échantillon du même lot de fabrication ou de même origine.

L'enquête effectuée a porté sur 127 aliments sur lesquels plusieurs recherches ont été pratiquées.

1. L'analyse bactériologique comprenant la recherche et le dénombrement de *S. aureus* (coagulase +, thermonucléase +).

2. Le test de la thermonucléase (TATINI, 1976). La présence de cet enzyme dans un aliment témoigne d'une croissance importante de *S. aureus* même si ceux-ci sont ensuite détruits par un traitement thermique.

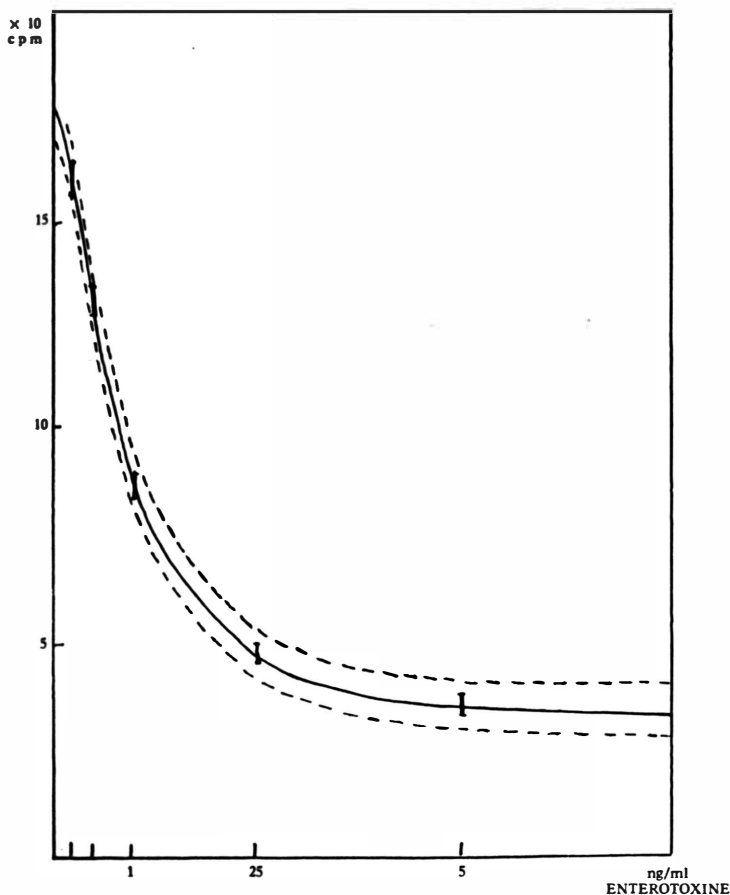


Fig. 1

Courbe étalon réalisée avec différentes doses d'entérotoxine A purifiée. Le logarithme des doses est porté en abscisse et en ordonnée, la quantité de radioactivité entraînée dans le précipité (quantité d'antigène marqué fixé à l'anticorps).

3. La recherche par dosage RIA des sérotypes d'entérotoxines A, B, C, et D.

Le bilan de cette étude, en considérant les résultats de ces différents tests est le suivant :

Pour 35 échantillons au moins un sérotype d'entérotoxine a été retrouvé, et le détail des résultats obtenus est présenté dans le tableau I. L'entérotoxine A est le sérotype le plus souvent retrouvé (25 produits sur 35), accompagné 2 fois du sérotype D. Les doses d'entérotoxines évaluées sont comprises entre 1 et 470 ng. Les plus

TABLEAU I

Bilan de la recherche des quatre sérotypes d'entérotoxine et de la Dnase thermostable dans 127 aliments impliqués dans des intoxications alimentaires. Doses d'entérotoxines retrouvées dans les aliments responsables d'intoxications alimentaires et réponses au test de la thermonucléase.

Aliments	Entérotoxines en NG/g d'aliments				Test D.nase (diamètre de la zone décolorée en mm) + quand > 3,8
	A	B	C	D	
<i>Produits laitiers</i>					
Lait U.H.T.	—	—	1	—	+ (4)
Crème fraîche	—	—	—	1,5	+ (7)
Fromage frais (vache, brebis)	38	—	—	—	+ (7)
Fromage frais (vache)	470	—	—	—	+ (5)
Fromage de chèvre	—	—	—	10	+ (8)
St-Marcellin (lait cru)	3	—	—	—	(sans extraction)
	2,5	—	—	—	(sans extraction)
Fromage de brebis (lait cru)	16	—	—	3	+
	2,5	—	—	—	+
	3	—	—	—	+
	—	—	—	15	+ (7)
	—	—	—	3,5	+ (6)
Reblochon (lait cru)	13	—	—	—	—
Beaumont (lait cru)	20	—	—	—	+
	19	—	—	—	+
	15	—	—	—	+
Carré de l'Est	10	—	—	—	+ (4,2)
	5	—	—	—	—
	30	—	—	—	+ (5)
St-Nectaire	6	—	—	—	+ (5)
Camembert (lait cru)	1,5	—	—	—	—
	4	—	—	—	—
	—	—	—	2	—
Gruyère	2	—	—	—	—
<i>Pâtisseries</i>					
Chou	+	—	—	—	+ (4,5)
Crème pâtissière	—	+	—	—	—
Galette des rois (frangipane)	—	—	—	1	—
<i>Pâtes alimentaires</i>					
Lasagnes crues	5	—	—	—	+ (4,5)
	—	—	—	1	+ (4,5)
<i>Plats cuisinés avec viande</i>					
Cassoulet (conserve)	10	ND	ND	ND	ND
Bœuf bourguignon	320	—	—	—	+ (9)
Sauté de porc	2	—	—	5	—
Jambonneau	5	—	—	—	+ (4,5)
<i>Divers</i>					
Salade de riz au thon	10	—	3	—	+ (5)
Saury	4	—	—	—	—

fortes doses ont été retrouvées dans des produits préparés artisanalement (fromage frais) ou pour un repas familial (bœuf bourguignon).

Dans 14 aliments le nombre de *S. aureus* dépasse 10^2 germes/g, mais aucun des 4 sérotypes d'entérotoxine étudiés n'a été décelé.

Pour 11 aliments, un autre agent pathogène a été mis en évidence, expliquant la symptomatologie observée.

Soixante-deux produits se sont révélés être conformes aux normes appliquées aux denrées destinées à la consommation humaine. Il semblerait que l'aliment réellement impliqué ne soit pas toujours parvenu au laboratoire. L'étude de produits du même lot que celui qui a été consommé donne généralement des résultats négatifs, sauf dans le cas de lasagnes et cela met bien en évidence l'importance de l'enquête pratiquée à la suite de l'accident.

Les sérotypes B et C sont très peu fréquemment retrouvés alors que les souches prélevées dans des plaies ou des abcès se révèlent être très souvent productrices d'entérotoxine B. Les souches d'origine bovine produisent surtout le sérotype C. Un seul produit laitier contient de l'entérotoxine C.

CONCLUSION

L'emploi d'un dosage sensible et spécifique comme le dosage radioimmunologique, apporte indiscutablement des renseignements intéressants. La technique est rapide à mettre en œuvre. Cependant actuellement, la décentralisation de cette recherche vers les laboratoires des services vétérinaires départementaux est difficile à réaliser, la manipulation d'Iode radioactif nécessite une autorisation spéciale. Les réactifs purifiés nécessaires pour faire cette recherche ne sont pas commercialisés et nous ne sommes pas en mesure de les produire en grosses quantités pour les distribuer aux différents utilisateurs.

Un dosage de type EIA est à l'étude et sera prochainement utilisé également en routine, la préparation d'anticorps monoclonaux est également envisagée. Il serait très intéressant de détenir un mélange d'anticorps qui reconnaisse tous les sérotypes d'entérotoxines simultanément pour le contrôle au moment de la production des produits dont le risque de contamination par *S. aureus* est élevé.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Pr BERGDOLL pour son aide et la fourniture de différents réactifs.

Ce travail a été effectué avec la collaboration technique de Muriel BOREL et de Françoise DILASSER.

BIBLIOGRAPHIE

- CASMAN (E.P.), BENNET (R.W.). — The microslide gel double diffusion test from the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. *Health Labo Sci.*, 1969, 6, 185-198.
- CULLEN (S.E.), SCHWARTZ (B.D.). — An improved method for isolation of H₂ and Ia. Alloantigens with immunoprecipitations induced by protein A. Bearing staphylococci. *J. of Immunol.*, 1976, 117, 1, 136-141.
- DE BUYSER (M.L.), JANIN (F.). — Les entérotoxines staphylococciques : détection dans les aliments. *Rec. Méd. Vét.*, 1981, 157, 809-818.
- JANIN (F.), DE BUYSER (M.L.), LAPEYRE (C.), FEINBERG (M.). — Radioimmunological quantitative determination of *Staphylococcus aureus*, enterotoxin A in various food. *Sci. Aliments*, 1983, 3, 3, 397-412.
- MILLER (B.A.), REISER (R.F.), BERGDOLL (M.S.). — Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E, in foods by radioimmunoassay using staphylococcal cells containing protein A as immunoabsorbant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, 36-3, 421-426.
- ROBBINS (R.), GOULD (S.), BERGDOLL (M.S.). — Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, 1974, 28, 946-950.
- TATINI (S.R.), JEZESKI (J.J.), MORRIS (H.A.), OLSON (J.C.), CASMAN (E.P.). — Production of staphylococcal enterotoxin in Cheddar and colby cheese. *J. Dairy Sci.*, 1971, 54, 815-825.
-